

Broj 3 • septembar 2023. № 3 • September 2023.



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



GODINA OD OTKRIĆA
SEKUNDARNE STRUKTURE MOLEKULA DNK



Beograd • Belgrade • 2023.
IMGGI • IMGGE

70 godina od otkrića sekundarne strukture molekula DNK	8
The 70 th anniversary of the discovery of DNA secondary structure	
Goran Brajušković	
Varijabilnost mitohondrijskog genskog pula stanovnika Republike Srbije	18
Mitochondrial gene pool variability of the residents of the Republic of Serbia	
Slobodan Davidović, Jelena M. Aleksić, Milena Stevanović i Nataša Kovačević Grujičić	
Sekvenciranje dugih fragmenata – sledeći nivo genomskih istraživanja	38
Long read sequencing – the next level in genomic research	
Dušanka Savić-Pavićević, Lana Radenković, Luka Velimirov, Nemanja Radovanović, Anastasija Ninković, Nemanja Garai, Miloš Brkušanin, Marko Panić, Jovan Pešović	
Stereotipija B-ćelijskog receptora u hroničnoj limfocitnoj leukemiji	58
B-cell receptor stereotypy in chronic lymphocytic leukemia	
Teodora Karan-Đurašević	
Sadašnjost i budućnost primene sekvenciranja nove generacije za retke bolesti	78
Present and future of next-generation sequencing application for rare diseases	
Maja Stojiljković i Jovana Komazec	
Uloga vazopresinskog sistema paraventrikularnog jedra u razvoju hipertenzije	90
The role of paraventricular nucleus vasopressin system in development of hypertension	
Bojana Stevanović, Nina Japundžić-Žigon	
Antioksidativni i antiinflamatorni efekti suplementacije orasima (<i>Juglans regia</i> L.) na srce u metaboličkom sindromu izazvanom ishranom bogatom fruktozom	106
Antioxidative and antiinflammatory effects of walnut supplementation (<i>Juglans regia</i> L.) on heart with fructose-rich diet-induced metabolic syndrome	
Maja Bubić, Maja Živković	
PHACTR1 u kardiovaskularnim bolestima: od studija asocijacije na celokupnom genomu do funkcionalnih studija	122
PHACTR1 in cardiovascular disease: from genome-wide association studies to functional studies	
Jovana Kuveljić, Tamara Djurić	
Uloga ciljanih (epi)genetičkih modifikacija u potencijalnoj terapiji dijabetesa	138
The role of targeted (epi)genetic modifications in potential diabetes therapy	
Marija Đorđević, Svetlana Dinić, Mirjana Mihailović, Aleksandra Uskoković, Nevena Grdović, Jelena Arambašić Jovanović, Melita Vidaković	
Uticaj delecije gena <i>Mif</i> na razvoj gojaznosti i steatoze jetre kod miševa na režimu ishrane obogaćene fruktozom	151
The effects of deletion of the <i>Mif</i> gene on the development of obesity and hepatic steatosis in mice on fructose enriched diet	
Ljupka Gligorovska i Ana Djordjevic	
Varijante i transkripcija gena koji kodiraju komponente leptinskog signalnog puta, inflamacije i antioksidativne zaštite u patogenezi multiple skleroze	168
Variants and transcription of genes of the leptin signaling pathway, inflammation and antioxidant protection in pathogenesis of multiple sclerosis	
Ivana Kolić, Ljiljana Stojković	
Parkinsonova bolest – dokle se stiglo?	184
Parkinson's disease – state of the art	
Jadranka Miletić Vukajlović, Dunja Drakulić	
Značaj farmakogenetike u terapijskom pristupu akutnog ishemijskog moždanog udara rekombinovanim tkivnim aktivatorom plazminogena	205
Importance of pharmacogenetics for ischemic stroke therapy with recombinant tissue plasminogen activator	
Marija Dušanović Pjević	
Beta-adrenergički receptori i kinaze uključene u proces njihove nishodne regulacije u eksperimentalnom modelu kardiomiopatije izazvane doksorubicinom	218
Beta-adrenergic receptors and kinases involved in the process of their downregulation in experimental model of cardiomyopathy induced by doxorubicin	
Marija Kosić, Zorica Nešić, Nina Žigon	
Uticaj genetičkih faktora na efikasnost i toksičnost terapije metotreksatom kod pacijenata sa reumatoidnim artritisom	232
Genetic factors impacting the efficacy and toxicity of methotrexate therapy in rheumatoid arthritis patients	
Milka Grk	
Ekstrakti briofita kao imunomodulatori	245
Bryophyte extracts as immunomodulators	
Tanja Lunić, Bojan Božić, Biljana Božić Nedeljković	
Struktura, funkcija i regulacija ekspresije gena za akvaporine pri suši kod biljaka	256
Structure, function and regulation of aquaporin gene expression during drought in plants	
Marija Đurić	
Identifikacija gena za arabinogalaktanske proteine (AGP) biljaka korišćenjem metoda mašinskog učenja	269
Identification of AGP genes of plants using machine learning methods	
Danijela Paunović	

Predgovor

Prošlo je 70 godina od otkrića sekundarne strukture molekula DNK. Od tog momenta molekularna biologija se razvija neverovatnom brzinom. „Trendovi u molekularnoj biologiji 3“ u svakom poglavlju pokazuju fascinantne domete koje dostiže molekularna biologija našeg vremena. I Nobelove nagrade se skoro svake godine dodeljuju za postignuća iz ove naučne discipline. A naši molekularni biolozi drže korak sa modernim trendovima. Jedan od autora ovog Zbornika govori : „Bez sumnje, ono što je otkriće elektrona bilo za 20. vek to su otkrića genomike za 21. vek.“ Autori „Trendova u molekularnoj biologiji 3“ ni najmanje ne sumnjaju u to.

Ove godine TMB3 prati i suplement, Knjiga apstrakata Drugog kongresa molekularnih biologa Srbije (CoMBoS2). Pod pokroviteljstvom Srpskog društva za molekularnu biologiju, Beograd je bio 2023. godine mesto susretanja molekularnih biologa Srbije, regiona i Evrope. Doprinos Kongresu, koji su obeležila inspirativna predavanja i inovativne naučne ideje, dali su svi molekularni biolozi Srbije. Formula uspešnosti i ovde je bila aktuelna:

„Svi za jednog, jedan za svi!“

Sonja Pavlović

Iz recenzija Tematskog zbornika *Trendovi u molekularnoj biologiji*

Treći broj *Trendova u molekularnoj biologiji* predstavlja nastavak dobre prakse prikazivanja najboljih naučnih radova mladih istraživača Republike Srbije u oblasti molekularne biologije, kao i najznačajnijih otkrića i metodoloških pomaka u ovoj oblasti. Osim ovog glavnog cilja, *Trendovi* ne zaboravljaju značajne godišnjice i podsećanja na najznačajnija dostignuća i prekretnice u razvoju molekularne biologije. Tako je u ovom trećem broju prikazan jedan od temeljnih radova u ovoj oblasti – 70 godina od otkrića sekundarne strukture DNK. Radovi koji su obeležili prošlu godinu i koji su ovde prikazani odnose se na proučavanje genoma starih humanih populacija i evolucije (Nobelova nagrada za fiziologiju i medicinu 2022), a metodološki pomak je sekvenciranje dugih fragmenata DNK.

Trendovi u molekularnoj biologiji 3 svojim sadržajem u potpunosti su opravdali naziv koji nose – prikazani radovi su tematski aktuelni, inspirativni i veoma značajni u naučnom i širem društvenom smislu. Ova publikacija predstavlja svojevrsni presek stanja u molekularnoj biologiji u Srbiji i deo je napora da se prate trendovi i drži korak sa molekularnom biologijom u svetu. Zbog značaja koji ima, nadam se da će se trend objavljivanja *Trendova* nastaviti i narednih godina.

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

Tematski zbornik „Trendovi u molekularnoj biologiji 3“ je treći broj u nizu izdanja koje ima za cilj da prikaže naučne rezultate iz oblasti molekularne biologije koje su ostvarili naučnici iz Srbije u prethodnoj godini. Sačinjen je od 18 poglavlja, od kojih 12 predstavljaju revijske radove proizašle iz doktorskih disertacija mladih doktora nauka u kojima je prikazan njihov doprinos određenoj naučnoj oblasti molekularne biologije koja je povezana sa temom njihove disertacije. Preostalih 6 poglavlja su prikazi aktuelnih tema iz molekularne biologije u kojima su naši naučnici dali svoj značajni doprinos. Uvodno poglavlje je posvećeno jubileju, sedamdesetogodišnjici od otkrića strukture molekula DNK, momentu kad je molekularna biologija krupim koracima krenula ka budućnosti, u kojoj je uz ITK tehnologije postala vodeća nauka.

Veliki broj poglavlja iz Zbornika (12) je posvećen istraživanjima iz oblasti biomedicine. To je, očigledno, najznačajnija tema za naše istraživače koji se bave molekularnom biologijom. Tu su i 3 poglavlja iz oblasti farmakogenomike, koja predstavlja najnoviji trend u medicini – personalizovana (precizna) medicina. Ova 3 rada svedoče o tome da naši naučnici prate najnovija stremljenja u medicini. Posebno treba istaći doprinos mladih istraživača iz grupe medicinskih fakulteta ovom izdanju. Čak četvoro istraživača sa Medicinskog fakulteta i jedan sa Stomatološkog fakulteta su priložili poglavlja nastala iz njihovih doktorskih disertacija. Ovo pokazuje da medicina u Srbiji prati svetske trendove. Ovaj broj Tematskog zbornika svedoči i o tome da su značajna postignuća molekularnih biologa u Srbiji donela napredak našoj medicini. Prva dva broja Tematskog zbornika „Trendovi u molekularnoj biologiji 1 i 2“ su doživela veliko interesovanje. Imala su i svoju promociju na Sajmu knjiga. Interesovanje autora da objave svoje rezultate u tematskom zborniku „Trendovi u molekularnoj biologiji 3“ govori da je ovaj tip publikacije nedostajao našoj naučnoj zajednici.

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

Tematski zbornik „Trendovi u molekularnoj biologiji 3“ sadrži prikaze nekih od najznačajnijih tema u molekularnoj biologiji, počev od ovogodišnjeg jubileja - 70 godina od otkrića sekundarne strukture molekula DNK, preko odabira aktuelnosti koje su obeležile prethodnu godinu u svetu, do naučnih rezultata iz ove oblasti koje su ostvarili istraživači iz Srbije. U okviru Aktuelnih tema, sumirani su rezultati istraživanja iz oblasti fiziologije i medicine za koje je u 2022. godini dodeljena Nobelova nagrada, a odnose se na genomiku starih humanih populacija i evoluciju. Takođe, dat je i prikaz metode sekvenciranja dugih fragmenata, koja je po časopisu *Nature Methods* odabrana za metodu 2022. godine. Preostale teme su iz oblasti kojima se bave istraživači iz Srbije, a koje uključuju istraživanja iz biomedicine, farmakogenomike, kao i molekularne biologije biljaka. Važno je istaći da su mladi doktori nauka aktivno učestvovali u izradi ovog Zbornika, tako da 12 poglavlja u okviru navedenih oblasti predstavljaju revijske radove proizašle iz njihovih doktorskih disertacija odbranih u prethodnoj godini.

Značajno je da se ovaj Tematski zbornik objavljuje već treću godinu za redom, kao i to da su u njegovoj realizaciji ove godine učestvovali istraživači iz različitih naučnih instituta (3) i fakulteta (3) Univerziteta u Beogradu. Ove činjenice ohrabruju, ukazujući da u našoj zemlji postoji kontinuitet u istraživanjima u molekularnoj biologiji koja su aktuelna u svetu, uz to da su dobijeni rezultati iz ove oblasti dostupni i široj javnosti na maternjem jeziku. „Trendovi u molekularnoj biologiji 3“ je tematski zbornik u kome su objedinjeni rezultati fundamentalnih i primenjenih istraživanja u molekularnoj biologiji ostvarenih u našoj zemlji, iz tematskih oblasti koje su prepoznate i aktuelne u svetu.

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



JUBILEJ

ANNIVERSARY



70 godina od otkrića sekundarne strukture molekula DNK

Goran Brajušković

Univerzitet u Beogradu – Biološki fakultet

Kontakt: brajuskovic@bio.bg.ac.rs

Apstrakt

Godina 2023. je godina jubileja u kojoj se obeležava 70 godina od otkrića sekundarne strukture molekula DNK. U ovom radu preglednog tipa dat je istorijski osvrt na otkrića i eksperimente koji su doveli do razvoja molekularne biologije, a kasnije i genomike kao nove naučne discipline. Poseban osvrt dat je na događaje i ljude koji su doprineli postavljanju trodimenzionalnog modela molekula DNK.

The 70th anniversary of the discovery of DNA secondary structure

Goran Brajušković

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

Correspondence: brajuskovic@bio.bg.ac.rs

Abstract

This year marks the 70th anniversary of the discovery of the secondary structure of DNA molecule. This review-type paper provides an overview of the most important discoveries and experiments that led first to the development of molecular biology, and later to the development of genomics as a new scientific discipline. A special review is given to the events and people who contributed to the establishment of the three-dimensional model of the DNA molecule.



GODINA OD OTKRIĆA

SEKUNDARNE STRUKTURE MOLEKULA DNK

Uvod

Ove godine navršava se 70 godina od otkrića sekundarne strukture molekula dezoksiribonukleinske kiseline (DNK), koji je nosilac nasledne informacije u svim živim organizmima. Ovo otkriće smatra se i početkom razvoja nove naučne oblasti - molekularne biologije koja za temu istraživanja ima živi svet na nivou bioloških makromolekula, pre svih nukleinskih kiselina i proteina.

Termin molekularna biologija prvi je 1938. godine upotrebio Voren Viver [Warren Weaver] (1894-1978), američki matematičar iz Rokfelerove Fondacije, želeći time da naglasi tadašnji doprinos hemičara i fizičara u razumevanju bioloških fenomena na ćelijskom nivou.

Dana 25. aprila 1953. godine u 171. broju časopisa Priroda [Nature] objavljen je rad „*Molecular structure of nucleic acids - A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid*“. Autori ovog rada bili su Džejms Votson [James Watson] (r.1928) i Frensis Krik [Francis Crick] (1916–2004). Simbolično, na isti dan 50 godina kasnije, završen je i projekat „Genom čoveka“ (eng. *The Human Genome Project*, HGP) od strane Međunarodnog konzorcijuma za sekvenciranje genoma čovek (eng. *The International Human Genome Sequencing Consortium*, IHGSC).

Od tada, svake godine se 25. april obeležava kao Dan molekula DNK.

Eksperimenti kojima je dokazano da je molekul DNK nosilac naslednih informacija

Nukleinske kiseline prvi je izolovao švajcarski fiziolog Fridrih Mišer [Friedrich Miescher] (1844-1895), samo četiri godine nakon što je Mendel postulirao postojanje „faktora“ koji prenose nasledne osobine. Kao biološki materijal iz kojih je izvršio izolaciju navodi se gnoj sa zavoja bolesnika iz bolnice u kojoj je bio zaposlen. Po drugima, kao strastvenom pecarošu, sperma lososa bila je biološki materijal iz kojih je izolovao nukleinske kiseline. Izolovani materijal Mišer je nazvao nuklein. Međutim, za povezivanje nukleina sa Mendelovim „faktorima“ nasleđivanja bilo je suviše rano. Sam Mišer konstatovao je „da su dobijeni rezultati [...] dovoljno značajni da podstaknu ispitivanja i drugih“. Nuklein, 1889. godine, Ričard Altman [Richard Altman] (1852-1900) naziva nukleinska kiselina. Uloga nukleinskih kiselina u prenošenju naslednih osobina zanemarivana je punih 70 godina. Do zaključka da su nukleinske kiseline nosioci naslednih informacija došlo se nakon brojnih otkrića koja su direktno ili indirektno bila vezana za fenomen nasleđivanja.

Otkriće fenomena transformacije (prihvatanje molekula DNK iz spoljašnje sredine i transporta u unutrašnjost bakterijske ćelije) bio je prvi naučni korak u dokazivanju da su nukleinske kiseline nosioci naslednih osobina. Ovaj fenomen, 1928. godine, otkrio je Frederik Grifit [Frederick Griffith] (1879-1941) u svojim eksperimentima na bakteriji *Streptococcus pneumoniae*.

Prvi eksperimentalni dokaz da molekuli DNK, a ne proteini, prenose nasledne informacije, dao je pionir molekularne biologije i imunohistohemije Amerikanac kanadskog porekla Osvald Ejveri [Oswald Avery] (1877-1955). Ejveri je u njujorškom Rokfelerovom institutu za medicinska istraživanja [Rockefeller Institute] istraživao biološku osnovu Grifitovog transformišućeg principa. Na osnovu dobijenih rezultata postavljanih eksperimenata, Ejveri i njegovi saradnici su molekul DNK identifikovali kao aktivnu komponentu ekstrakta koji dovodi do transformacije bakterija. Ejveri je oprezno zaključio da se geni sastoje od molekula DNK ili, bar, da sadrže molekul DNK, i da je molekul DNK svakog gena specifičan. Svoj danas istorijski rad završio je rečenicom „Izneti podaci podržavaju uverenje da nukleinska kiselina koja sadrži dezoksiribozu predstavlja osnov transformišuće aktivnosti pneumokoka tipa II“.

Sedam godina nakon Ejverijevih eksperimenata (1952. godine) Marta Čejs [Martha Chase] (1930-2003) i Alfred Herši [Alfred Hershey] (1908-1997), na osnovu eksperimenata sa bakteriofagom T2, definitivno su

potvrdili da je molekul DNK nosilac naslednih informacija. Na osnovu rezultata svojih eksperimenata oni su zaključili da tokom infekcije bakterija od strane bakteriofaga u njih „prodire“ molekul DNK, a ne proteini. Prisustvo molekula DNK bilo je dovoljno da se u bakterijskim ćelijama izvrši replikacija bakteriofaga. Istovremeno, to je bio i nedvosmisleni dokaz da je molekul DNK nosilac naslednih informacija. Nobelovu nagradu za fiziologiju i medicinu 1969. godine Alfred Herši podelio je sa Amerikancem italijanskog porekla Salvadorom Luriem [*Salvador Luria*](1912-1991) i Nemcem Maksom Delbrukom [*Max Delbrück*](1906-1981) za otkrića vezana za replikaciju bakteriofaga.

Hemijski sastav molekula DNK

Četrdesetih godina prošlog veka otkrivena je i hemijska struktura nukleinskih kiselina. Osnovnu jedinicu građe nukleinske kiseline čini nukleotid koji je sastavljen od jednog molekula fosforne kiseline, jednog molekula šećera pentoze (dezoksiriboze u molekulu DNK, odnosno riboze u molekulu RNK) i jednog molekula purinske ili pirimidinske baze. Dve purinske baze, adenin (A) i guanin (G), kao i dve pirimidinske baze, citozin (C) i timin (T), detektovane su u molekulu DNK. Molekul RNK sadrži iste baze osim što je baza T zamenjena pirimidinskom bazom uracil (U). Najveći doprinos u otkriću strukture nukleotida dao je Škot Alekzenderer Tad [*Alexander R. Todd*] (1907-1997), dobitnik Nobelove nagrade za hemiju 1957. godine.

Važnu kariku u otkriću sekundarne strukture molekula DNK čini i precizna analiza nukleotidnog sastava molekula DNK koju je izvršio Ervin Šargaf [*Erwin Chargaff*] (1905-2002), Austrijski biohemičar sa američkog Kolumbija univerziteta. Primenom tada nove metode – hromatografije na papiru na uzorcima molekula DNK različitog porekla (bakterije, biljke i životinje) Šargaf je otkrio da je količina purina u jednom molekulu DNK jednaka količini pirimidina, kao i da su količine A i T, kao i G i C, međusobno jednake. Svoja istraživanja on je formulisao i matematičkom formulom $A/T=G/C=1$ koja se danas naziva Šargafovo pravilo o zastupljenosti pojedinih nukleotida u molekulu DNK. Vrednost koja varira od vrste do vrste je procenat zastupljenosti nukleotida G i C. Ovo pravilo ukazivalo je da razlike u zastupljenosti baza kod analiziranih vrsta ne odgovaraju njihovim evolutivnim razlikama, što je bio putokaz da specifičnost molekula DNK treba tražiti u primarnoj strukturi, odnosno u redosledu nukleotida.

Rozalin Frenklin

Godine 1952., urađena je i prva difrakciona slika molekula DNK koja je predstavljala osnov za konstruisanje njenog „trodimenzionalnog modela“. Prva slika dobijena difrakcijom X-zraka na kristalima molekula DNK vezana je za naučno-istraživački rad biofizičara Novozelandačinina Moris Hju Frederik Vilkinsa [*Maurice Hugh Frederick Wilkins*](1916-2004). Međutim, u isto vreme i na istom mestu (*King's College*, London), na difrakcionoj analizi molekula DNK radila je i Britanska hemičarka Rozalin Frenklin [*Rosalind Frenklin*] (1920-1958). Pored analize ostalih molekula, Frenklin je kristaloradiografijom analizirala i molekul DNK.

Uz Rozalin Frenklin doprinos postavljanju trodimenzionalnog modela molekula DNK dao je i Rejmond Gosling [*Raymond Gosling*] (1926-2015) koga mnogi smatraju „zaboravljenim herojem DNK“. Kao doktorant Rozalin Frenklin veruje se da je upravo on načinio snimak odnosno difrakcionu sliku molekula DNK čuvenu pod nazivom „Fotografija 51“.

Votson i Krik

U proleće 1951. godine Američki zoolog Džejms Votson susreo se sa Vilkinsom koji mu je, tokom jednog simpozijuma za zoologe, pokazao difrakcione slike molekula DNK. To je mladog Votsona opredelilo da

započne istraživanja hemijske strukture nukleinskih kiselina i proteina. Krajem 1952. godine Votson upozna Britanskog fizičara i biologa Francisa Krika sa kojim započinje zajednički rad na "trodimenzionalnom modelu" molekula DNK. Za samo nekoliko meseci, praveći molekulske modele koji bi odgovarali karakteristikama difrakcione slike molekula DNK, Votson i Krik ustanovili su da se molekul DNK sastoji od dva antiparalelna lanca polinukleotida koji su vezani vodoničnim vezama. Prema njihovom originalnom modelu dvolančane zavojnice, purinske i pirimidinske baze okrenute su ka unutrašnjosti molekula DNK, „naslagane“ jedna na drugu (zbog hidrofobnih sila), dok su fosfatne grupe okrenute ka spoljašnjoj strani. Okosnicu molekula DNK čine molekuli šećera pentoze i fosfati. Kako je prečnik zavojnice jednak celom dužinom molekula, prema purinskoj bazi u jednom lancu nalazi se pirimidinska baza u drugom lancu. Ovakvo kombinovanje baza odgovaralo je i difrakcionoj slici i Šargafovom pravilu o zastupljenosti nukleotida u molekulu DNK. Na osnovu predloženog modela sekundarne strukture molekula DNK Votson i Krik razmišljali su i o načinu replikacije ovog molekula. Tako u svom radu apostrofiraju: „Nije izmaklo našoj pažnji da specifično sparivanje koje smo pretpostavili sugerise i mogući mehanizam kopiranja genetičkog materijala“.

Za svoje otkriće, zajedno sa Vilkinsom, Votson i Krik ravnopravno su podelili Nobelovu nagradu za fiziologiju i medicinu 1962. godine. Otkriće sekundarne strukture molekula DNK i način njegove replikacije svakako je jedno od najvećih naučnih otkrića dvadesetog veka.

Neposredno nakon otkrića sekundarne strukture molekula DNK postavljena je centralna dogma molekularne biologije. Po njoj, nasledne informacije se jednosmerno prenose od nukleinske kiseline ka proteinima, a nikada obrnuto. Na definisanju centralne dogme radio je veći broj naučnika, među njima i sam Krik. Definisanjem ovog pravila (1958. godine) započinje zlatno doba molekularne biologije. Neka od otkrića koja su obeležila prvih pola veka molekularne biologije data su u tabeli 1.

Godina	Naučnici	Otkrića
1954.	Paul C. Zamecnik	Ribozomi
1955.	Joe Hin Tjio	Ćelije čoveka poseduju 46 hromozoma
1956.	P.C. Zamecnik & Hoagland M.B.	Transportne RNK
1957.	Arthur Kornberg	Enzim DNK polimeraza
1958.	M. Meselson & F. Stahl	Semi-konzervativni način replikacije molekula DNK
1961.	S. Brenner i drugi	Uloga iRNK u procesima transkripcije i translacije
1961.	F. Jacob & J. Monod	Genetička kontrola ekspresije enzima kod prokariota
1963.	M. Nirenberg i saradnici	Genetički kod
1965.	Roy John Britten	Repetitivne sekvence molekula DNK
1970.	H.O. Smith i saradnici	Izolovanje prvog restriktionog enzima
1970.	D. Baltimore & H. Temin	Fenomen reverzne transkripcije
1971.	Paul Berg	Rekombinovani molekul DNK
1972.	S. Cohen & H. Boyer	Rekombinovani gen
1974.	R. Roberts & P. Sharp	Geni se sastoje iz egzona i introna
1974.	Roger Kornberg	Struktura i funkcija hromatina
1980.	Leland Hartwell	Regulacija ćelijskog ciklusa
1982.	Kary Mullis	Lančana rekacija polimeraze
1996.	Ian Wilmutu	Kloniranje životinja
1998.	A. Fire & C. Mello	RNK interferencija

Tabela 1. Otkrića koja su obeležila prvih pola veka molekularne biologije

Genomika

Genomika je naučna oblast koja je nastala kao rezultat dostignuća molekularne biologije i razvoja tehnika kojima je moguće odrediti redosled nukleotida u molekulima nukleinskih kiselina. Naziv genomika nastao je dodavanjem sufiksa *-omika* koji je starogrčkog porekla i znači sve, svako, potpuno, kompletno. Predmet istraživanja genomike su, pre svega, genomi, odnosno molekuli DNK pojedinačnih vrsta. Istraživanja genomike su po svojoj prirodi multidisciplinarna i obuhvataju: određivanje primarne strukture genoma; utvrđivanje broja i strukture gena; ispitivanje profila ekspresije gena; i određivanje strukture i funkcije proteina.

Prvo uspešno sekvenciranje molekula DNK izvršio je dvostruki dobitnik Nobelove nagrade Frederik Sanger [*Frederick Sanger*] (1918-2013). Godine 1975., Sanger je konstituisao prvu metodu za sekvenciranje molekula DNK. Ova metoda naziva se metoda prekida sinteze lanaca (eng. *chain termination method*), a poznata je i kao „dideoksi“ („*dideoxy*“) metoda. Njenim korišćenjem, Sanger je 1977. godine sekvencirao molekul DNK bakteriofaga Ø X174, dužine od 5.386 nukleotida. Otkriće termostabilnih DNK polimeraza i metode lančane reakcije polimeraze (eng. *Polymerase chain reaction*, PCR) dovelo je do modifikacije Sangerove metode sekvenciranja. Modifikovana metoda nazvana je metoda sekvenciranja u ponovljenim ciklusima (eng. *thermal cycling sequencing*). Uvođenje fluorescentnih obeleživača i njihov sistem detekcije omogućio je automatizaciju očitavanja sekvence molekula DNK u aparatima koji su nazvani automatski sekvenatori. Automatski sekvenator konstruisao je Američki biolog Kalifornijskog instituta za tehnologiju Lerou Hud [*Leroy Hood*] (r.1938) 1986. godine.

Projekat „Genom čoveka“ (eng. *Human Genome Project*, HGP) za cilj je imao utvrđivanje redosleda nukleotida u molekulu DNK čoveka. HGP obuhvata i identifikaciju (anotaciju) gena, određivanje njihove strukture i funkcije. Ideju za dešifrovanje genoma čoveka potekla je iz Američkog Ministarstva za energiju, 1985. godine. Tri godine kasnije, osnovan je Američki nacionalni centar za istraživanje humanog genoma (eng. *National Center for Human Genome Research*, NCHGR). Tih godina procenjivalo se da genom čoveka sadrži oko 100.000 gena za proteine. Na osnovu te pretpostavke, bilo je planirano da za vremenski period od 15 godina sa budžetom od 3 milijarde američkih dolara, naučnici NCHGR izvrše kompletno „iščitavanje“ genoma čoveka. Kao datum zvaničnog početka rada na mapiranju genoma čoveka uzima se oktobar 1990. godine. Uključivanjem naučnih instituta iz Evropske Unije, Kine, Japana, Australije i drugih zemalja projekat postaje međunarodni. Za koordinisanje rada tako velikog broja institucija formirana je i internacionalna Organizacija za humani genom poznata po svojoj skraćenici HUGO (eng. *Human Genome Organization*, HUGO), a kasnije i konzorcijum projekta genom čoveka (HGP konzorcijum).

Jedan od osnivača i rukovodioca NCHGR-a bio je Kreg Venter [*Craig Venter*] (r.1946). Usled nesuglasica oko metodologije sekvenciranja, Venter napušta NCHGR i osniva privatni Institut za istraživanje genoma (eng. *The Institute for Genomic Research*, TIGR), a zatim i privatnu kompaniju *Celera Genomics* 1998. godine (na latinskom jeziku, *celera* znači brzina). Naučnici ovog instituta uspevaju da za manje od šest meseci sekvenciraju prvi genom izolovan iz živog organizma. Bio je to genom bakterije *Haemophilus influenzae*.

Nakon objavljivanja sekvence prvog prokariotskog genoma započinje jedna od najuzbudljivijih trka u istoriji nauke. Cilj trke bilo je očitavanje kompletne sekvence genoma čoveka, a vodili su je naučnici konzorcijuma NCHGR-a i privatne kompanije *Celera Genomics*. Vreme na prelazu između dva veka obeleženo je završetkom sekvenciranja pojedinačnih hromozoma čoveka. Godine 1999. NCHGR objavljuje kompletnu sekvencu prvog hromozoma čoveka. Bio je to hromozom 22.

Internationalni HGP konzorcijum za mapiranje genoma čoveka rezultate svoga rada objavljuje 15. februara 2001. godine u časopisu „*Nature*“. Samo dan kasnije tim naučnika kompanije *Celera Genomics* objavljuje

svoje rezultate dešifrovanja genoma čoveka u časopisu „*Science*“. Aprila 2003. godine dobijena je kompletna sekvenca genoma čoveka, dok je broj gena utvrđen oktobra 2004. godine. Tada se taj broj procenjivao na oko 30.000 gena za proteine. Danas se procenjuje da genom čoveka poseduje nešto manje od 20.000 gena za proteine.

Genomika se danas deli na strukturnu i funkcionalnu genomiku. Strukturna genomika predstavlja genomiku u užem smislu i za predmet istraživanja ima sekvenciranje molekula DNK tj. dešifrovanje genoma, identifikaciju gena i ostalih funkcionalnih elemenata genoma. Funkcionalna genomika podrazumeva analizu gena od njihove identifikacije, strukture i obrasca ekspresije. Analiza proteina prerasla je u posebnu naučnu disciplinu koja se analogno genomici naziva proteomika.

Budućnost molekularne biologije i genomike

Budućnost genomike je u primeni njenih dostignuća u drugim prirodnim naukama kao što je agronomija (agrogenomika), farmakologija (farmakogenomika), a naročito medicina (genomska medicina, personalna medicina ili translaciona medicina). Glavna ideja genomske medicine je njena personalizacija odnosno molekularno-biološka dijagnostika bolesti kod svakog bolesnika ponaosob kao i razviće biološke terapije koja bi takođe bila individualizovana. Pored naziva genomska ili personalna medicina, u upotrebi je i izraz translaciona medicina. Ovim izrazom se sugerise primena (prenos, translacija) saznanja molekularne biologije i genomike u savremenoj medicini.

Saznanja genomike imaju značajnu primenu i u tehničkim naukama kao što je npr. robotika. Nukleinske kiseline sa svojim fizičko-hemijskim svojstvima postaju važni gradivni blokovi u okviru nanotehnologije kao molekuli za asembliranje molekularnih nanostrukture kao i materijal za izgradnju „nanomašina“. Naročito se radi na razvijanju molekularnih motora, molekularne robotike i na primeni nanouređaja u biologiji.

U toku je dešifrovanje milijardi i milijardi baznih parova genoma desetine hiljada vrsta. Svi podaci koji se tiču sekvenci genoma koje su meta dešifrovanja objedinjuju se u jednu bazu podataka poznatu pod nazivom GOLD (eng. *Genomes OnLine Database*, GOLD) koja se nalazi na adresi <http://www.genomesonline.org>. Na osnovu podataka o sekvencama do sada iščitanih genoma, veliki broj naučnih institucija bavi se upoređivanjem genoma različitih vrsta. To je predmet nove naučne discipline koja se naziva komparativna genomika. Utvrđivanje zajedničkih karakteristika koje se odnose na grupu genoma, komparativna genomika ima ulogu i u utvrđivanju porekla različitosti živog sveta. Poslednji segment genomike je istraživanje evolucije genoma (evolucionarna genomika).

Sadašnjost i budućnost genomike neraskidivo je vezana za sekvenciranje genoma primenom tehnologije nove generacije sekvenciranja (eng. *Next Generation Sequencing*, NGS). Brojni timovi naučnika danas su angažovani na projektu poznatom pod akronimom ENCODE (eng. *The Encyclopedia of DNA Elements*, ENCODE). Cilj ovog projekta je registrovanje svih funkcionalnih elemenata genoma čoveka a to su segmenti genoma koji kodiraju za definisani produkt (RNK i/ili protein) i elementi genoma koji pokazuju „*reproducible biochemical signature*“ odnosno sekvence za vezivanje proteina ili sekvence odgovorne za formiranje specifičnih struktura hromatina. Prvi rezultati ovog projekta pokazuju da genom čoveka poseduje blizu 400.000 regiona koji po svojim karakteristikama odgovaraju pojačivačima i preko 70.000 regiona koji po svojim karakteristikama odgovaraju promotorima. Do sada je u genomu čoveka identifikovano 2.900.000 hipersenzitivna mesta Dnaze I što znači da je toliki broj sekvenci u genomu čoveka za koje se potencijalno mogu vezati DNK vezivni proteini. Krajnji cilj ENCODE je utvrđivanje obrasca ekspresije genoma u svim tipovima ćelija čoveka i to u svim fazama razvića.

Zaključak

Nije mali broj naučnika koji 21. vek definišu kao genomsku eru u razvoju čovečanstva čiji su civilizacijski dometi danas teško shvatljivi i predvidljivi. Bez sumnje, ono što je otkriće elektrona bilo za 20. vek to su otkrića genomike za 21. vek. Kada su prirodne nauke u pitanju, naučnici veruju da će genomika biti od velike pomoći u vekovnoj borbi ljudi protiv starosti i neizlečivih bolesti. Rezultanta svih napora je jednostavna, za neke prozaična, ali svakako ljudska. To je da se životni vek ljudi produži. Takve težnje su neraskidivo vezane i za pronalaženje odgovora na „pitanje svih pitanja“, a koje se tiče porekla života na Zemlji.

LITERATURA

1. Attar N. Raymond Gosling: the man who crystallized genes. *Genome Biol.* 2013; 14(4):402.
2. Avery OT, Macleod CM, McCarty M. STUDIES ON THE CHEMICAL NATURE OF THE SUBSTANCE INDUCING TRANSFORMATION OF PNEUMOCOCCAL TYPES : INDUCTION OF TRANSFORMATION BY A DESOXYRIBONUCLEIC ACID FRACTION ISOLATED FROM PNEUMOCOCCUS TYPE III. *J Exp Med.* 1944;79(2):137-58.
3. Brajušković G, Pavićević DS, Romac S. The 60th anniversary of the discovery of DNA secondary structure. *Vojnosanit Pregl.* 2013; 70(12):1165-70.
4. Brajušković G. [140 years of genetics]. *Vojnosanit Pregl.* 2006; 63(5):509-12.
5. Brajušković G. [DNA: 50 years' of the double helix]. *Vojnosanit Pregl.* 2003; 60(6):763-6.
6. Brajušković G. [Genomics]. *Vojnosanit Pregl.* 2006; 63(6):604-10.
7. Brajušković G. Genomics. In: Brajušković G, editor. *Molecular biology 2*. Belgrade: Savremena administracija; 2012. p. 203-36. (Serbian) ISBN 978-86-387-0803-1.
8. Brajušković G. History of Molecular Biology. In: Brajušković G, editor. *Molecular Biology 2*. Belgrade: Savremena administracija; 2012. p. 237-60. (Serbian) ISBN 978-86-387-0803-1.
9. Brajušković G. *Molecular Genetics*. Belgrade: University of Belgrade, Faculty of Biology. 2010. (Serbian) ISBN 978-86-7078-063-7.
10. Cheung VG, Nowak N, Jang W, Kirsch IR, Zhao S, Chen XN, et al. Integration of cytogenetic landmarks into the draft sequence of the human genome. *Nature.* 2001; 409(6822):953-8.
11. Franklin RE, Gosling RG. Evidence for 2-chain helix in crystalline structure of sodium deoxyribonucleate. *Nature.* 1953; 172(4369):156-7.
12. International Human Genome Sequencing Consortium. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature.* 2004; 431(7011):931-45.
13. Krishnan Y, Simmel FC. Nucleic acid based molecular devices. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2011; 50(14):3124-56.
14. Mandić T. [Photograph 51]. Available at URL: <https://hocupozoriste.rs/predstave/fotografija-51>. (Serbian). Viewed 06/27/2023.
15. Rosenfeld JA. Rosalind Franklin: The Dark Lady of DNA. *BMJ.* 2003; 326(7383):289.
16. Savić A. The nucleic acids. In: Savić A, editor. *The basic of molecular biology*. Beograd: Biološki fakultet; 1989. p. 12-7. (in Serbian)
17. Savić-Pavićević D, Matić G. *Molekular biology 1*. Belgrade: NNK International. 2011. (Serbian) ISBN 978-86-6157-001-8-
18. Stevanović M, ed. [Genes and Genome]. Belgrade: Serbian Academy of Sciences and Arts. 2016. (Serbian)
19. Stevanović M. [Genetic Manipulation]. Belgrade: University of Belgrade-Faculty of Biology. 2016. (Serbian)
20. Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, et al. The sequence of the human genome. *Science.* 2001; 291(5507):1304-51.
21. Watson JD, Crick FH. Molecular structure of nucleic acids: A structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* 1953; 171(4356): 737-8.
22. Watson JD. *The Double Helix. A Personal Account of the Discovery of the Structure of DNA*. New York: W. W. Norton and Company; 1980.
23. Wilkins MH, Stokes AR, Wilson HR. Molecular structure of deoxypentose nucleic acids. *Nature.* 1953; 171(4356):738-40.

Na marginama nauke

- U organizaciji Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo Univerziteta u Beogradu (IMGGI) i Srpskog društva za molekularnu biologiju, i u našoj zemlji se tradicionalno obeležava Dan molekula DNK, ciklusima naučno-popularnih predavanja u prostorijama Biblioteke grada Beograda.
- Kao kuriozitet ostaje činjenica da su istraživači IMGGI-a 21. septembra 2011. godine napravili u Beogradu, na Trgu republike, origami model DNK lanca dužine od 247,44 metara, nastojeći da ostvare uslov za ulazak u Ginisovu [Guinness] knjigu rekorda.
- Frederik Grifit, strastveni istraživač nukleinskih kiselina kao nosilaca naslednih osobina, poginuo je u svojoj laboratoriji tokom nacističkog bombardovanja Londona na početku Drugog svetskog rata.
- U vreme kada su rađeni eksperimenti na bakteriofagu T2, Marta Čejs bila je student doktorskih studija. Alfred Herši je bio jedan od dobitnika Nobelove nagrade za fiziologiju i medicinu 1969. godine. Među laureatima nije bilo mesta za Martu Čejs. Nažalost, ovo nije jedini slučaj da su naučnice zaslužne za razvoj molekularne biologije bile neopravdano zapostavljene i marginalizovane.
- Sa rezultatima svog dugogodišnjeg istraživanja strukture molekula DNK Šargaf je neposredno upoznao i srpsku naučnu javnost na predavanju koje je održao u Srpskoj akademiji nauka i umetnosti 22. juna 1970. godine.
- Rozalin Frenklin je feministička ikona 20. veka. Moris Hju Frederik Vilkinsa i Rozalin su radili zajedno na difrakcionoj analizi molekula DNK. Autonomija u radu Rozalin Frenklin nije bila dobro prihvaćena i bila je povod razvoja animoziteta između dvoje naučnika. I pored ličnih snimaka, Vilkins je, bez znanja i saglasnosti, precizne snimke molekula DNK koje je načinila Rozalin Franklin prezentovao paralelno sa svojim. Rozalin Frenklin nikada nije doživela punu satisfakciju za doprinos u otkriću sekundarne strukture molekula DNK. Umrle je u 37. godini života od maligne bolesti. Sasvim je izvesno da se Rozalin Frenklin od maligne bolesti razbolela usled kontinuiranog zračenja X-zracima tokom svog naučnog rada. Kako se Nobelova nagrada ne dodeljuje posthumno, šira javnost dugu niz godina nije bila upoznata sa doprinosom Rozalin Frenklin u otkriću sekundarne strukture molekula DNK. Šezdesetih godina prošlog veka u Severnoj Americi i Evropi jača feministički pokret. Nakon objavljivanja biografije, Rozalin Frenklin postaje jedna od prvih ikona ovog pokreta i to kao simbol degradirajućeg položaja žene u društvu i njihove borbe protiv sveprisutnog seksizma i mačizma. Sam Votson zjurao je komentarisao Rozalin Frenklin kao neuglednu ženu kojoj nedostaje ukusa za šminku i garderobu i kao osobu potpuno nesposobnu da na pravi način prezentuje rezultate svog naučnog rada. U svojoj autobiografiji, Votson je naziva pežorativnim nadimkom Rozi koji ona nikada nije imala. Odnos Vilkinsa, Votsona i Krika prema Rozalin Frenklin bio je motiv Američkoj spisateljici Eni Zigled [Anna Ziegler] (r.1979) da napiše pozorišni komad „Fotografija 51“. Komad predstavlja imaginarno suđenje trojici nobelovaca zbog njihovog odnosa prema Rozalin Frenklin. Na svetskoj premijeri u Londonu, 2015. godine ulogu Rozalin Frenklin igrala je jedna od najpoznatijih glumica današnjice, australijska oskarovka Nikol Kidman [Nicole Kidman] (r.1967). Dve godine kasnije, rediteljka Tara Manić (r.1979) postavlja ovaj komad na pozornicu Teatra Vuk u Beogradu sa Natašom Tapušковиć (r.1975) u naslovnoj ulozi.
- Votson je u vreme otkrića sekundarne strukture molekula DNK imao 25 godina, a Nobelovu nagradu dobio je u svojoj 34. godini. Votson je i danas nesumnjivo jedan od najvećih živih autoriteta molekularne biologije. Nažalost, poslednjih godina ugled mu je trajno narušio zbog neprimerenih izjava. Jedna od njegovih najkontroverznijih izjava ticala se inteligencije tamnoputih ljudi koja je sasvim opravdano ocenjena kao krajnje rasistička i neprihvatljiva.

- Nobelova medalja Džejmisa Votsona prodana je za 4,75 miliona dolara na aukciji u Njujorku 4. decembra 2014. godine koju je organizovala aukcijska kuća Kristi [*Christie*]. Medalja je od 23-karatnog zlata, prečnika 6,6 centimetara, na kojoj je ugraviran profil Alfreda Nobela [*Alfred Nobel*] (1833-1896). To je bila prva prodaja Nobelove medalje za života dobitnika. Pre aukcije Votson je izjavio da medalju prodaje da bi prikupio sredstva za laboratoriju, "*Cold Spring Harbor*" na Long Ajlendu koja mu je ukinula gostoprimstvo 2007. godine. Kupac, ruski milijarder Ališer Usmanov [*Alisher Usmonov*] (r.1952), medalju je vratio vlasniku i tom prilikom izjavio da je Votson jedan od najznačajnijih biologa sveta i da Nobelova nagrada za otkriće strukture molekula DNK može i mora pripadati samo njemu. Na istoj aukciji, prodana je i rukom ispisana beleška govora koji je Votson održao na banketu povodom dodele nagrade i to za 365.000 dolara (www.rts.rs).
- Jednu od najzbudljivijih trka u istoriji nauke čiji je cilj bio očitavanje kompletne sekvence genoma čoveka, vodili su naučnici konzorcijuma NCHGR-a i privatne kompanije *Celera Genomics*. Kako se posao bližio kraju, rivalitet je postajao sve otvoreniji. Dokazivanja o prednosti jedne ili druge strategije iščitavanja genoma postaju tema brojnih naučnih, ali i društvenih rasprava. Sukob dva tima sa dve različite koncepcije rada i međusobna osporavanja pretila su da ugroze čitav projekat. U takvim okolnostima intervenisao je tadašnji američki predsednik Bil Klinton [*Bill Clinton*] (r.1946). U Istočnoj sobi Bele kuće, predsednik Klinton organizuje sastanak čelnika oba tima 26. juna 2000. godine. Tom prilikom je dogovorena razmena dobijenih rezultata u „iščitavanju“ genoma čoveka.

**NOBELOVA NAGRADA ZA FIZIOLOGIJU
I MEDICINU 2022:
GENOMIKA STARIH HUMANIH POPULACIJA
I EVOLUCIJA**

**THE NOBEL PRIZE IN PHYSIOLOGY
OR MEDICINE 2022:
GENOMES OF EXTINCT HOMININS
AND HUMAN EVOLUTION**



Varijabilnost mitohondrijskog genskog pula stanovnika Republike Srbije

Slobodan Davidović¹, Jelena M. Aleksić², Milena Stevanović^{2,3,4} i Nataša Kovačević Grujić²

¹ Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“, Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerzitet u Beogradu

² Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Univerzitet u Beogradu

³ Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

⁴ Srpska akademija nauka i umetnosti, Beograd

Kontakt: natasakovacevic@imgge.bg.ac.rs

Apstrakt

Mitohondrijska DNK (mtDNK) se odlikuje nizom osobina koje je čine pogodnom za istraživanja evolutivne istorije ljudskih populacija koja se zasniva na molekularnim markerima ženske linije nasleđivanja. Tokom poslednje decenije publikovano je više naučnih radova u kojima je analizirana varijabilnost mtDNK u populaciji Srbije primenom markera različite rezolucije uključujući i kompletne genome. U skladu sa očekivanjima zasnovanim na istorijskim, arheološkim i drugim izvorima koji govore u prilog veoma kompleksne istorije populacija na Balkanskom poluostrvu, mtDNK podaci su potvrdili da se srpska populacija odlikuje visokim nivoom raznovrsnosti mtDNK koji je posledica izuzetno složene dinamike ove populacije tokom vremena. Današnji mtDNK profil populacije Srbije ne odstupa od matrilinealnog profila karakterističnog za druge evropske populacije, a genetičke distance pokazuju da ova populacija zauzima centralnu poziciju unutar grupe južnoslovenskih populacija koje se odlikuju visokom heterogenošću. Srpska populacija deli najveći procenat mtDNK haplotipova sa geografski bliskim populacijama Balkanskog poluostrva koje pripadaju južnoslovenskoj grupi, gde su uočeni i potencijalno privatni haplotipovi. Na osnovu filogenetske i filogeografske analize kompletnih mitogenoma u srpskoj populaciji detektovane su retke mtDNK linije, karakteristične za druge regione, poput Bliskog istoka (N1b, HV2), istočne Azije (D4) i Afrike (L2a1), kao i one koje su potencijalno specifične za Balkansko poluostrvo, poput K1a13a1, U4c1b1 i H6a2b. Pored toga, srpska populacija deli određeni broj mtDNK podhaplogrupa sa istočno- i zapadnoslovenskim populacijama kao i sa germanskim populacijama severne i srednje Evrope. Istraživanja varijabilnosti mtDNK su pokazala da se izuzetno velika raznovrsnost mtDNK savremene populacije Srbije može objasniti genetičkim doprinosom kako slovenskih i germanskih, tako i pre-slovenskih populacija koje su naseljavale Balkansko poluostrvo pre Velike seobe naroda.

Ključne reči: mitohondrijska DNK, populacija Srbije, genetički diverzitet, migracije

Mitochondrial gene pool variability of the residents of the Republic of Serbia

Slobodan Davidović¹, Jelena M. Aleksić², Milena Stevanović^{2,3,4}, Nataša Kovačević Grujičić²

¹ Institute for Biological Research "Siniša Stanković", National Institute of Republic of Serbia, University of Belgrade

² Institute of Molecular Genetics and Genetic Engineering, University of Belgrade

³ Faculty of Biology, University of Belgrade

⁴ Serbian Academy of Sciences and Arts, Belgrade

Correspondence: natasakovacevic@imgge.bg.ac.rs

Abstract

The mitochondrial DNA (mtDNA) is characterized by a number of features that make it suitable for studying the evolutionary history of human populations based on molecular markers with the female-specific line of inheritance. During the last decade, several scientific papers were published in which the mtDNA variability in the population of Serbia was analyzed using markers of different resolution including complete mitogenomes. In accordance with expectations based on historical, archaeological and other sources that speak in favor of a very complex history of populations on the Balkan Peninsula, mtDNA data confirmed that Serbian population is characterized by a high level of mtDNA diversity, which is a consequence of the exceptionally complex dynamics of this population over time. Today's mtDNA profile of the Serbian population does not differ from the matrilineal landscape characteristic of other European populations, and according to genetic distances, this population occupies a central position within the group of South-Slavic populations characterized by high heterogeneity. The Serbian population shares the highest percentage of mtDNA haplotypes with the geographically close populations of the Balkan Peninsula belonging to the South-Slavic group, where potentially private haplotypes were also observed. Phylogenetic and phylogeographic analysis of complete mitogenomes in the Serbian population revealed rare mtDNA lineages, characteristic of other regions, such as the Middle East (N1b, HV2), East Asia (D4) and Africa (L2a1), as well as those that are potentially specific for Balkan Peninsula, like K1a13a1, U4c1b1 and H6a2b. In addition, Serbian population shares a certain number of mtDNA subhaplogroups with East- and West-Slavic populations as well as with the Germanic populations of Northern and Central Europe. Studies of mtDNA variability have shown that the exceptionally high mtDNA diversity in contemporary Serbian population may be associated with the genetic contribution of both Slavic and Germanic, as well as pre-Slavic populations that inhabited the Balkan Peninsula before the Great Migration.

Keywords: mitochondrial DNA, Serbian population, genetic diversity, migrations

MOLEKULARNA ANTROPOLOGIJA

Prva istraživanja varijabilnosti ljudskih populacija zasnivala su se na ispitivanju varijabilnosti krvnih grupa, i proteina glavnog histokompatibilnog kompleksa [1]. Sa razvojem tehnologija i uvođenja novih metoda u molekularnoj biologiji tokom druge polovine prošlog veka, poput lančane reakcije polimeraze (eng. Polymerase Chain Reaction- PCR) i Sangerove metode sekvenciranja, istraživanja varijabilnosti na nivou molekula DNK postaju nezamenljiva u novoj naučnoj disciplini - molekularnoj antropologiji [2]. Za te svrhe, informativna je varijabilnost autozomnih hromozoma koji se nasleđuju biparentalno te stoga omogućavaju sticanje uvida u poreklo i istoriju kako muškog tako i ženskog dela ljudske populacije, ali i varijabilnost haploidnih genoma koji se nasleđuju isključivo preko majke, kao što je to slučaj sa mitohondrijskom DNK (mtDNK), ili preko oca, u slučaju Y hromozoma (tzv. ne-rekombinantni deo Y hromozoma, NRY). Haploidni genomi se koriste za utvrđivanje evolutivne istorije majčinskih odnosno očinskih linija, a bez obzira na način nasleđivanja, svi genetički markeri koji se koriste u istraživanjima ovog tipa odlikuju se selektivnom neutralnošću [3].

Dalji razvoj tehnologija i metoda u molekularnoj biologiji, poput sekvenciranja naredne generacije, kao i sve veća finansijska pristupačnost novih metoda, omogućili su korišćenje varijabilnosti kompletnih genoma u istraživanjima porekla i istorije ljudske populacije naročito tokom poslednje decenije. Pored toga, veliki napredak postignut je i na polju poboljšanja metoda izolacije naslednog materijala iz drevnih ostataka ljudskih skeleta iz arheoloških nalazišta starih nekoliko stotina do nekoliko hiljada godina, a čija se starost može pouzdano utvrditi primenom metoda C^{14} datiranja, kao i pratećih analitičkih (bioinformatičkih) metoda, što je značajno doprinelo boljem razumevanju veoma kompleksne evolutivne istorije savremenog čoveka koju karakterišu brojna mešanja (admiksije) i protok gena, migracije i promene brojnosti. U vezi sa tim, Nobelova nagrada u oblasti medicine i fiziologije dodeljena je 2022. godine dr. Svante Pääbo-u, koji je svoju naučnu karijeru posvetio istraživanjima evolucije čoveka i izumrlih hominina, prevashodno neandertalca, bliskog srodnika anatomske modernog čoveka, sa kojim evroazijske populacije dele od 1 - 4% naslednog materijala [4]. Stoga je sasvim izvesno da će predstojeće godine predstavljati veoma aktivan i produktivan period u pogledu boljeg razumevanja ne samo naše istorije već i adaptivnih svojstava savremenog čoveka.

MITOHONDRIJSKA DNK KAO GENETIČKI MARKER

Mitohondrijska DNK je molekul dvolančane kružne strukture koji postoji u svim ćelijama eukariota, i to u mitohondrijama u kojima se odvija proces oksidativne fosforilacije. Mitohondrijski genom čoveka (mitogenom) je veličine 16.569 baznih parova [5] i sadrži dva regiona: kodirajući region i kontrolni region koji ima regulatornu ulogu. Kodirajući region sadrži 37 gena koji kodiraju 13 subjedinica sistema oksidativne fosforilacije, dve ribozomalne RNK i 22 transportne RNK [5]. Kontrolni region sadrži promotore odgovorne za transkripciju gena i u okviru njega prisutna su tri segmenta povećanog nivoa varijabilnosti u odnosu na kodirajući region, hipervarijabilni segmenti označeni kao HVS-I, HVS-II i HVS-III. MtDNK se odlikuje nizom osobina, kao što su maternalni tip nasleđivanja, veliki broj kopija po ćeliji, odsustvo rekombinacija, manja efektivna veličina populacije i 5 do 10 puta viša stopa mutacija u odnosu na jedarni genom [6], koje je čine izuzetno pogodnim markerom za populaciono-genetičke, filogeografske i filogenetske studije [7].

Mitohondrijski genom zauzima izuzetno značajno mesto u istraživanjima porekla i istorije ljudske populacije. Naime, upravo su pionirska istraživanja varijabilnosti mtDNK savremenog čoveka dovela do saznanja da je poslednji zajednički predak celokupne današnje ljudske populacije živio u Africi pre oko 200 hiljada godina [8]. Prva istraživanja ovog tipa koristila su metodu razlike u veličini restrikcionih fragmenata

(eng. restriction fragment length polymorphism- RFLP) za detekciju varijacija u pojedinačnim nukleotidima u molekulu mtDNK [8, 9]. Tokom 90-tih godina XX veka, sa otkrićem PCR-a i sekvenciranja Sangerovom metodom, istraživanja varijabilnosti mtDNK ljudskih populacija su se predominantno zasnivala na sekvenciranju HVS-I segmenta i RFLP analizi fragmenata kodirajućeg regiona umnoženih PCR metodom [10], dok se poslednjih decenija sve češće koriste kompletni mitogenomi [11, 12].

Mitohondrijski genomi se porede sa referentnom sekvencom, prvom kompletno sekvenciranom mtDNK objavljenom 1981. godine [5] i revidiranom skoro dve decenije kasnije [13] (eng. revised Cambridge Reference Sequence- rCRS), a u poslednjoj deceniji i sa rekonstruisanom predačkom referentnom sekvencom (eng. Reconstructed Sapiens Reference Sequence- RSRS) [14]. Na taj način definišu se mtDNK haplotipovi koji predstavljaju kombinaciju genetičkih varijanti različitih u odnosu na referentnu sekvencu. Haplotipovi koji se odlikuju istim varijantama na pojedinim nukleotidnim pozicijama, koje su uglavnom u kodirajućem regionu mtDNK, svrstavaju se u odgovarajuće mtDNK haplogrupe.

Tradicionalno, istraživanja ljudskih populacija na nivou mtDNK baziraju se na analizama učestalosti haplotipova i haplogrupa, koje su danas uglavnom poznate za ljudske populacije iz skoro svih delova sveta. Determinacija starosti haplogrupa i haplotipova obavlja se korišćenjem metode molekulskog sata prema kojem je broj razlika između dve linije direktni pokazatelj vremena njihovog odvajanja od poslednjeg zajedničkog pretka [15]. U filogenetskim rekonstrukcijama i proceni odvajanja mtDNK linija od poslednjeg zajedničkog pretka koriste se različiti molekulski satovi koji se zasnivaju na stopi mutacija u kodirajućem regionu mtDNK [16], zatim na stopi sinonimnih mutacija u mtDNK [17], kao i onaj koji uzima u obzir stopu mutacija u kompletnom mitogenomu [17]. Topologija i procena starosti klada u filogenetskim stablima zasnovanim na mtDNK haplotipovima i haplogrupama, zajedno sa informacijama o njihovoj učestalosti, reflektuju matri-linealnu istoriju ljudskih populacija i koriste se za utvrđivanje migracionih ruta, admiksije, protoka gena i dinamike populacija. Takođe, utvrđivanje prisustva i učestalosti mtDNK haplotipova i haplogrupa u ljudskim populacijama našlo je primenu i u forenzici, koja danas raspolaže bazom podataka EMPOP [The EDNAP (European DNA Profiling Group) Mitochondrial DNA Population Database] [18], u kojoj je trenutno deponovano 48.572 mtDNK haplotipa detektovanih kod individua iz celog sveta determinisanih na osnovu varijabilnosti bar HVS-I segmenta kontrolnog regiona, kao i 4.289 kompletno sekvenciranih mitogenoma (<https://empop.online/>).

ULOGA BALKANSKOG POLUOSTRVA U OBLIKOVANJU MITOHONDRIJSKOG GENSKOG PULA EVROPSKIH POPULACIJA

Na osnovu mtDNK podataka deponovanih u javno dostupnoj bazi MITOMAP (<http://www.mitomap.org>) [19, 20], rekonstruisani su vremenski okviri nastanka glavnih mtDNK haplogrupa kao i putevi migracija anatomske savremenih ljudi i naseljavanja različitih kontinenata [21] (**Slika 1**). Poznato je da je u Africi pre oko 130-200 hiljada godina nastala superhaplogrupa L, od čije grane L3 su potekle mtDNK linije M i N najverovatnije tokom ili nakon izlaska iz Afrike [22]. Procenjeno vreme migracija ovih linija iz Afrike je pre oko 65 hiljada godina, a nakon toga su nosioci linija M i N kolonizovali ostale kontinente, što je bilo praćeno njihovom diverzifikacijom. Nosioci superhaplogrupe M su se preko Arabijskog poluostrva, Indije i obala jugoistočne Azije proširili do Malezijskog poluostrva i Australije gde su formirane haplogrupe Q i M42. S druge strane, superhaplogrupa N se proširila po Aziji dajući niz mtDNK grana karakterističnih za srednju i istočnu Aziju (haplogrupe C, D i G i linije koji pripadaju haplogrupi M). Osnivači superhaplogrupe N su se iz Afrike proširili preko jugoistočne Azije do Australije gde je nastala haplogrupa S, a tokom migracija po azijskom kontinentu nastale su i azijske haplogrupe A i Y. Drugi pravac migracija omogućio je širenje superhaplo-

grupe N po zapadnoj Evroaziji tokom čega su nastale haplogrupe I, W i X koje su se proširile Evropom kao i superhaplogrupa R koja je osnivač većine zapadno-evroazijskih mtDNK linija. Superhaplogrupa R se proširila po Evropi dajući evropske haplogrupe H, V, U, Uk, J, i T dok su usled njenog širenja u drugom pravcu, odnosno po Aziji, nastale istočnoazijske haplogrupe F i B, kao i australijska haplogrupa P.

Kao rezultat veoma kompleksne istorije ljudskih populacija, danas su u Evropi prisutne mtDNK haplogrupe H, V, U, K, J, T, W, I i X od kojih haplogrupa H dominira, čineći skoro polovinu mitohondrijskog genskog pula većine evropskih populacija [2, 23]. Pored njih, na evropskom kontinentu zastupljene su sa niskom učestalošću (pod)haplogrupe N1a, N1b, R0a i HV [24-26], kao i neevropske haplogrupe poput pojedinih mtDNK linija haplogrupa A, C, D, G i L [27-29].

Smatra se da su u oblikovanju današnjeg spektra i učestalosti mtDNK haplogrupa na evropskom kontinentu u najvećoj meri uticala tri činioca, tokom kojih je Balkansko poluostrvo, koje zauzima specifičan geografski položaj na jugoistočnom delu evropskog kontinenta, imalo veoma važnu ulogu. Naime, Balkansko poluostrvo predstavlja važan koridor koji povezuje Evropu i Aziju, preko koga su se odvijale brojne migracije od praistorije do današnjih dana [30-32], te se stoga ovo područje smatra izuzetno važnim sa aspekta celokupne istorije ljudskih populacija u Evropi.

Prvi činilac značajan za oblikovanje mtDNK genskog pula evropskih populacija je poslednji ledeni maksimum koji obuhvata period od pre 20 do 26 hiljada godina, kada je Balkansko poluostrvo zajedno sa Apeninskim i Pirinejskim poluostrvom i oblastima oko Crnog mora na teritoriji današnje Ukrajine služilo kao pribežište (refugijum) u kojem su opstale termofilne biljne i životinjske vrste zajedno sa ljudskom vrstom [33-35]. Sa povlačenjem ledenog pokrivača odvijala se postglacijalna rekolonizacija Evrope iz južnih refugijuma, što je dovelo do značajnih promena u brojnosti ljudskih populacija i promena u njihovoj genetičkoj strukturi, odnosno učestalostima različitih genetičkih varijanti uključujući i mtDNK linije.

Zatim, usled širenja poljoprivrede, odnosno prelaska sa lovačko-sakupljačkog na sedentarni način života tokom neolita, dolazi do demografskog rasta ljudskih populacija. Balkansko poluostrvo predstavljalo je važan koridor preko koga su se poljoprivreda, kao nova tehnologija, i prateći način života proširili Evropom [36]. Sa Balkanskog poluostrva poljoprivreda se dolinom Dunava širila u srednju Evropu, a mediteranskom rutom, prateći obalu, proširila se do Pirinejskog poluostrva [36, 37]. Smatra se da je neolitska tranzicija dovela do značajne promene u strukturi genskog fonda savremenih evropskih populacija [38, 39]. Kod lovačko-sakupljačkih društava Evrope najčešće su detektovani haplotipovi koji pripadaju podhaplogrupama U4 i U5 [40-43], dok su danas na evropskom kontinentu najzastupljenije brojne mtDNK linije koje pripadaju haplogrupi H. Pored haplogrupe H, u Evropi je tokom neolitske tranzicije došlo do povećanja učestalosti (pod)haplogrupa takozvanog "neolitskog paketa" – N1a, T2, K, J, HV, V, W i X, koji je bio karakterističan za neolitske farmere [44, 45], a odsutan kod populacija lovaca-sakupljača [30, 41, 43].

Na oblikovanje sadašnjeg spektra i distribucije mtDNK linija u Evropi značajan uticaj imale su i post-neolitske migracije, među kojima je potrebno spomenuti dolazak pripadnika "jamne" kulture iz pontskih stepa istočne Evrope tokom bronzanog doba, koji je doveo do novih promena u učestalosti pojedinih haplogrupa i zamene neolitskih mtDNK linija, poput N1a, sa I, T1, U2, U4, U5a, W i pojedinim linijama haplogrupe H [44-47]. Zatim, tokom ranog srednjeg veka (IV-IX vek naše ere), odvijala se Velika seoba naroda, tokom koje su se slovenska plemena raširila po Evropi. Tokom ovog perioda, koji su obeležile migracije više slovenskih, azijskih i germanskih plemena i naroda širom Evrope [2, 48, 49], dinamika populacija na Balkanskom poluostrvu je bila izuzetno kompleksna, što je ostavilo traga i u varijabilnosti mtDNK populacija koje danas naseljavaju ovo područje. Ralph i Coop su analizom autozomnih segmenata identičnih po poreklu ustanovili

da individue iz populacija jugoistočne, istočne i srednje Evrope dele veliki broj zajedničkih predaka koji datiraju upravo iz perioda Velike seobe naroda [49]. S obzirom da većina ispitivanih populacija koje dele veliki broj segmenata identičnih po poreklu pripada slovenskoj grupi pretpostavljeno je da se to može objasniti širenjem slovenskih populacija u Evropi tokom ranog srednjeg veka. Do sličnih zaključaka su došli Hellen-thal i sar. u studiji u kojoj je pokazano da je do mešanja populacija u istočnoj i jugoistočnoj Evropi (uključujući slovenske i ne-slovenske populacije) došlo pre 1-1.6 hiljada godina, odnosno u periodu koji se poklapa sa Velikom seobom naroda [48].

MITOHONDRIJSKI GENETIČKI PROFIL STANOVNIKA REPUBLIKE SRBIJE

Republika Srbija zauzima centralni položaj na Balkanskom polustrvu koje je, kao što je već naglašeno, imalo veoma važnu ulogu tokom celokupne istorije ljudskih populacija, i na kojem su se tokom vremena odvijale brojne migracije, kao i mešanja, protok gena i promene brojnosti populacija. Stoga se na Balkanskom poluostrvu može očekivati izuzetno kompleksan mtDNK pejzaž, čijem boljem razumevanju doprinose istraživanja mtDNK diverziteta savremene srpske populacije kao i ostataka drevnih individua sa ovog područja [50], što je, u krajnjem slučaju, značajno i za sticanje novih uvida u istoriju evroazijskih populacija.

Populacija Srbije je do danas bila predmet istraživanja nekoliko studija koje su sa različitih aspekata i primenom mtDNK markera različite rezolucije (HVS-I i HVS-II segmenti [51], varijante HVS-I, HVS-II i kodirajućeg regiona [28, 52-54], kompletni mitogenomi [55]) ispitivale varijabilnost mtDNK populacija koje naseljavaju Balkansko poluostrvo. Navedene studije su značajne zbog toga što su doprinele sagledavanju mtDNK diverziteta u populaciji Srbije uključujući i detekciju mtDNK linija koje su retke ili potencijalno specifične za Balkansko poluostrvo, determinaciju genetičke strukture južnoslovenskih i drugih evropskih populacija, kao i boljem razumevanju evolutivne istorije pojedinih mtDNK linija putem filogenetskih analiza i datiranja i formiranju prve baze podataka kompletnih mitogenoma srpske populacije koja predstavlja značajan doprinos bazi podataka EMPOP.

Spektar i učestalost mtDNK (pod)haplogrupa u populaciji Srbije

Danas je poznato da mtDNK profil populacije Srbije ne odstupa od matrilinealnog profila karakterističnog za druge evropske populacije. Naime, u populaciji Srbije detektovane su sve mtDNK (pod)haplogrupe koje su karakteristične za evropske populacije (**Tabela 1**), a njihova učestalost je u rasponu učestalosti odgovarajućih mtDNK (pod)haplogrupa drugih evropskih populacija. U populaciji Srbije najzastupljenija je haplogrupa H (**Tabela 1**) koja se odlikuje velikim brojem podhaplogrupa [56] i najvećom učestalošću i u ostalim evropskim populacijama [57]. MtDNK (pod)haplogrupe HV, HV0, V i R0a (**Tabela 1**), koje su srodne haplogrupi H i koje zajedno sa njom pripadaju superhaplogrupi R0, prisutne su sa relativno niskom učestalošću u srpskoj populaciji kao i u većini ostalih evropskih populacija [2]. Druga po zastupljenosti kako u populaciji Srbije tako i na ostatku evropskog kontinenta jeste superhaplogrupa U, u okviru koje su najučestalije podhaplogrupe U4 i U5 (**Tabela 1**). Haplotipovi koji pripadaju podhaplogrupama U4 i U5 su, pored U8, bili najfrekventniji u drevnim lovačko-sakupljačkim društvima pre neolitske ekspanzije i širenja poljoprivrede u Evropi [40-43]. Sa intermedijarnom učestalošću u populaciji Srbije prisutne su haplogrupe J, T i K (**Tabela 1**), dok su (pod)haplogrupe N1a, N1b, I, W i X2, koje vode direktno poreklo od superhaplogrupe N, zastupljene sa niskim učestalostima [2] (**Tabela 1**). Interesantno je da se u srpskoj populaciji, kao i u većini evropskih populacija, sporadično uočavaju haplotipovi koji pripadaju neevropskim haplogrupama poput L, D i C [2, 28, 54].

Na osnovu prisustva i učestalosti mtDNK haplotipova u populaciji Srbije utvrđeno je da se ova populacija odlikuje visokim nivoom genetičke raznovrsnosti. Štaviše, vrednost parametra raznovrsnost haplotipova u populaciji Srbije, procenjena na osnovu varijabilnosti HVS-I segmenta, spada u najveće na evropskom kontinentu, dok vrednosti ostalih parametara genetičke raznovrsnosti odgovaraju rasponu detektovanom u drugim evropskim populacijama [2]. Takođe, u populacijama Balkanskog poluostrva detektovane su visoke vrednosti parametara genetičke raznovrsnosti retkih mtDNK podhaplogrupa, što potvrđuje njegov refugijalni karakter [2].

Genetička struktura populacija na nivou mitohondrijskog genoma

Položaj populacije Srbije u širem evropskom kontekstu, odnosno, u matrilinealnom pejzažu Evrope, ispitivan je u studiji Davidović i sar., u kojoj je analizirana mtDNK varijabilnost 7.128 individua poreklom iz 20 evropskih populacija uključujući i populaciju Srbije, predstavljenu sa 139 individua [28]. U analizama u kojima su korišćeni varijabilnost HVS-I i HVS-II regiona i dijagnostičke varijante kodirajućeg regiona mtDNK, geografska stratifikacija populacija uočena je u analizi glavnih komponenti u slučaju kada su ispitivane populacije predstavljene u PC grafikonu definisanim prvom i trećom komponentom (**Slika 2**). Veoma značajan nalaz je da populacija Srbije zauzima centralnu poziciju unutar grupe južnoslovenskih populacija (**Slika 2**) koja se odlikuje visokom heterogenošću [2]. Sličan obrazac pokazan je i u studijama u kojima je analizirana varijabilnost autozomnih markera u populacijama Balkanskog poluostrva i Bliskog istoka [53], odnosno u baltičkim i slovenskim populacijama [58]. Pored toga, uočena je i intra-slovenska genetička struktura koja odgovara grupisanju slovenskih populacija u skladu sa njihovom pripadnošću odgovarajućoj jezičkoj porodici (južno-, istočno- i zapadnoslovenska grupa) (**Slika 2**). Ovakvu lingvističku stratifikaciju slovenskih populacija dobili su i Kushniarevich i sar. na osnovu analize varijabilnosti autozomnih markera i NRY [58].

Genetičke distance srpske i drugih evropskih populacija, predstavljene preko F_{ST} vrednosti parova populacija na osnovu podataka iz studije Davidović [2] o varijabilnosti HVS-I i HVS-II segmenata 16.413 osoba iz 35 populacija uključujući i populaciju Srbije, vizualizovane su u skladu sa geografskom distribucijom populacija (**Slika 3**). Uočava se da su geografski bliske južnoslovenske populacije genetički sličnije populaciji Srbije (sa izuzetkom bugarske populacije) u odnosu na ostale populacije, dok se može uočiti i veća genetička sličnost sa populacijama istočno- i zapadnoslovenske grupe.

Deljeni i privatni haplotipovi

Takođe, analiza udela haplotipova zasnovanih na varijabilnosti HVS-I odnosno HVS-I/HVS-II segmenata koji su zajednički za srpsku i ostale evropske populacije pokazala je da srpska populacija deli najveći procenat haplotipova sa populacijama južne Evrope i to prvenstveno sa geografski bliskim populacijama Balkanskog poluostrva koje pripadaju južnoslovenskoj grupi [2]. Ovakav nalaz može se objasniti geografskom bliskošću ovih populacija, ali i zajedničkim kulturno-istorijskim nasleđem i pripadnošću istoj jezičkoj porodici [2]. Prilikom analize zajedničkih haplotipova posebno su informativni haplotipovi male učestalosti. Naime, podatak da geografski udaljene populacije imaju značajan broj zajedničkih haplotipova koji su retki može ukazivati na značajan protok gena između njih. Druga mogućnost bi bila da su takvi haplotipovi u prošlosti bili rasprostranjeni na širem geografskom području i da se tokom vremena njihova zastupljenost smanjila ili u pojedinim populacijama izgubila. Pretraživanjem literaturnih podataka o retkim evropskim haplotipovima detektovani su haplotipovi koje srpska populacija deli isključivo sa drugim južnoslovenskim populacijama, što zajedno sa visokim procentom privatnih haplotipova u populaciji Srbije ukazuje na postojanje mtDNK linija specifičnih za Balkansko poluostrvo [2]. Pored navedenog, srpska populacija deli haplotipove

sa istočno- i zapadnoslovenskim populacijama, kao i sa germanskim populacijama što bi moglo biti povezano sa migracijama tokom Velike seobe naroda [2].

Filogenija i filogeografija kompletnih mitogenoma

Filogenetske i filogeografske analize kompletnih mitogenoma prisutnih u srpskoj populaciji omogućile su preciznije procene vremena nastanka pojedinih mtDNK linija kao i detektovanje linija koje su potencijalno specifične za Balkansko poluostrvo [2, 28, 59], što je omogućilo sticanje boljeg uvida u poreklo i evoluciju pojedinih mtDNK podhaplogrupa kao i uticaje različitih migracija na oblikovanje mitohondrijskog genskog fonda savremene populacije Srbije. U navedenim studijama analizirani su mitogenomi koji pripadaju (pod)haplogrupama: H5, H6, HV (HV2, HV10 i HV16), K1, U1, U2, U3, U4, U5, U7, U8, N1b, D4 i L2a1. Odabrani mitogenomi pripadaju mtDNK linijama koje su ili retke u evropskim populacijama (npr. HV, N1b, D4, L2a1 i U1) ili su pojedine njihove grane potencijalno specifične za pojedine regione Evrope (npr. H5, H6, U4 i U5).

Među analiziranim mitogenomima iz srpske populacije, detektovane su mtDNK podhaplogrupe koje su najverovatnije nastale u južnoj Evropi (H5*, U3a1d i U4b1a1a1a), kao i one koje su potencijalno specifične za Balkansko poluostrvo (K1a13a1, H6a2b, U1a1c2, U4c1b1, U5b3j i K1a4l) [2, 28, 59]. Na postojanje mtDNK linija potencijalno specifičnih za populacije Balkanskog poluostrva, poput K1a13a1, ukazala je studija Kovacevic i sar. [53]. Naime, novodefinisana podhaplogrupa K1a13a1, procenjenog vremena nastanka od 2.6-4.5 hiljada godina, do sada je uočena isključivo u populacijama Bosne i Hercegovine, Hrvatske i Srbije (**Slika 4**) [2]. U prilog ovome govori i studija Sarac i sar. koji su definisali lokalnu mtDNK podkladu X2q1 kao specifičnu za Balkansko poluostrvo [60] i koja je detektovana i u populaciji Srbije [55]. Prisustvo mtDNK linija za koje se pretpostavlja da su nastale na Balkanskom poluostrvu moglo bi se objasniti genetičkim doprinosom autohtonih populacija koje su postojale na Balkanskom poluostrvu pre Velike seobe naroda i doseljavanja slovenskih i drugih drevnih populacija. Kushniarevich i sar. su na osnovu analize varijabilnosti autozomnih markera i NRY detektovali tzv. „jugoistočno-evropsku“-genetičku komponentu u populacijama Balkanskog poluostrva [58] koja je označena kao autohtona za populacije koje su naseljavale ovaj region pre doseljavanja Slovena. Na osnovu ovog nalaza, autori su zaključili da tokom perioda širenja slovenskih jezika na Balkansko poluostrvo, koji se poklapa sa periodom Velike seobe naroda, nije došlo do značajnijeg protoka gena i da je ono najverovatnije posledica kulturološke asimilacije [58].

S druge strane, filogenetske i filogeografske analize su pokazale da srpska populacija deli određeni broj mtDNK linija sa istočno- i zapadnoslovenskim populacijama (npr. U2e1b1, U2e2a1d, U4a2a, U4a2c, U4a2g1, U4d2b, U5a2b1e, U5b1a1 i HV10) što podržava pretpostavke o doprinosu migracija Slovena u oblikovanju mitohondrijskog genskog pula savremene srpske populacije [2]. Haplotipovi koji pripadaju podhaplogrupama U4a2a, U4a2a1, U4a2b i U4a2g1 zastupljeni su u slovenskim i germanskim populacijama severne i srednje Evrope, kao i u Finskoj, što ukazuje na mogućnost da su ove podhaplogrupe nastale u srednjoj Evropi. Početno širenje različitih linija podhaplogrupe U4a2 moglo bi se objasniti širenjem kulture linearne keramike koja je bila rasprostranjena u srednjoj i istočnoj Evropi pre 4.3-5.2 hiljade godina [61], dok bi se njihovo prisustvo u populacijama Balkanskog poluostrva moglo objasniti migracijama slovenskih plemena u ranom srednjem veku [2].

U srpskoj populaciji detektovana je mtDNK linija K1a4d koja je pretežno zastupljena u germanskim populacijama severne i srednje Evrope, gde je najverovatnije i nastala. Njeno prisustvo u srpskoj populaciji moglo bi se objasniti migracijama germanskih plemena poput Ostrogota, Vizigota i Gepida, nosioca ove podhaplogrupe, na Balkansko poluostrvo krajem IV i početkom V veka nove ere [2].

Filogenetske i filogeografske analize haplotipova koji su retki, kako na evropskom kontinentu, tako i u srpskoj populaciji, a koji su karakteristični za druge regione, poput Bliskog istoka (N1b, HV2), istočne Azije (D4) i Afrike (L2a1) posebno su informativne za utvrđivanje doprinosa različitih migracija koje su se odvijale kroz teritoriju Balkana u oblikovanju sadašnjeg obrasca varijabilnosti mitohondrijskog genskog pula populacije Srbije.

Retka podhaplogrupa L2a1k detektovana je do sada samo u evropskim populacijama i pošto je njena starost procenjena na oko 10 hiljada godina, pretpostavlja se da je rezultat protoka gena iz afričkih populacija u Evropu tokom praistorije i da je nastala *in situ* u Evropi [27, 62]. U okviru podhaplogrupe L2a1k, haplotip detektovan u populaciji Srbije klasifikovan je, zajedno sa tri mitogenoma iz Češke, Slovačke i Bugarske, u novu podhaplogrupu L2a1k1 procenjene starosti od 7.9-11.3 hiljada godina, dok su haplotipovi iz Maroka organizovani u mladu afričku podkladu L2a1k2 [2] (**Slika 5**). Do sada analizirani podaci su pokazali da je podhaplogrupa L2a1k1 zastupljena isključivo u slovenskim populacijama koje naseljavaju region oko Dunava. Imajući u vidu procenjenju starost, kao i geografsku rasprostranjenost ove podhaplogrupe, pretpostavlja se da je ona nastala i raširila se u populacijama mezolita ili neolitskim populacijama koje su pripadale kulturama dunavske doline poput Starčevačke, Vinčanske i kulture linearnotrakaste keramike [2]. Stoga je moguće da je podhaplogrupa L2a1k1 nastala na Balkanskom poluostrvu i da se duž Dunava širila putem širenja neolitskih kultura. Međutim, da bi se sa većom pouzdanošću moglo govoriti o poreklu podhaplogrupe L2a1k1 neophodno je ispitati mtDNK farmera koji su naseljavali teritoriju Balkanskog poluostrva tokom neolita.

U populaciji Srbije detektovani su haplotipovi D4j8 i i D4j5 koji pripadaju istočnoazijskoj podhaplogrupi D4 [28, 55] koja je prisutna i u populacijama istočne Evrope [29]. Pretpostavlja se da je prisustvo ove azijske haplogrupe u Evropi rezultat kompleksnih interakcija populacija istočne i zapadne Evroazije, koje su se odvijale od gornjeg paleolita pa do danas [63]. Prisustvo podhaplogrupa D4j8 i D4j5 u srpskoj populaciji moglo bi se povezati sa srednjevekovnim vojnim pohodima srednjeazijskih populacija (Huna, Avara i Mongola) po Evropi [64, 65] i njihovim genetičkim uplivom u populacije koje su već nastanjivale područje Balkanskog poluostrva [2, 28].

Prisustvo mtDNK linija poreklom sa Bliskog istoka i/ili Kavkaza, kao što su U3a3, U5a1a2a, K1a2 i K1b1c, moglo bi se objasniti migracijama koje su se odvijale u talasima, tokom dužeg vremenskog perioda, od severnih pontskih stepa ka Balkanskom poluostrvu, počevši od masovnih migracija nosioca jamne kulture tokom kasnog neolita i ranog bronzanog doba, pa sve do migracija Anta u ranom srednjem veku [59]. Bliskoistočno/kavkaski haplotipovi koji su mogli dospeti na Balkansko poluostrvo dolaskom nosilaca jamne kulture [46, 66] nisu bili prisutni u populacijama farmera ranog i srednjeg neolita, dok su bliskoistočne haplogrupe tipične za neolitske farmere mogle dospeti u ovaj region migracijama neolitskih farmera preko Male Azije ka Balkanskom poluostrvu početkom kasnog holocena [28, 67]. Proširivanjem postojećih baza podataka kompletnih mitogenoma sa podacima o drevnim populacijama sa ovih prostora moglo bi dati odgovor na pitanje o poreklu mtDNK linija koje savremena populacija Srbije deli sa populacijama Bliskog istoka i Kavkaza.

Dinamika populacija na području Srbije od poslednjeg ledenog maksimuma do danas

Sekvenciranje kompletnih mitogenoma prisutnih kod osoba sa područja današnje Republike Srbije značajno je i zbog toga što je omogućilo sticanje novih saznanja o dinamici srpske populacije tokom vremena. Korišćenjem Bajesove "skyline plot" metode, Davidović i sar. su utvrdili da je na području Srbije došlo do značajnog smanjenja brojnosti tadašnjeg stanovništva tokom poslednjeg ledenog maksimuma, kao i

da su postojale dve ekspanzije, prva nakon poslednjeg ledenog maksimuma koja je trajala sve do pre oko 7 hiljada godina i druga pre oko 1.6 hiljada godina, što se poklapa sa periodom Velike seobe naroda tokom ranog srednjeg veka [55] (**Slika 6**). Prema očekivanjima, povećanje brojnosti uočeno je tokom neolitske tranzicije koju karakteriše razvoj poljoprivrede i prelazak sa lovačko-sakupljačkog na sedentarni način, kao i ekspanzija populacija sa Bliskog istoka u Evropu [68]. Veoma interesantan nalaz je da je u populaciji Srbije, odmah nakon dostizanja pika u brojnosti tokom neolitske tranzicije, pre oko 7 hiljada godina, detektovan blag i kontinuiran pad brojnosti. Poznato je da je u pojedinim delovima Evrope tokom neolitske tranzicije detektovan i suprotan trend u pogledu brojnosti različitih neolitskih kultura, tzv. neolitski kolaps [69, 70]. Predloženo je više mehanizama koji mogu objasniti fenomen kolapsa neolitskih društava, počev od ekoloških promena usled narušavanja životne sredine do sukoba sa lovcima sakupljačima iz stepskih područja [71, 72]. Neka od novijih istraživanja sprovedenih na arheološkim nalazima drevnih populacija neolita ukazala su na epidemiju kuge izazvane bakterijom *Yersinia pestis* kao mogućim uzročnikom neolitskog kolapsa u pojedinim regionima Evrope [73]. Međutim, da bi se sa većom sigurnošću moglo utvrditi šta je uslovljalo pad brojnosti populacije na teritoriji Srbije tokom neolita potrebno je dodatno analizirati arheološke nalaze iz tog perioda.

Mitogenomi populacije Srbije u bazama podataka

U studiji koja se bavila detaljnom analizom varijabilnosti mtDNK linija populacije Srbije prikazani su rezultati sekvenciranja i analize mtDNK poreklom od 226 ispitanika [55]. Na osnovu dobijenih podataka napravljena je prva referentna baza kompletnih mtDNK populacije Srbije koja predstavlja značajan doprinos bazi podataka EMPOP koja se rutinski koristi u forenzici.

ZAKLJUČAK

Do sada dostupni podaci o raznovrsnosti mtDNK u populaciji Srbije oslikavaju zanimljivu priču o istoriji ove populacije primenom molekularnih markera sa ženskom linijom nasleđivanja i protoku gena usled migracija i mešanja različitih grupacija ljudi kroz čitavu istoriju. Analiza varijabilnosti mitohondrijskog genskog pula stanovnika Republike Srbije intenzivirana je naročito tokom poslednje decenije, kada je publikovano više radova u kojima su ispitivani hipervarijabilni segmenti kontrolnog regiona i varijante kodirajućeg regiona kao i kompletni mitogenomi. Uočeni spektar i raznovrsnost mtDNK linija u populaciji Srbije kao i genetička struktura srpske u odnosu na druge balkanske i evropske populacije su u najvećoj meri rezultat specifičnog geografskog položaja područja koje ova populacija naseljava, a to je centralni deo Balkanskog poluostrva, za koje je poznato da je predstavljalo jedan od glacijalnih refugijuma tokom poslednjeg ledenog maksimuma sa kojeg je otpočela post-glacijalna rekolonizacija Evrope, kao i važan koridor za migracije ljudi u različitim vremenskim periodima. Višestruke kolonizacije ovog prostora, migracije iz različitih pravaca i mešanja ljudi raznovrsnog populacionog porekla kao i promene brojnosti populacija tokom vremena oslikavaju izuzetno kompleksnu dinamiku populacija na ovom području, koja je rezultovala veoma visokim nivoom raznovrsnosti mtDNK u savremenim populacijama Balkanskog poluostrva uključujući i populaciju Srbije. Istraživanja na nivou mtDNK ukazuju na dva činioca koja su imala važnu ulogu u formiranju savremenog genskog pula populacije Srbije. Prvi se odnosi na autohtone populacije koje su naseljavale Balkansko poluostrvo pre Velike seobe naroda i čiji je genski pul sadržavao genetičke tragove različitih drevnih populacija iz kojih su migranti dospeli na Balkan (npr. nosioci jamne kulture). Drugi činilac koji je doveo do povećanja genetičke raznovrsnosti srpske populacije su migracije iz populacija slovenskog i germanskog porekla tokom ranog srednjeg veka. Stoga se visok stepen raznovrsnosti mtDNK savremene pop-

ulacije Srbije može objasniti genetičkim doprinosom kako slovenskih/germanskih, tako i pre-slovenskih populacija.

Pored veoma značajnih nalaza koji su doprineli boljem razumevanju diverziteta i porekla mtDNK linija prisutnih u savremenoj srpskoj populaciji, istraživanja varijabilnosti mtDNK ove populacije imaju i šire konsekvence, zbog toga što su doprinela sagledavanju kompleksne dinamike populacije Srbije od poslednjeg ledenog maksimuma do danas, njenom pozicioniranju u genetičkom pejzažu Evrope, kao i dostupnosti mtDNK podataka za primenu u forenzici. Dalja istraživanja raznovrsnosti mtDNK savremene srpske populacije kao i ostataka drevnih individua sa područja Srbije primenom savremenih metoda sekvenciranja naredne generacije su značajna i za sticanje novih uvida u istoriju evroazijskih populacija.

Zahvalnica

Izrada ovog rada omogućena je zahvaljujući projektima Ministarstva nauke, tehnološkog razvoja i inovacija Republike Srbije- brojevi ugovora **451-03-47/2023-01/ 200042** i **451-03-47/2023-01/ 200007**.

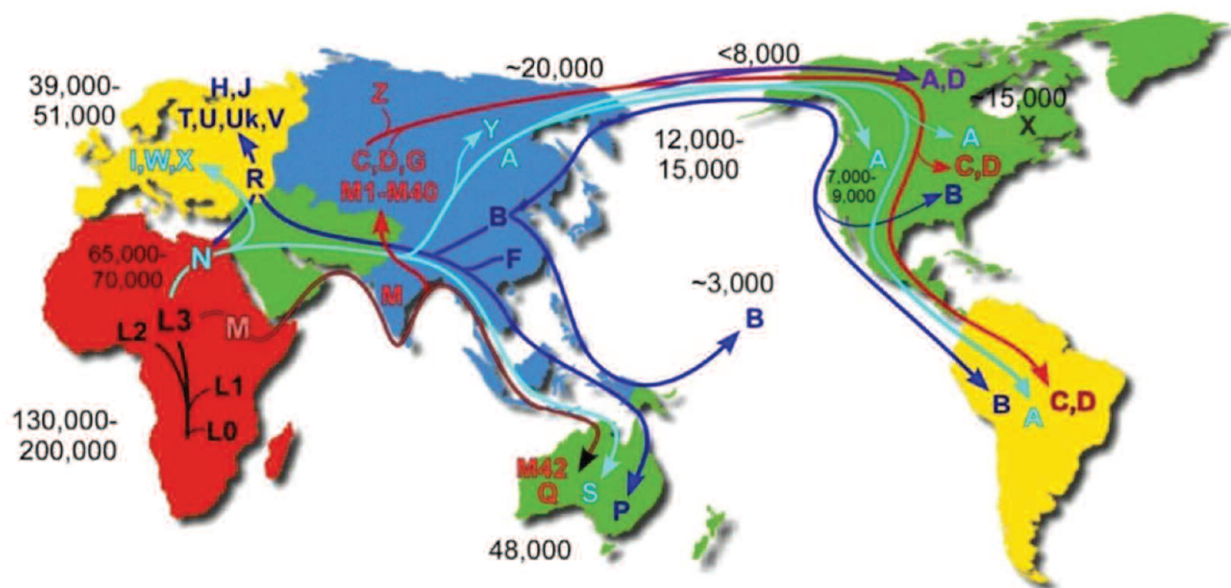
LITERATURA

1. Menozzi P, Piazza A, Cavalli-Sforza LL. Synthetic maps of human gene frequencies in Europeans. *Science* 1978;201(4358):786-92.
2. Davidović S. Analiza varijabilnosti mitohondrijske DNK stanovnika Republike Srbije sa populaciono genetičkog, filogenetskog i filogeografskog aspekta. Doktorska disertacija. Univerzitet u Beogradu, Beograd; 2018.
3. Kimura M. Evolutionary rate at the molecular level. *Nature* 1968;217(5129):624-26.
4. Green RE, Krause J, Briggs AW, Maricic T, Stenzel U, Kircher M et al. A draft sequence of the Neandertal genome. *Science* 2010;328(5979):710-22.
5. Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, de Bruijn MH, Coulson AR, Drouin J et al. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 1981;290(5806):457-65.
6. Brown WM, George MJ, Wilson AC. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1979;76(4):1967-71.
7. Pakendorf B, Stoneking M. Mitochondrial DNA and human evolution. *Annual Review of Genomics and Human Genetics* 2005;6:165-83.
8. Cann R, Stoneking M, Wilson AC. Mitochondrial DNA and human evolution. *Nature* 1987;325(6099):31-6.
9. Brown WM. Polymorphism in mitochondrial DNA of humans as revealed by restriction endonuclease analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1980;77(6):3605-09.
10. Macaulay V, Richards M, Hickey E, Vega E, Cruciani F, Guida V et al. The emerging tree of West Eurasian mtDNAs: a synthesis of control-region sequences and RFLPs. *American Journal of Human Genetics* 1999;64(1):232-49.
11. Finnila S, Lehtonen MS, Majamaa K. Phylogenetic network for European mtDNA. *American Journal of Human Genetics* 2001;68(6):1475-84.
12. Ingman M, Kaessmann H, Paabo S, Gyllensten U. Mitochondrial genome variation and the origin of modern humans. *Nature* 2000;408(6813):708-13.
13. Andrews RM, Kubacka I, Chinnery PF, Lightowlers RN, Turnbull DM, Howell N. Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA. *Nature Genetics* 1999;23(2):147.
14. Behar DM, van Oven M, Rosset S, Metspalu M, Loogvali EL, Silva NM et al. A "Copernican" reassessment of the human mitochondrial DNA tree from its root. *American Journal of Human Genetics* 2012;90(4):675-84.
15. Zuckerkandl E, Pauling LB. Molecular disease, evolution, and genetic heterogeneity. Kasha M, Pullman B, editors. Academic Press, New York; 1962.

16. Perego UA, Achilli A, Angerhofer N, Accetturo M, Pala M, Olivieri A et al. Distinctive Paleo-Indian migration routes from Beringia marked by two rare mtDNA haplogroups. *Current Biology* 2009;19(1):1-8.
17. Soares P, Ermini L, Thomson N, Mormina M, Rito T, Rohl A et al. Correcting for purifying selection: an improved human mitochondrial molecular clock. *American Journal of Human Genetics* 2009;84(6):740-59.
18. Parson W, Dur A. EMPOP—a forensic mtDNA database. *Forensic Science International: Genetics* 2007;1(2):88-92.
19. Lott MT, Leipzig JN, Derbeneva O, Xie HM, Chalkia D, Sarmady M et al. mtDNA Variation and Analysis Using Mitomap and Mitomaster. *Current Protocols in Bioinformatics* 2013;44:1.23.1-1.23.26.
20. Ruiz-Pesini E, Lott MT, Procaccio V, Poole JC, Brandon MC, Mishmar D et al. An enhanced MITOMAP with a global mtDNA mutational phylogeny. *Nucleic Acids Research* 2007;35:D823-D28.
21. Wallace DC. Bioenergetics in human evolution and disease: implications for the origins of biological complexity and the missing genetic variation of common diseases. *Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences* 2013;368(1622):20120267.
22. Richards M, Bandelt HJ, Kivisild T, Oppenheimer S. A Model for the Dispersal of Modern Humans out of Africa. Bandelt HJ, Macaulay V, Richards M, editors. Springer, Berlin, Heidelberg; 2006.
23. Torroni A, Bandelt HJ, D'Urbano L, Lahermo P, Moral P, Sellitto D et al. mtDNA analysis reveals a major late Paleolithic population expansion from southwestern to northeastern Europe. *American Journal of Human Genetics* 1998;62(5):1137-52.
24. Cerny V, Mulligan CJ, Fernandes V, Silva NM, Alshamali F, Non A et al. Internal Diversification of Mitochondrial Haplogroup R0a Reveals Post-Last Glacial Maximum Demographic Expansions in South Arabia. *Molecular Biology and Evolution* 2011;28(1):71-78.
25. Fernandes V, Alshamali F, Alves M, Costa MD, Pereira JB, Silva NM et al. The Arabian cradle: mitochondrial relicts of the first steps along the southern route out of Africa. *American Journal of Human Genetics* 2012;90(2):347-55.
26. Gandini F, Achilli A, Pala M, Bodner M, Brandini S, Huber G et al. Mapping human dispersals into the Horn of Africa from Arabian Ice Age refugia using mitogenomes. *Scientific Reports* 2016;6:25472.
27. Cerezo M, Achilli A, Olivieri A, Perego UA, Gomez-Carballa A, Brisighelli F et al. Reconstructing ancient mitochondrial DNA links between Africa and Europe. *Genome Research* 2012;22(5):821-6.
28. Davidovic S, Malyarchuk B, Aleksic JM, Derenko M, Topalovic V, Litvinov A et al. Mitochondrial DNA perspective of Serbian genetic diversity. *American Journal of Physical Anthropology* 2015;156(3):449-65.
29. Mielnik-Sikorska M, Daga P, Malyarchuk B, Derenko M, Skonieczna K, Perkova M et al. The history of Slavs inferred from complete mitochondrial genome sequences. *PLoS ONE* 2013;8(1):e54360.
30. Brandt G, Szecsenyi-Nagy A, Roth C, Alt KW, Haak W. Human paleogenetics of Europe - The known knowns and the known unknowns. *Journal of Human Evolution* 2015;79:73-92.
31. Hofmanova Z, Kreutzer S, Hellenthal G, Sell C, Diekmann Y, Diez-Del-Molino D et al. Early farmers from across Europe directly descended from Neolithic Aegeans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2016;113(25):6886-91.
32. Richards M, Macaulay V, Sykes B, Pettitt P, Hedges R, Forster P et al. Paleolithic and neolithic lineages in the European mitochondrial gene pool - Reply to Cavalli-Sforza and Minch. *American Journal of Human Genetics* 1997;61(1):251-54.
33. Dolukhanov P. Foraging and farming groups in north-eastern and north-western Europe: identity and interaction. Chapman J, Dolukhanov P, editors. Avebury, Aldershot; 1993.
34. Gamble C, Davies W, Pettitt P, Hazelwood L, Richards M. The Archaeological and Genetic Foundations of the European Population during the Late Glacial: Implications for 'Agricultural Thinking'. *Cambridge Archaeological Journal* 2005;15(2):193-223.
35. Gamble C, Davies W, Pettitt P, Richards M. Climate change and evolving human diversity in Europe during the last glacial. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences* 2004;359(1442):243-53; discussion 53-4.
36. Price TD. *Europe's First Farmers*. Cambridge University Press, Cambridge; 2000.
37. Mathieson I, Alpaslan-Roodenberg S, Posth C, Szecsenyi-Nagy A, Rohland N, Mallick S et al. The Genomic History Of Southeastern Europe. *Nature* 2018;555(7695):197-203.
38. Pinhasi R, Thomas MG, Hofreiter M, Currat M, Burger J. The genetic history of Europeans. *Trends in Genetics* 2012;28(10):496-505.
39. Skoglund P, Malmstrom H, Raghavan M, Stora J, Hall P, Willerslev E et al. Origins and Genetic Legacy of Neolithic Farmers and Hunter-Gatherers in Europe. *Science* 2012;336(6080):466-69.

40. Bollongino R, Nehlich O, Richards MP, Orschiedt J, Thomas MG, Sell C et al. 2000 years of parallel societies in Stone Age Central Europe. *Science* 2013;342(6157):479-81.
41. Bramanti B, Thomas MG, Haak W, Unterlaender M, Jores P, Tambets K et al. Genetic Discontinuity Between Local Hunter-Gatherers and Central Europe's First Farmers. *Science* 2009;326(5949):137-40.
42. Fu Q, Mittnik A, Johnson PL, Bos K, Lari M, Bollongino R et al. A revised timescale for human evolution based on ancient mitochondrial genomes. *Current Biology* 2013;23(7):553-9.
43. Malmstrom H, Gilbert MTP, Thomas MG, Brandstrom M, Stora J, Molnar P et al. Ancient DNA Reveals Lack of Continuity between Neolithic Hunter-Gatherers and Contemporary Scandinavians. *Current Biology* 2009;19(20):1758-62.
44. Brandt G, Haak W, Adler CJ, Roth C, Szecsenyi-Nagy A, Karimnia S et al. Ancient DNA Reveals Key Stages in the Formation of Central European Mitochondrial Genetic Diversity. *Science* 2013;342(6155):257-61.
45. Haak W, Balanovsky O, Sanchez JJ, Koshel S, Zaporozhchenko V, Adler CJ et al. Ancient DNA from European early neolithic farmers reveals their near eastern affinities. *PLoS Biology* 2010;8(11):e1000536.
46. Haak W, Lazaridis I, Patterson N, Rohland N, Mallick S, Llamas B et al. Massive migration from the steppe was a source for Indo-European languages in Europe. *Nature* 2015;522(7555):207-11.
47. Szecsenyi-Nagy A, Brandt G, Haak W, Keerl V, Jakucs J, Moller-Rieker S et al. Tracing the genetic origin of Europe's first farmers reveals insights into their social organization. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* 2015;282(1805).
48. Hellenthal G, Busby GBJ, Band G, Wilson JF, Capelli C, Falush D et al. A Genetic Atlas of Human Admixture History. *Science* 2014;343(6172):747-51.
49. Ralph P, Coop G. The geography of recent genetic ancestry across Europe. *PLoS Biology* 2013;11(5):e1001555.
50. Mathieson I, Alpaslan-Roodenberg S, Posth C, Szecsenyi-Nagy A, Rohland N, Mallick S et al. The genomic history of southeastern Europe. *Nature* 2018;555(7695):197-203.
51. Zgonjanin D, Veselinovic I, Kubat M, Furac I, Antov M, Loncar E et al. Sequence polymorphism of the mitochondrial DNA control region in the population of Vojvodina Province, Serbia. *Legal Medicine* 2010;12(2):104-07.
52. Cvjetan S, Tolik HV, Lauc LB, Colak I, Dordevic D, Efremovska L et al. Frequencies of mtDNA haplogroups in southeastern Europe—Croatians, Bosnians and Herzegovinians, Serbians, Macedonians and Macedonian Romani. *Collegium Antropologicum* 2004;28(1):193-8.
53. Kovacevic L, Tambets K, Ilumae AM, Kushniarevich A, Yunusbayev B, Solnik A et al. Standing at the Gateway to Europe - The Genetic Structure of Western Balkan Populations Based on Autosomal and Haploid Markers. *PLoS ONE* 2014;9(8):e105090.
54. Scorrano G, Finocchio A, Angelis FD, Martínez-Labarga C, Šarac J, Contin I et al. The genetic landscape of Serbian populations through mitochondrial DNA sequencing and non-recombining region of the Y chromosome microsatellites. *Collegium Antropologicum* 2017;41:275-96.
55. Davidovic S, Malyarchuk B, Grzybowski T, Aleksic JM, Derenko M, Litvinov A et al. Complete mitogenome data for the Serbian population: the contribution to high-quality forensic databases. *International Journal of Legal Medicine* 2020;134(5):1581-90.
56. van Oven M. PhyloTree Build 17: Growing the human mitochondrial DNA tree. *Forensic Sci Int Genet: Genetics Supplement Series* 2015;5:e392-e94.
57. Roostalu U, Kutuev I, Loogvali EL, Metspalu E, Tambets K, Reidla M et al. Origin and expansion of haplogroup H, the dominant human mitochondrial DNA lineage in West Eurasia: the Near Eastern and Caucasian perspective. *Molecular Biology and Evolution* 2007;24(2):436-48.
58. Kushniarevich A, Utevska O, Chuhryaeva M, Agdzhoyan A, Dibirova K, Uktveryte I et al. Genetic Heritage of the Balto-Slavic Speaking Populations: A Synthesis of Autosomal, Mitochondrial and Y-Chromosomal Data. *PLoS ONE* 2015;10(9):e0135820.
59. Davidovic S, Malyarchuk B, Aleksic J, Derenko M, Topalovic V, Litvinov A et al. Mitochondrial super-haplogroup U diversity in Serbians. *Annals of Human Biology* 2017;44(5):408-18.
60. Sarac J, Saric T, Augustin DH, Jeran N, Kovacevic L, Cvjetan S et al. Maternal genetic heritage of Southeastern Europe reveals a new Croatian isolate and a novel, local sub-branching in the x2 haplogroup. *Annals of Human Genetics* 2014;78(3):178-94.
61. Malyarchuk B, Grzybowski T, Derenko M, Perkova M, Vanecsek T, Lazur J et al. Mitochondrial DNA phylogeny in Eastern and Western Slavs. *Molecular Biology and Evolution* 2008;25(8):1651-8.
62. Malyarchuk BA, Derenko M, Perkova M, Grzybowski T, Vanecsek T, Lazur J. Reconstructing the phylogeny of African mitochondrial DNA lineages in Slavs. *European Journal of Human Genetics* 2008;16(9):1091-6.
63. Derenko M, Malyarchuk B, Grzybowski T, Denisova G, Dambueva I, Perkova M et al. Phylogeographic analysis of mitochondrial DNA in northern Asian populations. *American Journal of Human Genetics* 2007;81(5):1025-41.

64. Curta F. *Southeastern Europe in the Middle Ages, 500-1250*. Cambridge University Press, Cambridge; 2006.
65. Ostrogorski G. *Istorija Vizantije*. Narodna Knjiga Alfa, Beograd; 1998.
66. Jones ER, Gonzalez-Fortes G, Connell S, Siska V, Eriksson A, Martiniano R et al. Upper Palaeolithic genomes reveal deep roots of modern Eurasians. *Nature Communications* 2015;6:8912.
67. Kushniarevich A, Sivitskaya L, Danilenko N, Novogrodskii T, Tsybovsky I, Kiseleva A et al. Uniparental genetic heritage of belarusians: encounter of rare middle eastern matrilineages with a central European mitochondrial DNA pool. *PLoS ONE* 2013;8(6):e66499.
68. Gignoux CR, Henn BM, Mountain JL. Rapid, global demographic expansions after the origins of agriculture. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2011;108(15):6044-9.
69. Hinz M, Feeser I, Sjögren K-G, Müller J. Demography and the intensity of cultural activities: an evaluation of Funnel Beaker Societies (4200–2800 cal BC). *Journal of Archaeological Science* 2012;39(10):3331-40.
70. Shennan S, Downey SS, Timpson A, Edinborough K, Colledge S, Kerig T et al. Regional population collapse followed initial agriculture booms in mid-Holocene Europe. *Nature Communications* 2013;4(1):2486.
71. Anthony DW. *The Horse, the Wheel, and Language: How Bronze-Age Riders from the Eurasian Steppes Shaped the Modern World*. Princeton University Press, Princeton; 2007.
72. Kirleis W, Dreibrodt S. The Natural Steppe Background: Forest, Forest Steppe, or Steppe Environment. In: Muller J, Rassmann K, editors. *Trypillia mega-sites and European prehistory 4100-3400 BCE*. Routledge Taylor and Francis, New York; 2016. p. 171-80.
73. Rascovan N, Sjögren K-G, Kristiansen K, Nielsen R, Willerslev E, Desnues C et al. Emergence and Spread of Basal Lineages of *Yersinia pestis* during the Neolithic Decline. *Cell* 2019;176(1):295-305.e10.



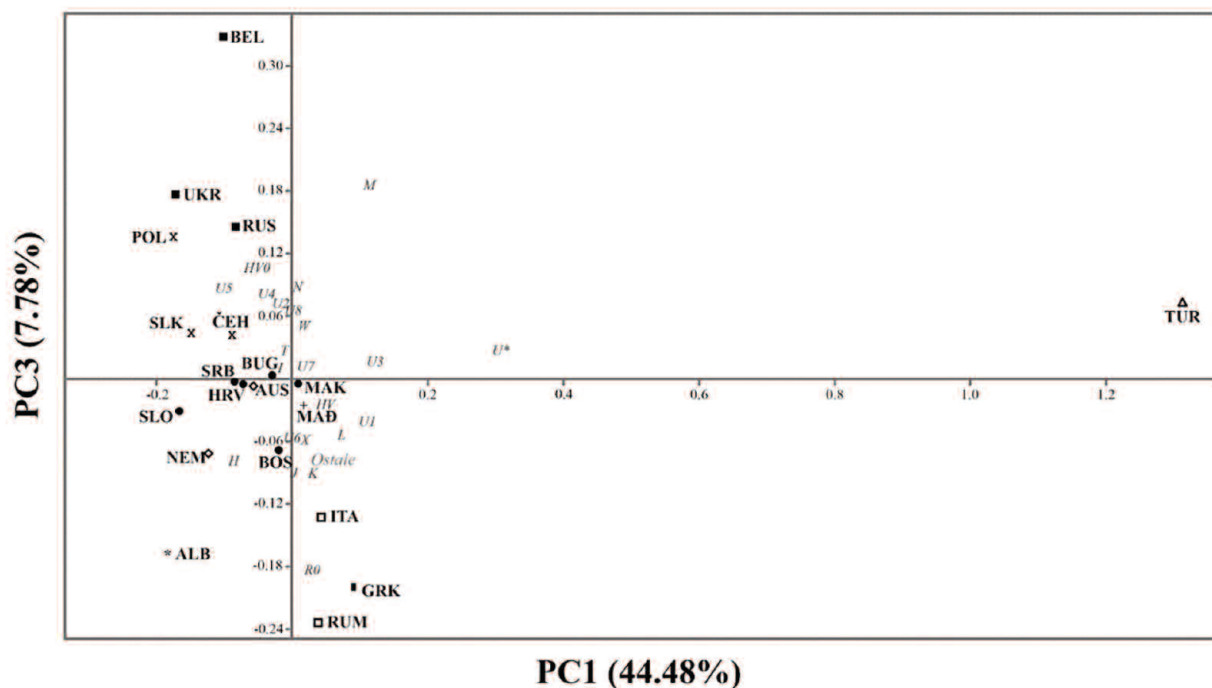
Stopa mutacija = 2.2 - 2.9% / milion godina

Slika 1. Rekonstrukcija pravaca migracija ljudi na osnovu analize varijabilnosti mtDNK. Na slici je predstavljena distribucija glavnih linija mtDNK po kontinentima, kao i vremenski okviri naseljavanja kontinenata. Procene vremena su izražene u hiljadama godina pre sadašnjosti. Preuzeto iz [19] uz dozvolu John Wiley & Sons - Books; dozvola preneti preko Copyright Clearance Center, Inc.

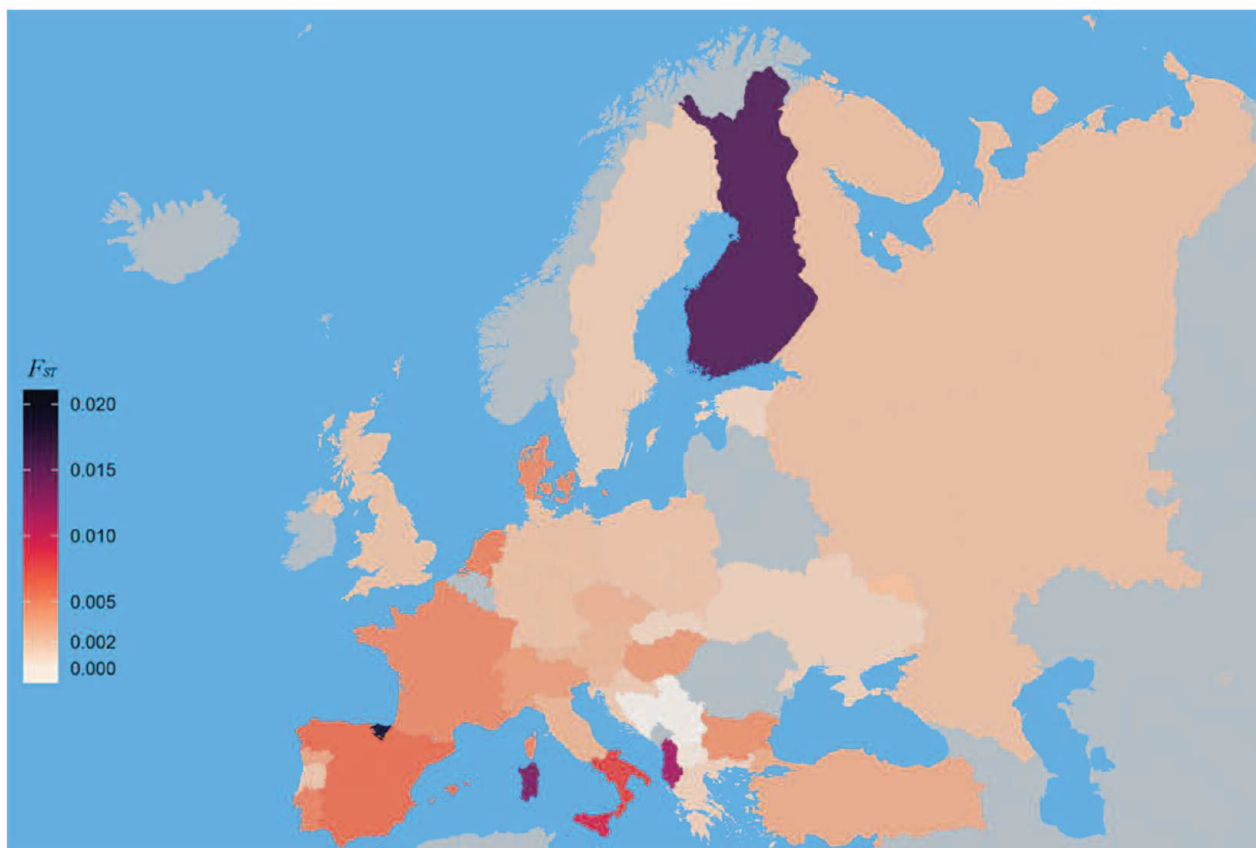
Referenca	H	HV	HV0 ^a	J	T	U*	U1	U2	U3	U4	U5	U6
[52]	41,03	0,85	5,13	6,84	5,13	1,71	0,00	1,71	0,85	6,84	9,40	0,00
[51]	42,86	0,00	2,60	9,09	11,69	0,00	0,00	2,60	0,00	2,60	6,49	0,00
[53]	28,57	0,00	19,05	9,52	4,76	0,00	0,00	4,76	0,00	9,52	4,76	0,00
[28]	47,48	3,60	2,88	6,47	5,04	0,00	0,72	0,72	1,44	8,63	6,47	0,00
[54]	43,59	6,99	2,34	8,95	7,39	0,39	0,00	2,34	1,95	5,42	3,12	0,00
[55]	47,78	3,10	2,20	8,85	5,31	0,00	0,88	1,77	0,88	6,19	5,31	0,00
	U7	U8	K	I	W	X ^b	N ^c	R0 ^d	M ^e	L	Ostale	N
[52]	1,71	0,00	4,27	3,42	3,42	0,00	3,42	0,85	0,00	0,00	3,42	117
[51]	0,00	1,30	5,19	2,60	5,19	1,30	2,60	0,00	2,60	0,00	1,30	77
[53]	0,00	0,00	4,76	0,00	4,76	0,00	4,76	0,00	0,00	4,76	0,00	21
[28]	0,72	0,00	7,91	0,00	2,16	1,44	2,16	0,72	0,72	0,72	0,00	139
[54]	0,00	0,78	5,45	2,33	2,33	1,94	1,56	0,00	1,56	0,78	0,78	257
[55]	0,88	0,88	6,19	0,88	3,10	1,32	2,65	0,44	0,88	0,44	0,00	226

Tabela 1. Učestalost mtDNK (pod)haplogrupa u populaciji Srbije dobijena u različitim studijama

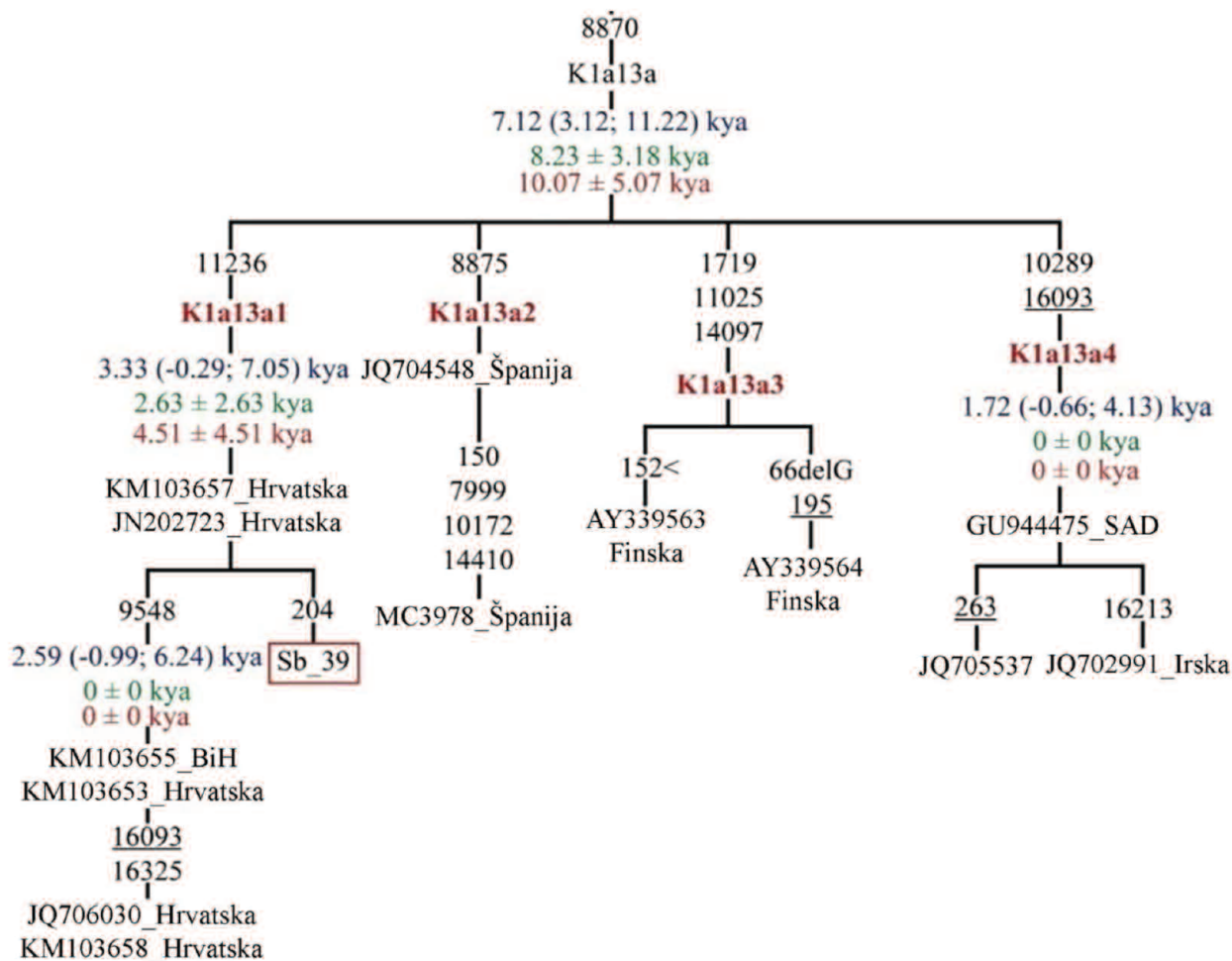
^a obuhvata haplogrupu HV0 sa V; ^b obuhvata pretežno podhaplogrupu X2; ^c obuhvata haplogrupu N bez haplogrupa I, W, X; ^d obuhvata haplogrupu R0 bez haplogrupa H, HV i HV0; ^e obuhvata haplogrupe D i C u okviru haplogrupe M; Ostale – obuhvata haplogrupe A, B i R (bez R0, U, J i T); N – veličina uzorka



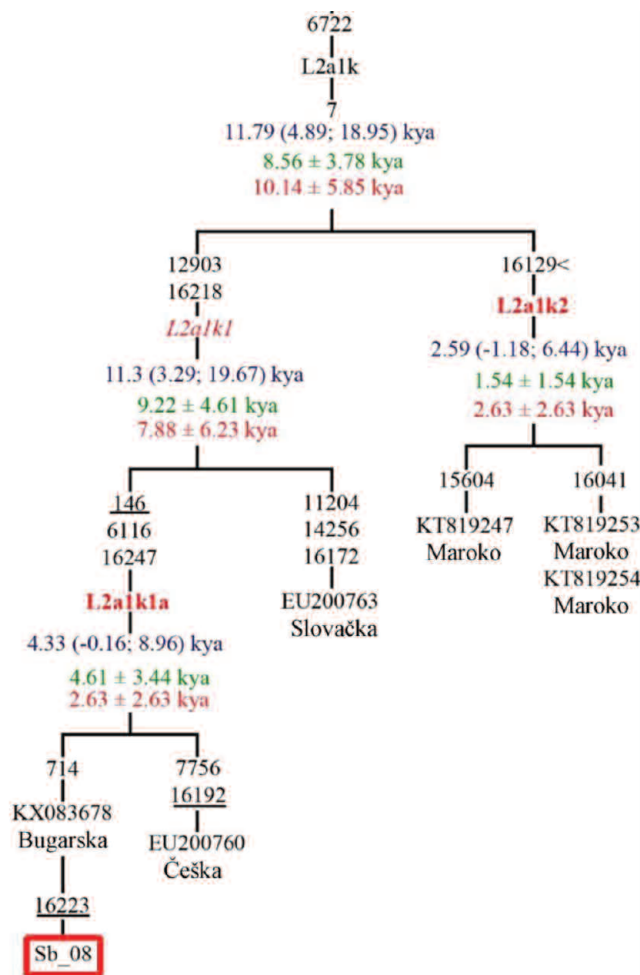
Slika 2. Analiza glavnih komponenti zasnovana na učestalosti mtDNK (pod)haplogrupa kod 20 odabranih evropskih populacija. Doprinos svake od mtDNK (pod)haplogrupa na raspodelu duž prve i treće glavne komponente (PC1 i PC3) prikazan je sivim *italic* slovima. Oznake populacija: SRB, srpska; SLO, slovenačka; HRV, hrvatska; BOS, bosansko-hercegovačka; MAK, makedonska; BUG, bugarska; ČEH, češka; SLK, slovačka; POL, poljska; RUS, ruska; UKR, ukrajinska; BEL, beloruska; NEM, nemačka; AUS, austrijska; MAD, mađarska; ALB, albanska; ITA, italijanska; RUM, rumunska; GRK, grčka; TUR, turska. Slika preuzeta iz [2].



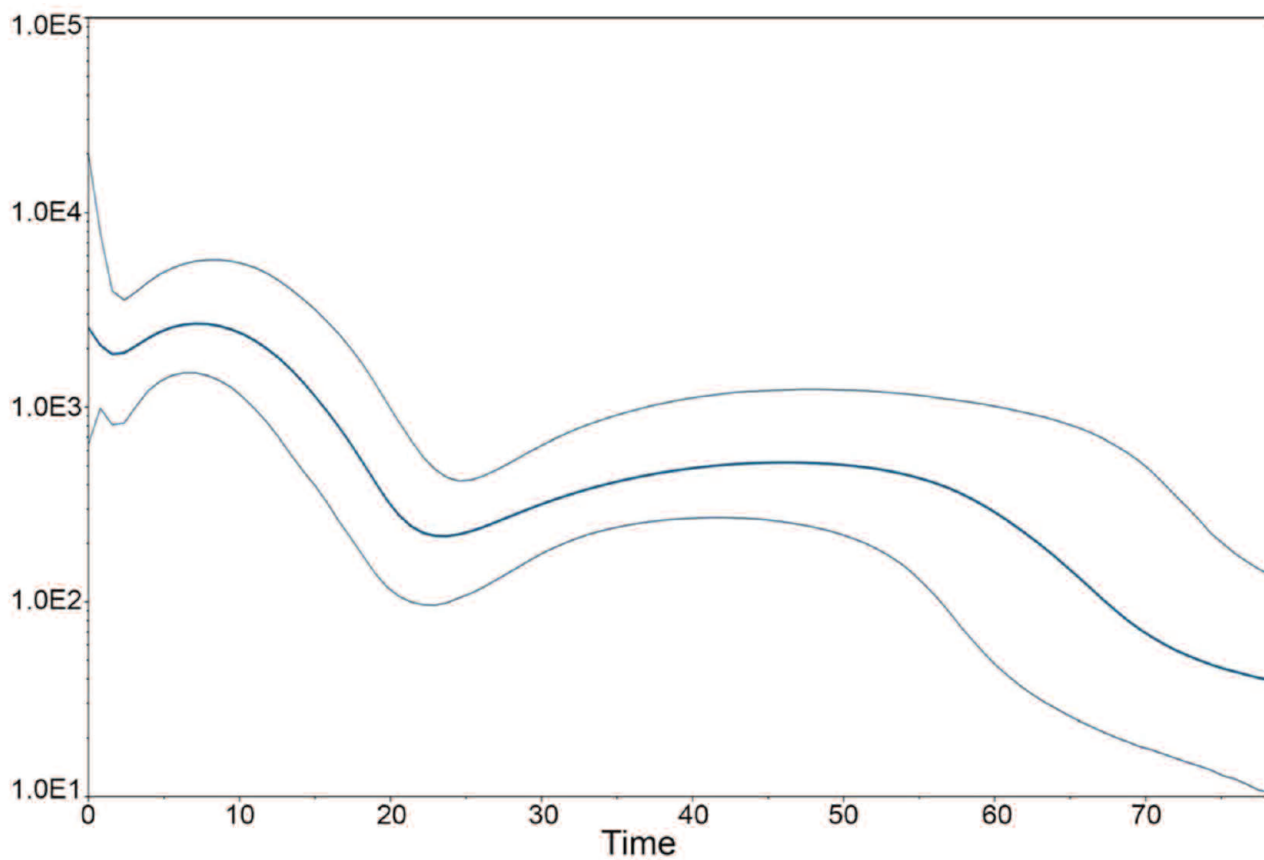
Slika 3. Prikaz F_{ST} vrednosti između parova populacija, srpske populacije i 34 evropske populacije, izračunatih na osnovu varijabilnosti sekvenci HVS-I i HVS-II segmenta mtDNK. Mapa je generisana u programu R korišćenjem paketa "rnatualearth", "sp" i "ggplot2". Podaci korišćeni za vizuelizaciju su iz [2]. Sivom bojom označene su populacije za koje nema podataka o varijabilnosti oba hipervarijabilna segmenta.



Slika 4. Filogenetsko stablo podhaplogrupe K1a13 zasnovano na kompletnim mitogenomskim sekvencama. Haplotip poreklom iz srpske populacije uokviren je crvenom bojom, < obeležava pozicije sa rekurentnim mutacijama, pozicije sa povratnim mutacijama su podvučene, pozicija sa transverzijom obeležena je sufiksom, del obeležava deleciju, novnodefinisane podhaplogrupe predstavljene su crvenim podebljanim slovima. Procene vremena nastanka podhaplogrupa u hiljadama godina (kya) prikazane su plavom (stopa zamena u kompletnom mitogenomu), zelenom (stopa zamena u kodirajućem regionu) i crvenom bojom (stopa sinonimnih zamena). Slika preuzeta iz [2].



Slika 5. Filogenetsko stablo podhaplogrupe L2a1k zasnovano na na kompletnim mitogenomskim sekvencama. Haplotip poreklom iz srpske populacije uokviren je crvenom bojom, < obeležava poziciju sa rekurentnom mutacijom, pozicije sa povratnim mutacijama su podvučene, redefinisana podhaplogrupa je u *italic* formi i obeležena je crvenom bojom, novodefinisane podhaplogrupe predstavljene su crvenim podebljanim slovima. Procene vremena nastanka podhaplogrupa u hiljadama godina (kya) prikazane su plavom (stopa zamena u kompletnom mitogenomu), zelenom (stopa zamena u kodirajućem regionu) i crvenom bojom (stopa sinonimnih zamena). Slika preuzeta iz [2].



Slika 6. Bajesov "skyline plot" na kojem je prikazana promena srednje hipotetičke efektivne veličine populacije tokom vremena procenjene na osnovu 226 kompletnih mitogenoma iz Srbije. Na x osi prikazano je vreme u hiljadama godina dok je na y osi prikazana vrednost N_e (efektivna veličina populacije pomnožena sa stopom mutacije). Preuzeto iz [55] uz dozvolu Springer Nature; dozvola preneti preko Copyright Clearance Center, Inc.



METODA GODINE 2022

METHOD OF THE YEAR 2022



Sekvenciranje dugih fragmenata – sledeći nivo genomskih istraživanja

Duška Savić-Pavićević,¹ Lana Radenković,¹ Luka Velimirov,¹ Nemanja Radovanović,¹

Anastasija Ninković,¹ Nemanja Garai,¹ Miloš Brkušanin,¹ Marko Panić,² Jovan Pešović¹

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

²Institut za virusologiju, vakcine i serume „Torlak“ Beograd

Kontakt: duska@bio.bg.ac.rs

Apstrakt

Sekvenciranje dugih fragmenata ili treća generacija sekvenciranja u realnom vremenu produkuje očitavanja pojedinačnih molekula DNK dužine od 1 kb do nekoliko Mb sa očuvanim epigenetičkim oznakama. Dostupne tehnologije su sekvenciranje pojedinačnih molekula u realnom vremenu (eng. *single-molecule real-time sequencing*, *PacBio*) i sekvenciranje kroz proteinske nanopore (*Oxford Nanopore Technologies*). *PacBio* tehnologija zasnovana je na detekciji ugradnje nukleotida od strane pojedinačnog molekula DNK polimeraze u realnom vremenu, korišćenjem fluorescencije kao surogat markera. *PacBio HiFi* očitavanja su dužine ~15 kb sa tačnošću >99,9%. *Oxford Nanopore* tehnologija izvodi sekvencu nukleotida iz promena u intenzitetu jonske struje dok DNK prolazi kroz stohastički senzor – proteinsku nanoporu. Može sekvencirati fragmente DNK u rasponu od pet redova veličina (20 bp do nekoliko Mb) sa tačnošću dupleks očitavanja >99,9% kada se koriste R10.4.1 nanopore. Sa elektronskim „čitanjem“ nukleinskih kiselina, inovacije kao što su minijturni uređaj veličine dlana sa cenom <1000 dolara, sekvenciranje na terenu, digitalno obogaćivanje ciljnih sekvenci (adaptivno uzorkovanje) i direktno sekvenciranje RNK, postali su stvarnost. Sekvenciranje dugih fragmenata omogućilo je kompletiranje sekvence genoma čoveka, objavljivanje drafta ljudskog pangenoma i ubrzalo je sekvenciranje genoma eukariota. Od uvođenja metode 2011. godine sekvencirano je ~1000 od 1065 genoma deponovanih u *NCBI* bazi. Puni potencijal metode u izučavanju transkriptoma i epigenoma biće vidljiv u godinama koje slede. Sekvenciranje dugih fragmenata postaje osnova precizne medicine efikasne za sve ljudske populacije i očuvanja biodiverziteta, i završilo je da bude metoda 2022. godine prema časopisu *Nature Methods*.

Ključne reči: sekvenciranje dugih fragmenata, treća generacija sekvenciranja, sekvenciranje kroz nanopore, *SMRT* sekvenciranje, genomika

Long read sequencing – the next level in genomic research

Duška Savić-Pavićević,¹ Lana Radenković,¹ Luka Velimirov,¹ Nemanja Radovanović,¹
Anastasija Ninković,¹ Nemanja Garai,¹ Miloš Brkušanin,¹ Marko Panić,² Jovan Pešović¹

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

²Institute of Virology, Vaccines and Sera “Torlak”, Belgrade

Correspondence: duska@bio.bg.ac.rs

Abstract

Long read or third-generation sequencing produces reads from 1 kb to several Mb in length with preserved epigenetic marks, at the single-molecule level and in real-time. Single-molecule real-time sequencing (PacBio) and protein nanopore sequencing (Oxford Nanopore Technologies) are available technologies. PacBio technology is based on monitoring the nucleotide incorporation by a single DNA polymerase molecule in real time using fluorescence as a surrogate marker. PacBio HiFi reads are ~15 kb in length with >99.9% accuracy. Oxford Nanopore sequencing infers nucleotide sequence from the changes in ion current intensity while DNA passes through a stochastic sensor – a protein nanopore. It can sequence DNA fragments ranging in five orders of magnitude (20 bp to several Mb), with duplex read accuracy >99.9% when using R10.4.1 nanopores. Innovations such as a miniature device of the palm-size with a price <1000 dollars, sequencing in the field, digital enrichment of target sequences (adaptive sampling) and direct RNA sequencing have become a reality with the electronic „reading“ of nucleic acids. Long read sequencing enabled completing the human genome sequence and releasing a draft of the human pangenome reference. It has also accelerated genome sequencing of eukaryotic species. Out of 1065 genomes deposited in the NCBI database, ~1000 were sequenced since its development. The full potential of the method in studying transcriptome and epigenome will be visible in the years to come. Long read sequencing is becoming the basis of precision medicine effective for all human populations and biodiversity conservation and was announced as the method of the year 2022 according to Nature Methods.

Key words: long read sequencing, third-generation sequencing, nanopore sequencing, SMRT sequencing, genomics

Otkriće sekundarne strukture DNK 1953. godine omogućilo je razumevanje principa prenošenja i korišćenja genetičkog materijala. Za obuhvatnije razumevanje sadržaja, funkcije i varijabilnosti genetičke informacije bilo je potrebno odrediti redosled nukleotida u genomima. Imperativ je ubrzo postao razvoj metoda za sekvenciranje DNK ili kolokvijalno „čitanje“ DNK. Svedoci smo da je svaki napredak u tehnologijama sekvenciranja DNK omogućavao revolucionarne korake napred koji su bili i ostali ključni za razumevanje bioloških fenomena i impakt koji biologija ima u nauci i društvu.

Tehnologije sekvenciranja DNK – konstantno pomeranje granica

Prva generacija sekvenciranja

Prve metode sekvenciranja DNK, Maksam-Gilbertova [Maxam-Gilbert] [1] i Sangerova [Sanger] [2], razvijene su sredinom sedamdesetih godina prošlog veka. Sangerovom metodom je 1977. godine prvo pročitani genom faga ϕ -X174 dužine 5386 nukleotida (nt) [3]. Zatim je 1981. godine sekvenciran mitohondrijski genom čoveka dužine 16569 baznih parova (bp) [4], a 1982. godine genom λ faga dužine 48502 bp [5]. Sangerova metoda oslanja se na enzimsku sintezu DNK uz korišćenje obeleženih dideoksi nukleotida (terminatora sinteze) i elektroforetsko razdvajanje fragmenta DNK. Metoda sekvencira jedan po jedan fragment DNK dužine 200-800 bp [2], a tačnost sekvenciranja (procenat ispravno očitanih nukleotida nakon poravnjanja na referentnu sekvencu, eng. *sequencing accuracy*) je veća od >99,9% i uzima se kao standard za sekvenciranja visoke tačnosti. Automatizacija Sangerove metode, koju je komercijalizovala kompanija *Applied Biosciences*, kulminirala je 2003. godine objavljivanjem prve referentne sekvence 92% genoma čoveka dužine 2,86 gigabaze (Gb ili 10^9 bp) i završetkom Projekta „Genom čoveka“ (eng. *Human Genome Project*) [6]. Projekat slovi za najambiciozniji poduhvat u biologiji, trajao je čitavih 13 godina i koštao oko 3 milijarde dolara. Vodeći naučnici projekta, Frensis Kolins [Francis Collins] i Kreg Venter [Craig Venter], složili su se da je ovo izuzetno dostignuće samo početak napora da se razume genom (čoveka) i složenost bioloških sistema, kao i da se stečena znanja primene za dobrobit čovečanstva. Od tog perioda, najpropulzivnija grana biologije postaje genomika.

Druga generacija sekvenciranja

Niska propusnost i visoka cena Sangerove metode predstavljali su ograničenje za sekvenciranje genoma velikog broja bioloških vrsta i sekvenciranje na populacionoj skali u cilju razumevanja genetičke varijabilnosti. Progres je stimulisan već 2004. godine kada su američki Nacionalni instituti za zdravlje (eng. *National Institutes of Health, NIH*) objavili poziv za Projekat revolucionarnih tehnologija za sekvenciranje genoma, vredan 70 miliona dolara sa ciljem da se u narednih 15 godina dostigne cena sekvenciranja genoma čoveka od 1000 dolara. Projekat je doprineo razvoju raznovrsnih i inovativnih tehnologija sekvenciranja DNK, uključujući i današnje vodeće tehnologije druge i treće generacije [7-9].

Prva komercijalizovana i dominantna tehnologija druge generacije sekvenciranja, poznatija kao sekvenciranje sledeće generacije (eng. *next generation sequencing, NGS*) je *Solexa-Illumina* tehnologija. Njena ključna novina bila je visoka propusnost zbog masivnog paralelnog sekvenciranja miliona fragmenata DNK omogućenog klonalnom amplifikacijom na čvrstoj podlozi koja pravi klastere sastavljene iz ogromnog broja identičnih fragmenata DNK [10,11]. Sledi enzimaska sinteza DNK u svakom klasteru tokom koje DNK polimeraza kao supstrate koristi fragmente DNK iz klastera i fluorescentno obeležene nukleotide koji imaju blokiranu 3'-OH grupu (reverzibilne terminatore) [12]. Nakon ugradnje jednog nukleotida, sinteza se zaustavlja da bi se fluorescentni signal paralelno detektovao u milionima klastera. Sledi uklanjanje blokatora sa 3'-

OH grupe ugrađenog nukleotida i proces se ponavlja kako bi se odredila sekvenca DNK u svakom od klastera [7,8]. Sekvenca fragmenata od 50 do 500 bp može se odrediti sa tačnošću >99,9% [12,13], tako da metoda zajedno sa Sangerovom spada u grupu tehnologija sekvenciranja kratkih fragmenata (eng. *short-read sequencing*).

U poslednjih desetak godina *Illumina* tehnologija omogućila je konstantan rast obima sekvenciranja i postala je zlatni standard. Od sekvenciranja 1,3 genoma čoveka sa pokrivenošću od 30 puta na prvim aparatima, danas samo jedan aparat iz serije *NovaSeqX* može sekvencirati više od 20000 humanih genoma godišnje po ceni jednog genoma od 200 dolara. Povećanje propusnosti metode omogućilo je i prve populacione projekte poput „1000 genoma“ [14]. Tehnologija je primenjena i za očitavanje metoda funkcionalne genomike koje izučavaju strukturu hromatina, interakciju genoma i transkripcionih faktora, transkriptom, interakciju RNK i RNK-vezivnih proteina, kovalentne modifikacije RNK i translatom [15-18], omogućivši ne samo brz napredak genomike, već i razvoj transkriptomike, epigenomike i epitranskriptomike. Neverovatan prodor i široka dostupnost tehnologije rezultovali su ogromnim brojem naučnih otkrića vezanih za funkcionisanje i varijabilnost genoma, koji su bezmalo obeležili poslednjih 10-15 godina. Dobri primeri za to su prepoznavanje funkcionalnosti nekodirajućih regiona genoma eukariota, uključujući i gene za duge nekodirajuće RNK [15,19], ili razumevanje evolucije čoveka kroz otkrića vezana za genome praištorskih ljudi koja su Svante Pabu [Svante Pääbo] donela Nobelovu nagradu za fiziologiju i medicinu 2022. godine [20]. *Illumina* tehnologija je sekvenciranje DNK učinila i glavnom kliničkom alatom u dijagnostici retnih bolesti i personalizovanoj medicini, pružajući nova znanja o genetici humanih bolesti i postavljajući osnov za razvoj inovativnih terapeutika [21,22]. Potencijal druge generacije sekvenciranja prepoznao je časopis *Nature Methods* proglašivši je još u njenom ranom razvoju za metodu 2007. godine [23].

Treća generacija sekvenciranja

Iako je impakt NGS tehnologije na nauku i društvo impresivan, tempo tehnoloških inovacija u sekvenciranju nukleinskih kiselina nije opao ni u jednom trenutku. Težilo se razvoju tehnologija sekvenciranja dugih fragmenata (eng. *long-read sequencing*) kako bi se prevazišla ograničenja tehnologije kratkih fragmenata u sekvenciranju genoma viših eukariota i razumevanju transkriptoma. Dve dominantne tehnologije sekvenciranja dugih fragmenata su sekvenciranje pojedinačnih molekula u realnom vremenu (eng. *single-molecule real-time, SMRT*) kompanije *Pacific Biosciences (PacBio)* [24] i sekvenciranje kroz proteinske nanopore kompanije *Oxford Nanopore Technologies (ONT)* [25]. Nedavno su *PacBio HiFi* (eng. *high-fidelity*) očitavanja dužine ~15 kb [26] i veoma duga dupleks *ONT* očitavanja dužine ~100 kb (eng. *ultra-long reads*) dobijena kroz nanopore R10.4.1 [27] dostigli tačnost >99,9%. Ovaj metodološki napredak omogućio je Konzorcijumu od telomere do teleomere (eng. *Telomere-to-Telomere Consortium, T2T*) da pročita preostalih 8% genoma čoveka i učini dostupnim prvi kompletan referentni genom čoveka T2T-CHM13 dužine 3055 Gb [28]. Zbog ovog dostignuća i potencijala sa širokom primenom u svim oblastima genomske istraživanja, sekvenciranje dugih fragmenata zavredelo je bude metoda 2022. godine prema časopisu *Nature Methods* [29].

Konceptualne novine koje treća generacija sekvenciranja donosi su: sekvenciranje pojedinačnih molekula nukleinskih kiselina, sekvenciranje u realnom vremenu, sekvenciranje dugih fragmenata od 1 kilobaze (kb, 10^3 bp) do čak nekoliko megabaza (Mb, 10^6 bp) i sekvenciranje nativnih molekula DNK sa očuvanim epigenetičkim modifikacijama [9]. Dodatne novine jedinstvene za sekvenciranje kroz nanopore su elektronsko sekvenciranje, minijaturizacija aparata do veličine dlana, sekvenciranja na terenu, digitalno obogaćivanje ciljnih fragmenata DNK (eng. *adaptive sampling*) i direktno sekvenciranje RNK [25]. Razvoje treće generacije sekvenciranja otvara neverovatne mogućnosti za dalji progres u genomici i srodnim oblastima, pomerajući

granice u biološkim istraživanjima i oblastima u kojima primena bioloških dostignuća unosi konceptualne promene. Pored toga, primena nanopora ima potencijal da sekvenciranje nukleinskih kiselina učini dostupnim u meri uporedivom sa dostupnošću kompjuterskih tehnologija nakon uvođenja prenosivih računara.

SMRT sekvenciranje – jedan molekul DNK polimeraze kao mašina za sekvenciranje jednog molekula DNK u realnom vremenu

Razvoj i princip SMRT sekvenciranja

Slično Sangerovoj i *Illumina* tehnologijama, *SMRT* tehnologija koristi enzimsku sintezu DNK i sekvencu određuje koristeći fluorescenciju kao surogat marker. Međutim, ono što joj omogućava sekvenciranje pojedinačnih, nativnih, dugih fragmenata DNK u realnom vremenu je korišćenje procesivnosti i realne brzine polimerizacije DNK polimeraze [24]. Dve inovacije su bile ključne za razvoj tehnologije. Prva je vezana za nukleotide sa fluorobojom vezanom preko linkera za 5'- γ -fosfat (eng. *phospholinked nucleotides*), koji obezbeđuju kontinuiranu sintezu DNK [30,31]. Druga inovacija je čip sa talasovodima nultog moda (eng. *zero-mode waveguides*, *ZMW*) koji paralelno detektuje aktivnost na hiljade pojedinačnih molekula DNK polimeraza u prisustvu visoke koncentracije nukleotida u vremenskoj skali u milisekundama [32]. Ovako dizajnirani čip bio je neophodan za prećenje sinteze DNK u realnom vremenu i visoku propusnost metode. *ZMW* čipove razila je kompanija *PacBio* pod nazivom *SMRT* ćelije (eng. *SMRT cell*), a potom i komercijalizovala metodu 2011. godine.

SMRT ćelija sadrži na stotine hiljada ili nekoliko miliona *ZMW*-ova u kojima se fluorescencija paralelno detektuje. Sam *ZMW* je nanofotonska struktura čiji dizajn rešava problem detekcije aktivnosti pojedinačnih molekula DNK polimeraza koji nastaje zbog inherentnog svojstva enzima da interval između ugradnje dva nukleotida stohastički varira. Predstavlja minijaturni cilindar perforiran u tanki metal, ima providno dno i prečnik od nekoliko desetina nanometara (nm) koji je manji od talasne dužine svetlosti kojom se ekscitiraju fluoroboje (slika 1A) [32]. Kada se laserskom svetlošću osvetli *ZMW*, talasna dužina svetlosti je velika da bi prošla kroz providno dno. Međutim, svetlost se ne zaustavlja na samom providnom dnu već oslabljena prodiere u donji deo *ZMW*-a do njegove visine od 20-30 nm, čime se stvara opservaciona zapremina od svega dvadesetak zeptolitara (10^{-21} litara). Minijaturna opservaciona zapremina, za više od tri reda veličine manja u odnosu na konfokalnu fluorescentnu mikroskopiju, obezbeđuje detekciju ekscitacije jedne fluoroboje uprkos relativno visokim koncentracijama obeleženih nukleotida (mM do mM) potrebnih DNK polimerazi za brzu, tačnu i procesivnu sintezu DNK [32]. Tako, u *ZMW* prečnika 100 nm, prosečna zauzetost opservacione zapremine je ~0,01 do 1 molekula obeleženog nukleotida. Pored navedenih osobina *ZMW*-a, specifična površinska hemija na providnom dnu favorizuje imobilizaciju DNK polimeraze dok je inhibirana nespecifična adsorpcija obeleženih nukleotida [33].

U instrumentu za *SMRT* sekvenciranje kontinuirano se vrši multilaserska ekscitacija i detekcija koja verno diskriminiše četiri spektralno različite fluoroboje, paralelno u ogromnom broju *ZMW*-ova. Puls fluorescenције detektuje se pri emitovanju 99% upadne svetlosti [34]. Puls počinje vezivanjem obeleženog nukleotida za DNK polimerazu, traje dok je nukleotid vezan za polimerazu i završava nakon ugradnje nukleotida u rastući DNK lanac (slika 1A). Oslobođeni pirofosfat sa vezanom fluorobojom brzo difunduje iz opservacione zapremine *ZMW*-a. Zadržavanje ispravnog nukleotida u aktivnom centru DNK polimeraze je mnogo duže od vremena zadržavanja neispravnog nukleotida (<1 ms) ili difuzije slobodnih nukleotida, prisutnih u visokim, biološki relevantnim koncentracijama, u opservacionu zapreminu (2 do 10 ms), što se detektuje kao kon-

stantan pozadinski signal koji je mnogo niži u odnosu na puls fluorescencije (slika 1A). Nakon ugradnje jednog nukleotida, sledi translokacija matrice, a DNK polimeraza u aktivno mesto vezuje sledeći nukleotid, što označava početak sledećeg pulsa. Redosled pulsa fluorescencije zabeležen u dijagramu zavisnosti intenziteta pulsa u od vremena prevodi se u redosled nukleotida (slika 1A). Trajanje pulsa fluorescencije zavisi od brzine ugradnje nukleotida DNK polimerazom, dok je trajanje interpulsa kombinacija vremena translokacije i vezivanja sledećeg ispravnog nukleotida. U dokazu koncepta metode korišćena je j29 polimeraza jer je izuzetno procesivna i sastoji se od jedne subjedinice [24].

Biblioteka za sekvenciranje se sastoji od topološki kružnih molekula DNK nastalih ligiranjem oba kraja nativnog dvolančanog DNK fragmenta sa jednolančanim adapterima koji imaju strukture ukosnice, te svako očitavanje sadrži sekvencu oba lanca DNK fragmenta. Za formirane kružne molekule vezuju se DNK polimeraza i prajmer komplementaran adapteru. Nakon nalivanja biblioteke na *SMRT* ćeliju po jedan kružni molekul DNK ulazi u *ZMW*, a DNK polimeraza se pozicionira na njegovo dno. Dodavanjem obeleženih nukleotida počinje sinteza DNK i detektuje se fluorescencija svakog ugrađenog nukleotida. S obzirom na to da se za pripremu biblioteke koriste nativni molekuli DNK i da DNK polimeraza sporije ugrađuje nukleotide ako se u matrici nalazi modifikovani nukleozid, prisustvo dužeg interpulsa u odnosu na referentnu amplifikovanu DNK, ukazuje na prisustvo epigenetičkih oznaka (slika 1A). Do sada su uspešno detektovani N6-metilandenozin, 5-metilcitidin, 5-hidroksimetilcitidin i 4-metilcitidin [35].

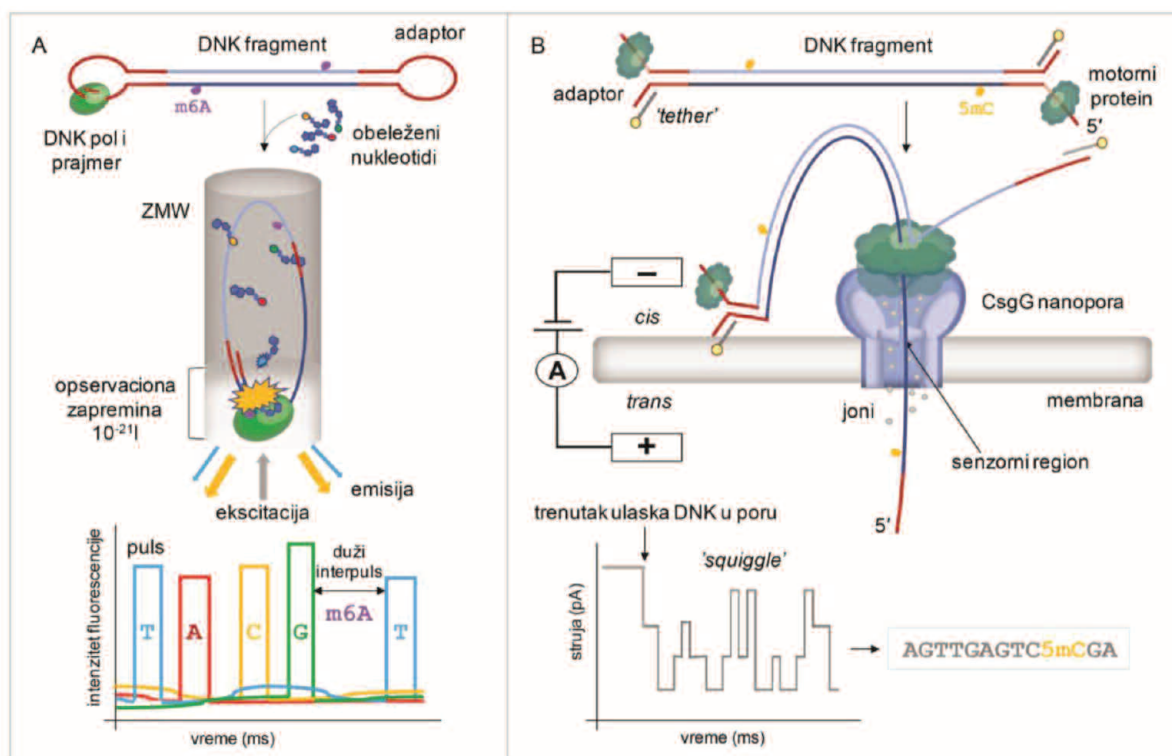
Dužina očitavanja, tačnost i prinos *SMRT* sekvenciranja

Prosečna dužina očitavanja *SMRT* sekvenciranja iznosi od jedne do nekoliko stotina kb, a glavni ograničavajući faktor je procesivnost DNK polimeraze. Metoda se prvo oslanjala na duga kontinuirana očitavanja (eng. *continuous long reads, CLR*). Zbog dužine DNK fragmenta >30 kb, DNK polimeraza je mogla uglavnom jednom ili ređe par puta da iskoristi kružni molekul DNK kao matricu, stvarajući tako *CLR*-ove sastavljene iz podočitavanja (eng. *subreads*). Tačnost sekvenciranja po podočitavanju (eng. *subread accuracy*) iznosi 85–92% [9]. Obrazac grešaka je nasumičan sa izuzetkom homopolimernih nizova dužih od pet nukleotida, koji se čitaju sa tačnošću od ~85%. Bioinformatičkim poliranjem (eng. *polishing*) podočitavanja pomoću sirovih podataka fluorescentnih pulseva dobijala se konsenzusna sekvencija veće tačnosti, ali standard od >99,9% tačnosti nije mogao biti dostignut. Još u originalnom radu o *SMRT* sekvenciranju predloženo je da bi kružno konsenzusno sekvenciranje (eng. *circular consensus sequencing, CCS*) moglo da poboljša tačnost metode. Uočeno je da poravnanje 15 očitavanja eliminiše slučajne, ali ne i sistemske greške u pojedinačnim očitavanjima dajući konsenzusnu sekvencu tačnosti 99,3% (eng. *consensus accuracy*) [24]. *CCS* podrazumeva da DNK polimeraza više puta iskoristi kružni molekul DNK kao matricu dajući jedno očitavanje sastavljeno iz podočitavanja koja i dalje imaju tačnost od 85–92%. Kako bi se postiglo da konsenzusna sekvencija izvedena iz podočitavanja dostigne tačnost >99,9% uveden je korak pre-ekstenzije u kome DNK polimeraza započinje sintezu DNK bez laserskog očitavanja [26]. Na ovaj način „eliminišu“ se oštećeni fragmenti DNK na kojima polimeraza biva zarobljena. Na osnovu zapažanja da DNK polimeraza u *ZMW*-u uspešno sintetiše fragmente od ~150 kb i da je potrebno da ~10 puta prepíše jednolančanu kružnu DNK kako bi se postigla tačnost od 99,9%, procenjeno je da bi optimalna dužina fragmenata DNK u *SMRT* biblioteci trebalo da bude 10-15 kb. Danas se ovim pristupom sekvenciraju fragmenti prosečne dužine ~15 kb, a maksimalno 25 kb sa tačnošću konsenzusne sekvence >99,9%, zbog čega se naziva *HiFi* očitavanje. Korišćenjem *HiFi* očitavanja moguće je *de novo* asemblirati genom čoveka sa prosečnom tačnošću >99,8% [26].

Do sada je proizveden nekoliko generacija aparata za *SMRT* sekvenciranje. Aparat *RSII* koristio je *SMRT* ćeliju sa ~150000 *ZMW*-ova. Prinos sekvenciranja (količina dobijenih podataka po jednoj ćeliji/eksperimentu,

eng. *sequencing yield*) po jednoj *RSII* ćeliji tokom *CLR* sekvenciranja iznosila je 1-10 Gb [9]. *Sequel II* aparat iz sledeće generacije koristi *SMRT* ćeliju sa 8 miliona *ZMW*-ova sa prinosom *CLR* sekvenciranja od 160 Gb i *CCR* sekvenciranja od 15-25 Gb [9]. Verzija *Sequel IIe* može primiti pet *SMRT* ćelija, što godišnje omogućava sekvenciranje 300 genoma čoveka. Aparat poslednje generacije, *Revio* čija je prodaja počela u prvoj polovini 2023. godine, koristi *SMRT* ćelije sa 25 miliona *ZMW*-ova i prinosom sekvenciranja od 90 Gb. Jedna ćelija je dovoljna za sekvenciranje genoma čoveka po ceni od 750-1000 dolara, a pošto aparat prima četiri ćelije, godišnje može da sekvencira 1300 genoma čoveka [36].

Razvoj tehnologija sekvenciranja dugih fragmenata prati razvoj različitih pristupa za izolovanje i prečišćavanje DNK visoke molekulske težine (eng. *high molecular weight, HMW*) jer integritet DNK predstavlja dodatni ograničavajući faktor za dužinu sekvenciranih fragmenata. Tako, većina kompanija koje proizvode komplete za izolovanje DNK u ponudi ima i one za izolovanje *HMW* DNA. Vrlo često se koriste i različite metode za eliminaciju kratkih fragmenata ili odabir fragmenata željene veličine kako bi se dobila određena distribucija fragmenata i/ili poboljšao prinos sekvenciranja, imajući u vidu da kraći fragmenti brže difunduju kroz protočnu ćeliju i smeštaju se u *ZMW*. S obzirom da tehnologije dugih očitavanja koriste native molekule DNK, njihova mana je potreba za mikrogramskim (mg) količinama DNK.



Slika 1. Sekvenciranje dugih fragmenata. A) *SMRT* sekvenciranje (eng. *single-molecule real-time sequencing, Pacific Bioscience*). Biblioteka za sekvenciranje formira se ligiranjem dvolančanih nativnih fragmenata DNK i adaptera u obliku ukosnice. Nastaju kružni jednolančani molekuli DNK što omogućava sekvenciraju oba lanca datog fragmenata DNK. Nakon dodavanja DNK polimeraze i prajmera komplementarnog adapteru, biblioteka se naliva na protočnu ćeliju koja sadrži na milione talasovoda nultog moda – *ZMW*-ova (eng. *zero-mode waveguides*). Samo jedan kružni molekul DNK sa polimerazom i prajmerom staje u jedan *ZMW*, a sama polimeraza se privezuje za njegovo dno. Nakon dodavanja nukleotida obeleženih fluorobojama vezanim za 5'-g-fosfat, polimeraza započinje sintezu DNK. Zbog opservacione zapremina *ZMW*-a od svega dvadesetak pikolitara (10^{-21} l) detektuje se ugradnja pojedinačnih nukleotida u jednom molekulu DNK kroz kontinuiranu multilasersku ekscitaciju i detekciju emitovane svetlosti iz pojedinačnog *ZMW*-a. Iz dijagrama zavisnosti intenziteta fluorescencije od vremena izvodi se sekvenca DNK. Na osnovu dužih interpulseva mogu se direktno „čitati“ epigenetičke oznake molekula DNK, npr. N6-metiladenozin i 5-metilcitolidin, jer modifikovani nukleozidi usporavaju kinetiku ugradnje nukleotida DNK polimerazom. B) Sekvenciranje kroz proteinske nanopore (eng. *Oxford nanopore sequencing, Oxford Nanopore Technologies*). Biblioteka za sekvenciranje se sastoji od nativnih dvolančanih fragmenata DNK ligiranih za adaptere koji sadrže motorni protein i hibridizuju sa 'privezivačem' (eng. *tether*). Nakon nalivanja na protočnu ćeliju 'privezivač' olakšava DNK fragmentu da stigne do pore i pridržava je za električno otpornu membranu uronjenu u rastvor elektrolita. Funkcija motornog proteina je da topi dvolančanu DNK i usporava kretanje jednolančane DNK kroz nanoporu. Nakon primene konstantnog napona, jednolančana DNK prolazi kroz nanoporu a intenzitet struje opada. Promene intenziteta struje su najizraženije pri prolasku DNK kroz senzorni region nanopore. Iz strujnog zapisa u funkciji vremena sastavljenog iz kontekstualne informacije nastale kada se nekoliko (pet) nukleotida istovremeno nađe u senzornom regionu, izvodi se sekvenca DNK. Iz strujnog zapisa moguće je „čitati“ epigenetičke oznake, jer svaka modifikacija nukleozida doprinosi promeni struje na specifičan način.

Sekvenciranje kroz proteinske nanopore – elektronsko „čitanje“ pojedinačnih molekula nukleinskih kiselina

Razvoj i princip sekvenciranja kroz proteinske nanopore

Dejvid Dimer [David Deamer] je još 1989. godine zabeležio ideju o direktnom sekvenciranju DNK: „Koncept – DNK će biti vođena kroz mali kanal, bilo razlikom u električnom potencijalu ili pH. Kanal će provoditi struju usled razlike u potencijalu. Kako svaka baza bude prolazila kroz kanal, dešavaće se promena u struji. Pošto su baze različite veličine, promena struje će biti proporcionalna (odgovarajućoj bazi), čime će davati indicaciju o kojoj je bazi reč. Detalji – Membrana mora biti veoma tanka. Kanal mora biti dimenzija preseka DNK, približno 1-2 nm. Porin? Komplement?“ [37]. Ova naizgled jednostavna ideja direktnog elektronskog „čitanja“ pojedinačnih molekula nukleinskih kiselina, a ne njihovih sintetičkih kopija ili fluorescencije kao surogat markera, razvijala se oko 25 godina. Trebalo je dostići veći broj tehnološki veoma izazovnih prekretnica. Razvoj tehnologije počeo je razvojem stohastičkih senzora koji na osnovu promene struje nastale usled prisustva ili prolaza nekog analita kroz sam senzor mogu identifikovati prirodu i koncentraciju analita [38]. Bilo je potrebno razviti i tehnike za detekcije strujnih promena reda veličine pikoampera (pA) u pojedinačnim senzorima (eng. *stochastic sensing*). Zbog biofizičke osobine provođenja jonske struje i nanometarskih dimenzija, membranske proteinske pore su bili kandidati za stohastičke biosenzore. Prvi stohastički biosenzor ili proteinska nanopora korišćena za detekciju nukleinskih kiselina bio je α HL bakterije *Staphylococcus aureus* i njegove genetički dizajnirane varijante [39-41]. Tokom razvoja sekvenciranja kroz nanopore, nešto kasnije korišćen je i porin A *Mycobacterium smegmatis* (MspA) [42]. Imajući u vidu da je najuži prečnik pore 1,4 nm kod α HL i 1,2 nm kod MspA moglo se očekivati da samo jednolančane nukleinske kiseline prolaze kroz poru. Ovi najuži regioni pora predstavljaju senzorni region (ili eng. *reading head*) odgovoran za diskriminaciju analita. Zatim je usledio dokaz da jednolančane DNK i RNK mogu da se kreću kroz poru α HL kada se primeni razlika potencijala dovodeći do blokade struje [39]. Određivanjem najverovatnijeg vremena translokacije nukleinskih kiselina, reda veličine mikrosekunda, i rezidualne struje tokom translokacije, pokazano je da je moguće razlikovati bazni sastav homopolimernih nukleinskih kiselina, kao i bazni sastav različitih homopolimernih segmenata u jednom molekulu RNK [30,40]. Nakon ovog uspeha, trebalo je skoro još 10 godina da se pokaže da je moguće identifikovati pojedinačne nukleotide u molekulu DNK imobilizovanom na modifikovanoj nanopori α HL [41], ali i 5-metilцитидин kada je upotrebljena modifikovana nanopora MspA [42]. Sledeći veliki izazov bilo je određivanje sekvence iz strujnih zapisa nastalih izuzetno brzim prolazom slobodnih nukleinskih kiselina kroz poru. Trebalo je, naime, rešiti problem smanjenja vremena njihovog kretanja za čak tri reda veličine, sa skale u mikrosekundama na skalu u milisekundama. Za „usporeenje“ provlačenja DNK kroz nanopore prvo su iskorišćene egzonukleaze [43,44], ali je tek upotrebom ϕ 29 polimeraze pokazano da je moguće dobiti informaciju o redosledu nukleotida u slobodnom molekulu DNK tokom njegovog prolaženja kroz proteinsku nanoporu [45,46]. Korišćenje procesivnih enzima koji manipulišu sa DNK, označenih kao motorni proteini u tehnologiji sekvenciranja kroz nanopore, ne samo da je omogućilo kontrolu kretanja slobodnih molekula DNK već i razdvajanje dvolančane DNK i održavanje jednolančanog regiona DNK u istegnutom stanju kao kada je jednolančana DNK imobilisana na poru. Zbog dužine senzornog regiona pore, trenutni signali struje ne odgovaraju zapisu jednog nukleotida već nizu od nekoliko nukleotida tako da milisekundni signali struje zavise od konteksta, odnosno tokom sekvenciranja čitaju se „reči“ a ne „slova“. Identifikacija nukleotida u strujnim signalima sa dodatnim informacijama, tzv. „pokretnim prozorima“, zahtevala je razvoj sofisticiranih algoritama kako bi se oni preveli u sekvencu nukleinske kiseline [49]. Sva ova akademska dostignuća, rezultovala su komercijalizacijom metode kada je kompanija *ONT* omogućila paralelizaciju identifikacije strujnog zapisa iz ogromanog broja

pojedinačnih pora (eng. *single-channel recording*) u cilju postizanja konkurentne propusnosti metode. Kroz program rane dostupnosti tehnologije 2014. godine (eng. *MinION Access Program*) i koncept otvorenog razvoja sa brzom razmenom podataka, poboljšani su protokoli za pripremu uzoraka i softveri za analizu podataka. Tehnologija je postala široko dostupna 2016. godine [25]. U poređenju sa ostalim tehnologijama, čini se da je *ONT* komercijalizovala tehnologiju u ranijoj fazi razvoja, što je čini težom ali i izazovnijom za implementaciju u istraživanjima.

Aparat za *ONT* sekvenciranje *MinION* je prvi prenosivi uređaj za sekvenciranje, veličine mobilnog telefona, težine 90 grama, napaja se preko USB priključka i košta >1000 dolara [25,48]. Aparat može primiti jednu *MinION* protočnu ćeliju (eng. *MinION flow cell*) koja sadrži 2048 nanopora utisnutih u električno otpornu polimernu membranu koja je uronjena u rastvor elektrolita. Po četiri pore su organizovane u 512 kanala, a svaki kanal je povezan sa posebnom elektrodom na senzornom čipu čija se aktivnost kontroliše pomoću mikroelektronskog čipa *ASIC* (eng. *application-specific integration circuit*) [48]. Zbog ove osobine, u jednom trenutku paralelno se detektuje aktivnost maksimalno 512 pora.

Priprema biblioteke za sekvenciranje podrazumeva ligiranje dvolančanih adaptera za čiji je jedan lanac privezan motorni protein, a za drugi je hibridizovan privezivač (eng. *tether*) (slika 1B). Privezivač je oligonukleotid sa holesterolom koji fragmentu DNK pomaže da stigne do pore i pridržava ga za membranu. Pri primeni konstantnog napona, kroz nanopore teče jonska struja koja omogućava da se negativno naelektrisani jednolančani molekul DNK kreće kroz nanopore od negativne (*cis*) ka pozitivnoj (*trans*) strani (slika 1B). Motorni protein provlači (usporava kretanje) nukleinsku kiselinu kroz nanoporu i ujedno topi sekundarne strukture tako da jednolančani „istegnuti“ molekul DNK prolazi kroz nanoporu. Tokom prolaza jednolančane nukleinske kiseline kroz nanoporu dolazi do trenutnih promena jonske struje koje uzrokuje nekoliko uzastopnih nukleotida prisutnih u senzornom regionu pore (slika 1B). Zapisi jonske struje, tzv. vijugave škrobotine (eng. *squiggle*), iz svake pojedinačne pore i to za svaki pojedinačni molekul DNK koji je prošao kroz datu poru, analiziraju se primenom algoritama mašinskog učenja, omogućavajući dobijanje sekvence pojedinačnih molekula nukleinskih kiselina u realnom vremenu (slika 1B). Modifikovani DNK nukleozidi uzrokuju karakteristične promene struje u poređenju sa nemodifikovanim, tako da se epigenetičke oznake DNK, kao što su 5-metilцитидин i 5-hidroksimetilцитидин, mogu takođe detektovati u realnom vremenu (slika 1B) [49,50].

Korišćenjem algoritama i kontrolisanjem napona u pojedinačnim nanoporama moguće je raditi digitalno obogaćivanje, odnosno preferencijalno sekvenciranje ciljnog fragmenta u uzorku DNK, poznato pod nazivom adaptivno uzorkovanje [25,51]. Dok lanac DNK prolazi kroz nanoporu, u realnom vremenu nastaje strujni zapis koji se poredi sa očekivanim obrascem strujnog zapisa ciljne sekvence. U slučaju njihovog poklapanja sekvenciranje se nastavlja, dok se u slučaju nepoklapanja menja napon u datoj pori (kanalu), lanac DNK se izbacuje iz pore tako da ona može primiti drugi lanac DNK. Adaptivno uzorkovanje uspešno je urađeno za ciljne regione u genomu λ faga i čoveka [51,52]. Digitalno obogaćivanje skraćuje vreme pripreme biblioteke i samog sekvenciranja. S obzirom da je aktivni „vek“ proteinskih nanopora oko 72 sata, skraćanjem trajanja jedne analize povećava se ukupan broj analiza koji se može uraditi na jednoj protočnoj ćeliji.

Dužina očitavanja, tačnost i prinos sekvenciranja DNK kroz proteinske nanopore

Superiornost sekvenciranja kroz nanopore je dužina očitavanja jer se metoda oslanja na fizičku translokaciju nukleinske kiseline i u teoriji bi mogla da bude neograničena. Ipak, prosečna dužina očitavanja iznosi 1-50 kb, N50 (dužina očitavanja na 50% svih dobijenih očitavanja sortiranih prema dužini) je 1-100 kb, maksimalne dužine su >1 Mb dok rekordna iznosi 4,2 Mb [53]. U praksi je limitirajući faktor za dužinu očitavanja

vanja integritet molekula DNK koji zavisi od očuvanosti biološkog uzorka i metoda za izolovanje DNK. Za izolovanje *HMW* DNK i obogaćivanje dugih fragmenata koriste se iste metode kao za *SMRT* sekvenciranje, dok se za ultra-duga očitavanja (>100 kb) preporučuje fenol-hloroformska ekstrakcija [9]. Eliminisanje kratkih fragmenata je preporučljivo jer zastupljeniji kraći fragmenti efikasnije ligiraju sa adapterima i prolaze kroz pore. Sa daljim poboljšanjem sadašnjeg pristupa u sekvenciranju kroz proteinske nanopore, limitirajući faktor bi mogla da bude i procesivnost motornog proteina. Iako je *ONT* metoda prepoznata kao tehnologija koja sekvencira duge i ultra-duge fragmente, od 2022. godine postala je jedina dostupna tehnologija koja sekvencira fragmente DNK u opsegu od pet redova veličina – od 20 bp do nekoliko Mb, na istim aparatima i sa istim načinom pripreme uzoraka [54].

Kroz kontinuirano poboljšanje senzitivnosti proteinskih nanopora, hemije za sekvenciranje i algoritama za pozivanje baza (eng. *basecalling*) iz strujnih zapisa, *ONT* je postala tehnologija koja po tačnosti parira drugim tehnologijama. Procenat ispravno očitanih nukleotida po jednom očitavanju (eng. *raw read accuracy*) iznosio je 61,8% za R6 nanopore (2015. godine) [55], zatim 98,3% za R9.4.1 nanopore i hemiju 110 (2019. godine) i 99,5% za R10.4.1 nanopore i hemiju V14 (2022. godine) [56]. Poslednja navedena verzija pora i hemije sa verovatnoćom >20% omogućava sekvenciranje oba lanca jednog molekula DNK (jednog po jednog) kroz istu poru, tako da sa razvojem algoritama za dupleks očitavanja tačnost sekvenciranja jednog molekula (eng. *single molecule accuracy*) iznosi >99,9% [56]. Sa povećanjem tačnosti pojedinačnog očitavanja povećava se tačnost konsenzusnih sekvenci (izvedenih iz preklapajućih pojedinačnih očitavanja) koja eliminiše nasumične greške. Konsenzusna sekvenca izvedena kombinovanjem pojedinačnih očitavanja pri targetnom sekvenciranju (eng. *single molecule consensus accuracy*) za R9.4.1 i R10.3 nanopore iznosi 99,995% pri pokrivenosti rRNA amplikona od 25 i 15 puta, redom [56], dostižući tačnost *HiFi* očitavanja, iako se konsenzusne sekvence generišu na različite načine. Pri asembliranju genoma tačnost konsenzusne sekvence (eng. *consensus accuracy*) izvedene na osnovu delimično preklapljenih očitavanja dobijenih kroz R10.4.1 nanopore iznosi 99,999% za bakterijski genom pri pokrivenosti 10-20 puta i 99,994% za genom čoveka pri pokrivenosti 40 puta [56].

Najznačajniji napredak u tačnosti tehnologije postignut je uvođenjem R9 nanopora 2016. godine [57] koje predstavljaju membranski protein CsgG (eng. *Curli production assembly/transport component*) bakterije *E. coli* genetički modifikovan na takav način da je prečnik senzornog regiona smanjen sa 1,2 na 0,9 nm [58-60]. Dužina senzornog regiona je 2,0 nm i u jednom trenutku ga istovremeno okupira pet nukleotida. R10.4.1 je prva nanopora sa dva senzorna regiona (eng. *dual-constriction nanopore*). Jedan senzorni region je u proteinu CsgG, dok se drugi nalazi u 35 aminokiselina dugom N-terminalnom delu CsgF proteina [59]. CsgF protein je partner proteina CsgG, a njegov N-terminalni deo se „umeće“ u deo CsgG pore orijentisane ka *trans* strani membrane u protočnoj ćeliji. Dodavanje drugog senzornog regiona omogućava visoko tačno sekvenciranje homopolimernih regiona dužine do 10 nukleotida [59], što je poznata greška obe tehnologije sekvenciranja dugih fragmenta [9,25], a trenutno osobina po kojoj *ONT* očitavanja nadmašuju *HiFi* očitavanja.

ONT je tehnologija koju odlikuje široka skalabilnost. Prosečan prinos sekvenciranja po *MinION* ćeliji je 10-15 Gb, a maksimalna 50 Gb za 72 sata pri brzini sekvenciranja od 420 nt/sec [48]. Razvijen je adapter za *MinION* aparat koji prima *Flongle* ćelije sa svega 128 pora i maksimalnim prinosom sekvenciranja od 2,8 Gb za 16 sati [48]. Aparati veće propusnosti su *GirdION* i *PromethION* [48]. *GirdION* prima pet *MinION* ili *Flongle* ćelija koje se mogu nezavisno koristiti, tako da je maksimalni prinos sekvenciranja 250 Gb. *PromethION* je namenjen za projekte na populacionoj skali sa dostupnošću verzija koje primaju 2, 24 ili 48 *PromethION* ćelija sa ~6000 nanopora organizovanih u 2675 kanala. Poseban prinos sekvenciranja *PromethION* ćelija je 208 Gb, što odgovara količini po-

dataka dobijenih sekvenciranjem dva genoma čoveka pokrivenosti 30 puta [53], a na godišnjem nivou sa maksimalnim iskorišćenim resursima može sekvencirati ~15000 genoma. Sa maksimalnim prinosom sekvenciranja ćelija od 290 Gb i uz paralelno korišćenje 48 ćelija *PromethION* može se proizvesti ~14 Tb podataka za 72 sata.

Sekvenciranje native RNK kroz proteinske nanopore

Primenom *ONT* tehnologije mogu se direktno sekvencirati nativni molekuli RNK sa poli(A) repom, uključujući i epitranskriptomске oznake [35,60,61]. Za pripremu biblioteke koriste se specifičan adapter sa jednonančanim poli(T) nizom koji hibidizuje sa poli(A) repom nativnih RNK i dalje omogućava ligiranje adaptera za sekvenciranje sa motornim proteinom, nakon čega se biblioteka naliva na protočnu ćeliju. U cilju dobijanja stabilnije biblioteke i povećanja prinosa sekvenciranja može se uraditi reverzna transkripcija nakon vezivanja adaptera sa poli(T) nizom, a nastali RNK-cDNK hibrid se ligira za adapter za sekvenciranje. Motorni protein je tako orijentisan, da i u ovom slučaju kroz nanoporu prolazi nativna RNK. Dužina sekvenciranih molekula RNK odgovara dužini nativnih RNK. Jedna *MinION* protočna ćelija sa R9 porama daje 1000000 očitavanja, prinos sekvenciranja je 1-3 Gb, brzina ~70 nt/s i tačnost 83–86% [48]. Očekuje se da se brzina sekvenciranja RNK poveća na 120nt/s kroz R10.4. pore.

Genomika – ulazak u novu brzinu

Genomi viših eukariota, čiji je prototip genom čoveka, sadrže duge nizove ponovljenih sekvenci i segmentalne duplikacije (nizove >1 kb koji su prisutni na više mesta u genomu i dele >90% identičnosti u sekvenci) koje su slabo izučene zbog ograničenja u dužini očitavanja Sangerovog i *Illumina* sekvenciranja. Jedan od glavnih motiva razvoja metoda sekvenciranja dugih fragmenata upravo je bilo sekvenciranje složenih genoma viših eukariota. Teži se uvidu u strukturu genoma i dubljem razumevanju funkcije, evolucije i varijabilnosti genoma. Od posebnog interesa su genetičke varijante za koje su tehnologije kratkih očitavanja „slepe“. Takve su strukturne varijante (nizovi nukleotida >50 bp koji uključuju insercije, delecije, inverzije ili translokacije DNK segmenata, eng. *structural variants*) i varijante u broju kopija (nizovi nukleotida koji se razlikuju u broju kopija, eng. *copy number variants*). Već sada se može reći da su metode sekvenciranja dugih fragmenata unele revoluciju u genomiku eukariota. Od 2022. godine dostupan je prvi kompletan referentni genom čoveka T2T-CHM13 [22], dok je u maju 2023. godine objavljen prvi draft ljudskog pangenoma [62]. Od ukupno 1065 deponovanih genoma eukariota u *NCBI* (eng. *National Center for Biotechnology Information*) bazi, ~1000 je sekvencirano nakon razvoja sekvenciranja dugih fragmenata, a broj sekvenciranih genoma u prvoj polovini 2023. godine je skoro dostigao broj sekvenciranih u prethodnoj godini [63].

„Nepročitanih“ 8% genoma čoveka nakon završetka Projekta „Genom čoveka“ sastojao se iz ponovljenih sekvenci u centromerama (2%), sekundarnim suženjima u hromozomima 1q, 9q, 16q (1%), akrocentričnim ručicama hromozoma 13p, 14p, 15p, 21p, 22p (2%), distalnom regionu hromozoma Yq (1%) i euhromatinskom regionu (1%) [6]. Ovi regioni genoma ostali su prisutni u poslednjoj verziji donedavno jedine dostupne referentne sekvence genoma GRCh38 (eng. *Genome Reference Consortium build 38*) sastavljene iz 998 kontiga (kontinuiranih sekvenci dobijenih slaganjem preklapajućih očitavanja, eng. *contig*) [64]. Konzorcijum *T2T* radio je na asembliranju kompletnog genoma čoveka u kome jedna kontiga odgovara jednom celom hromozomu (eng. *telomere-to-telomere chromosome assemblies*), a ključnu ulogu imalo je *ONT* sekvenciranje ultra-dugih fragmenata sa visokom pokrivenošću genoma [22]. Referentni T2T-CHR13 genom dobijen je iz trofoblastnih ćelija sa kompletnom hidatidiformnom molom (eng. *complete hydatidiform mole*), poremećajem usled koga su izgubile genom majke i duplicirale genom oca. Suštinski, priroda genoma 46, XX CHR13 je haploidna, a uz stabilan kariotip bio je logičan izbor *T2T* konzorcijuma. T2T-CHR13 referentni

genom čoveka je dužine 3,055 Gb sa skoro 200 Mb dodate sekvence koja potpuno pokriva 8% nedostajuće sekvence (sa izuzetkom nekih nizova ribozomske DNK koje treba razrešiti). Dodata sekvenca obuhvata centromerne α -satellite, pericentromerne *HSat1-3* satellite, koji zajedno čine 5,7% genoma, oko 400 gena za ribozomske RNK i druge sekvence. Sadrži 1956 predikcija za gene, od kojih su 99 protein-kodirajući, i 3,7 miliona novih tačkastih varijanti (eng. *single-nucleotide variants*). Nedavnim objavljivanjem T2T sekvence hromozoma Y, dobijena je potpuna i sveobuhvatna referentna sekvenca za sva 24 hromozoma čoveka [65]. Y hromozom je dobio >30 Mb nedostajuće sekvence u regionima sastavljenim iz dugih palindroma, tandemski ponovljenih sekvenci i segmentalnih duplikacija, kao i 41 protein-kodirajući gen. T2T-CHR13 referentni genom dopunjen T2T sekvencom hromozoma Y prvi put omogućava izučavanje funkcije, varijabilnosti i evolucije ponovljenih centromernih regiona genoma na nivou pojedinačnih nukleotida.

Iako dostignuća od ogromnog značaja, GRCh38 i T2T-CHR13 referentni genomi ne daju verodostojnu informaciju o genetičkoj varijabilnosti ljudskih populacija, posebno strukturnim varijantama koje imaju visoku stopu mutacije [66] i važne su sa biomedicinskog i evolucionog značaja. Npr., *de novo* asembliranje genoma Tibetanaca pokazalo je da strukturne varijante specifične za ovu populaciju imaju važnu ulogu u njenom prilagođavanju na veliku nadmorsku visinu [67], dok 22q11.2 delecioni sindrom sa učestalošću ~1 u 1000 fetusa [68] i mutacija vezana za spinalnu mišićnu atrofiju sa učestalošću nosilaca 1 u 40 [69] nastaju usled nehomologne *de novo* mejotičke rekombinacije u regionima segmentalnih duplikacija. Zato međunarodni Konzorcijum za referentni ljudski pangenom (eng. *Human Pangenome Reference Consortium*) ima za cilj da sekvencira genome 350 osoba različitog porekla do sredine 2024. godine korišćenjem sekvenciranja dugih fragmenata i konstruiše referentni ljudski pangenom koji će sadržati veliki broj varijantnih sekvenci i bolje reprezentovati populacionu varijabilnost. Na osnovu *de novo* asembliranih genoma 47 osoba sa razdvojenim kopijama majčinih i očevih hromozoma (eng. *phased de novo genome assembly*) dobijena je prva draft sekvenca ljudskog pangenoma [62]. Iako je njegova tačnost od 99% za barem jedan red veličine manja od tačnosti referentnih genoma GRCh38 i T2T-CHR13, broj identifikovanih strukturnih varijanti po uzorku iznosi 25000 u odnosu na 7500 identifikovanih *Illumina* tehnologijom [66]. Očekuje se da će referentni ljudski pangenom omogućiti uključivanje desetina hiljada dodatnih alela strukturnih varijanti u studije asocijacije na nivou genoma, da će uz pristupačnije sekvenciranje dugih fragmenata povećati dijagnostički prinos, poboljšati predviđanje i lečenje bolesti, a preciznu medicinu učiniti efikasnom za sve populacije.

Izučavanje varijanti u broju kopija, čak i na nivou samo jednog gena imalo je velikih metodoloških ograničenja koja mogu biti prevaziđena primenom sekvenciranja dugih fragmenata. Kao primer se mogu navesti bolesti uzrokovane ekspanzijama tandemskih ponovljenih motiva, koje su uzrok >50 neuroloških bolesti [70]. Uzročni geni za ove bolesti otkriveni su uglavnom ili devedesetih godina prošlog veka korišćenjem mapa vezanosti genetičkih markera i *Southern blot* metode ili tek poslednjih par godina primenom sekvenciranja dugih fragmenata [70]. Sekvenciranje dugih fragmenata je od pomoći i za bolje razumevanje fenotipske varijabilnosti ovih bolesti. Na primer, miotonična distrofija tipa 1 je jedna od fenotipski najvarijabilnijih monogeničkih bolesti. Izučavanje individualne varijabilnosti bolesnika zasniva se na primeni *small-pool* PCR-a kojim se detektuje broj ponovljenih motiva, glavna ali ne i jedina genetička varijabla koja doprinosi razvoju fenotipa [71-73]. Obogaćivanjem ciljnog lokusa pomoću Cas9 usmerene ligacije adaptera i sekvenciranjem kroz nanopore [74] moguće je u jednom eksperimentu meriti i druge (epi)genetičke varijable koje oblikuju fenotip miotonične distrofije tipa 1: stepen somatske nestabilnosti ekspanzije, strukturne varijacije u ekspanzijama i nivo metilacije DNK [71-73].

Sekvenciranje dugih fragmenata i kompletna metodologija koja se koristi za poboljšanje sekvence genoma čoveka primenjuje se za sekvenciranje genoma životinja i biljaka. U toku je međunarodni Projekat

„Genomi kičmenjaka“ (eng. *Vertebrate Genomes Project*) čije je cilj asembliranje visoko kvalitetnih, kompletnih referentnih genoma za ~70000 današnjih vrsta kičmenjaka [75], kao i globalni Projekat „Org.one“ kompanije ONT čiji je cilj sekvenciranje genoma kritično ugroženih vrsta u cilju očuvanja biodiverziteta [76]. Sekvence pangenoma paradajza i krompira, objavljene 2022. godine, ukazuju da strukturne varijante povećavaju moć identifikacije genetičkih faktora koji se nalaze u osnovi osobina važnih za poljoprivredu [77,78].

Transkriptomika i epitranskriptomika – na horizontu

Karakterizacije transkriptoma i epitranskriptoma su od suštinskog značaja za razumevanje korišćenja genetičke informacije tokom razvića i u odgovoru ćelije na signale u fiziološkim uslovima i patološkim stanjima. RNK sekvenciranje zasnovano na reverznoj transkripciji, amplifikaciji PCR-om i *Illumina* sekvenciranju fragmenata od 150-200 bp, omogućilo je katalogizaciju transkriptoma ogromnog broja ćelija praćenu identifikacijom novih gena i uvidom u diferencijalnu ekspresiju genoma, alternativnu obradu RNK i opštu zastupljenost određenih epitranskriptomskih oznaka [15,18,19]. Stečena nova znanja iz biologije RNK eukariotske ćelije traže integraciju kako bi se dobio kompletniji uvid u složenost i plastičnost (epi)transkriptoma. Sekvenciranje dugih fragmenata, posebno direktno sekvenciranje RNK, upravo omogućava izučavanje međusobne zavisnosti i dinamičnosti različitih varijabli molekula RNK, uključujući i modifikacije nukleozida od kojih su mnoge slabo izučene.

SMRT i ONT sekvenciranje cDNK omogućavaju sekvenciranje kompletnih molekula RNK [79,80]. Senzitivnost i specifičnost obe metode zavisi od integriteta molekula RNK [16]. U poređenju sa *Illumina* metodom čija je propusnost 10^9 - 10^{10} očitavanja po eksperimentu, tehnologije dugih očitavanja su na početku imale za tri reda veličine manju propusnost (10^6 - 10^7) koja je bila dovoljna da se identifikuju ali ne i da se verodostojno kvantifikuju izoforme transkripata [16]. Početne studije su stoga donele pomak u identifikaciji alternativnih izoformi transkripata na nivou tkiva, uključujući rekordere u broju alternativnih izoformi (*Dsam* kod drozofile, imunoglobulini, neureksin) i ukazale da su alternativne izoforme značajan izvor varijabilnosti ne samo između različitih tipova ćelija već i između ćelija istog tipa [81-84]. Primena sekvenciranja dugih fragmenata doprinela je i identifikaciji gena za duge nekodirajuće RNK, koji se anotiraju na osnovu identifikovanih transkripata, i uslovlila reanotaciju intergenskih dugih nekodirajućih RNK čoveka i miša u bazi GENCODE [85].

Direktno sekvenciranje native RNK kroz proteinske nanopore olakšava određivanje orijentacije transkripta u genomu (eng. *strand specific RNA sequencing*), omogućava detekciju modifikacija nukleozida i „čitanje“ varijabli jednog molekula RNK iz istog seta podataka [60,61]. Time se prvi put pruža mogućnost otkrivanja kombinacija varijabli kao što su mesto početka transkripcije, kombinacija egzona (i introna), dužina poli(A) repa, epitranskriptomске oznake i alel-specifična ekspresija, koje mogu biti jedinstvene za dati transkript. Na primer, studija humanog transkriptoma pokazala je razliku u distribuciji dužine poli(A) repa između gena jedarnog i mitohondrijskih genoma, gena jedarnog genoma i različitih izoformi transkripata jednog gena, zatim različitu distribuciju N6-metiladenozina između izoformi transkripata jednog gena i skoro potpunu alel-specifičnu ekspresiju gena sa majčinog X hromozoma [61]. Dalji izazovi u „čitanju“ RNK korišćenjem tehnologija dugih očitavanja su priprema RNK ili cDNK biblioteka svih vrsta RNK pune dužine, kao i razvoj bioinformatičkih alatki za tačnije mapiranje 5' i 3' netraslatirajućih regiona.

Uspeh primene antisens oligonukleotida u terapiji smrtonosne bolesti kao što je spinalna mišićna atrofija [86] i RNK vakcina na COVID-19 bolest doprineli su propulzivnom razvoju RNK terapeutika. RNK terapeutici obavezno sadrže modifikovane nukleozide, posebno N-metilpseudouridin. Primenom direktnog RNK sekvenciranja pokazano je da je efikasnost ugradnje N-metilpseudouridina zavisna od konteksta sekvence tokom *in vitro* transkripcije [87]. Ovo nameće potrebu ne samo za rigoroznom kontrolom čistoće i kvantiteta

RNK terapeutika već i kontrolom ugradnje modificiranih nukleozida, zbog čega direktno sekvenciranje RNK ima potencijal da postane ključna metoda za kontrolu kvaliteta RNK terapeutika [35].

Sekvenciranje na terenu

Minijatura veličina i prenosivost *MinION* aparata koji se napaja preko USB kabela, razvoj prenosivih aparata za izolovanje DNK i pripremu biblioteke (*VolTRAX* kompanije *ONT*, aparati kompanije *BentoLab*), kompleti za pripremu biblioteke za svega 10 minuta, pozivanje baza u realnom vremenu i vršenje drugih bioinformatičkih analiza bez internet konekcije omogućavaju sekvenciranje na terenu (eng. *in field, point of care*). Ova aplikacija sekvenciranja kroz nanopore je od posebnog interesa kada je genomsku informaciju potrebno dobiti u veoma kratkom vremenskom periodu, kada ne postoje adekvatni genomski resursi i kada je teško sačuvati uzorke ili kultivisati mikroorganizme [88]. Tokom epidemije uzrokovane Ebola virusom 2015. godine u Gvineji prvi put je pokazano da je sekvenciranjem kroz nanopore moguće uspostaviti genomsko praćenje epidemije u državi sa ograničenim resursima [89]. Rezultati su dobijani za manje od 24 sata, a samo sekvenciranje trajalo je 15 do 30 minuta. Metoda je u kombinaciji sa *LAMP* izotermalnom amplifikacijom nukleinskih kiselina (eng. *loop-mediated isothermal amplification*) primenjena tokom pandemije uzrokovane SARS-CoV2 virusom [90]. Među brojnim primerima primene na terenu vredno pomena je sekvenciranje urađeno u svemirskom brodu, što otvara potpuno nove mogućnosti astrobioloških istraživanja [91]. Zbog skraćivanja vremena analize adaptivno uzorkovanje savršeno komplementira sekvenciranju na terenu. Demonstrirana je klinička primena u dijagnostici retkih bolesti, uključujući i nerešene slučajeve primenom standardnih genomskih metoda [92], kao i obogaćivanje malo zastupljenih vrsta u metagenomskim zajednicama [93]. Ipak, ono je zasada kompjuterski veoma zahtevno, čak i kada se radi na osnovu pozivanja baza [94], a ne strujnih zapisa [51,52].

Zaključak

Od komercijalizacije tehnologija dugih očitavanja težnja je bila poboljšanje tačnosti i propusnosti sekvenciranja, kao i razvoj adekvatnih bioinformatičkih algoritama. Dostizanjem tačnosti >99,9% i proizvodnjom aparata visoke propusnosti, *SMRT* i *ONT* tehnologije su sazrele. Dosadašnja primena u punom svetlu pokazuje njihov transformativan potencijal u sekvenciranju genoma i primeni u biomedicinskim istraživanjima i istraživanjima biodiverziteta. Studije dokaza koncepta o njihovoj primeni u izučavanju transkriptoma i epigenoma ukazuju da nas u periodu koji sledi čeka dublje razumevanje složenosti, dinamičnosti i međusobnog odnosa hromatina, transkripata i epigenetičkih oznaka RNK, sa mogućnošću dobijanja podataka o kombinacijama varijabli jedinstvenih za pojedinačne molekule RNK, zatim o prostornoj distribuciji pojedinačnih RNK u jednoj ćeliji i dinamičnosti u odgovoru na signale koje primaju. Za očekivati je da pored unapređenja tehnologija i bioinformatičkih analiza, jednako važna težnja postane smanjenje troškova. Time bi se poboljšala njihova dostupnost i ubrzalo dobijanje odgovora na nova pitanja koja se nameću kako bi se razumela složenost bioloških sistema.

Elektronsko sekvenciranje nukleinskih kiselina ima veliki potencijal za dalji razvoj. Kao alternativa proteinskim nanoporama, razvijaju se i tehnologije zasnovane na čvrstim nanoporama (eng. *solid-state nanopores*) koje imaju mogućnost optimizacije prečnika pora od nekoliko nm do nekoliko mm i već daju rezultate u polju identifikacije nukleinskih kiselina, proteina, virusa [95-97]. U odnosu na proteinske nanopore, čvrste nanopore su robusnije, jeftinije i imaju veći potencijal za integraciju ogromnog broja pora u elektronskim mikročipovima. Glavni tehnološki izazovi za detekciju pojedinačnih nukleotida pomoću čvrstih nanopora, koji su pre dvadesetak godina stajali i pred proteinskim nanoporama, su kontrola velike brzine kretanja nu-

kleinskih kiselina kroz samu poru, potreba za ultra-malim porama i ultra-tankim membranama. Pomaci se postižu sa grafenskim nanoporama koje se smatraju perfektnim materijalom za DNK sekvenciranje jer imaju debljinu od 0,35 nm koja je skoro uporediva sa rastojanjem između nukleotida u DNK [98]. Dalji progres u elektronskom sekvenciranju nukleinskih kiselina sa svojom prenosivosti i mogućnošću sekvenciranja u rasponu od pet redova veličina ima potencijal za svakodnevna, brza i rutinska sekvenciranja (epi)genoma, (epi)transkriptoma i veštačkih nukleinskih kiselina kako u laboratorijama tako i na terenu.

Zahvalnica

Istraživanje sprovedeno uz podršku Fonda za nauku Republike Srbije, #7754217, Understanding repeat expansion dynamics and phenotype variability in myotonic dystrophy type 1 through human studies, nanopore sequencing and cell models – READ-DM1

Literatura

1. Maxam AM, Gilbert W. A new method for sequencing DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1977;74(2):560-4.
2. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1977;74(12):5463-7.
3. Sanger F, Air GM, Barrell BG, Brown NL, Coulson AR, Fiddes CA, et al. Nucleotide sequence of bacteriophage phi X174 DNA. *Nature*. 1977;265(5596):687-95.
4. Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, de Bruijn MH, Coulson AR, Drouin J, et al. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*. 1981;290(5806):457-65.
5. Sanger F, Coulson AR, Hong GF, Hill DF, Petersen GB. Nucleotide sequence of bacteriophage lambda DNA. *J Mol Biol*. 1982;162(4):729-73.
6. International Human Genome Sequencing Consortium. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature*. 2004;431(7011):931-45.
7. Metzker ML. Sequencing technologies - the next generation. *Nat Rev Genet*. 2010;11(1):31-46.
8. Goodwin S, McPherson JD, McCombie WR. Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. *Nat Rev Genet*. 2016;17(6):333-51.
9. Logsdon GA, Vollger MR, Eichler EE. Long-read human genome sequencing and its applications. *Nat Rev Genet*. 2020;21(10):597-614.
10. Adessi C, Matton G, Ayala G, Turcatti G, Mermod JJ, Mayer P, et al. Solid phase DNA amplification: characterisation of primer attachment and amplification mechanisms. *Nucleic Acids Res*. 2000;28(20):E87.
11. Fedurco M, Romieu A, Williams S, Lawrence I, Turcatti G. BTA, a novel reagent for DNA attachment on glass and efficient generation of solid-phase amplified DNA colonies. *Nucleic Acids Res*. 2006;34(3):e22.
12. Bentley DR, Balasubramanian S, Swerdlow HP, Smith GP, Milton J, Brown CG, et al. Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry. *Nature*. 2008;456(7218):53-9.
13. Fox EJ, Reid-Bayliss KS, Emond MJ, Loeb LA. Accuracy of Next Generation Sequencing Platforms. *Next Gener Seq Appl*. 2014;1:1000106.
14. 1000 Genomes Project Consortium, Auton A, Brooks LD, Durbin RM, Garrison EP, Kang HM, et al. A global reference for human genetic variation. *Nature*. 2015;526(7571):68-74.
15. Djebali S, Davis CA, Merkel A, Dobin A, Lassmann T, Mortazavi A, et al. Landscape of transcription in human cells. *Nature*. 2012;489(7414):101-8.
16. Stark R, Grzelak M, Hadfield J. RNA sequencing: the teenage years. *Nat Rev Genet*. 2019;20(11):631-656.
17. Park PJ. ChIP-seq: advantages and challenges of a maturing technology. *Nat Rev Genet*. 2009;10(10):669-80.
18. Dominissini D, Moshitch-Moshkovitz S, Schwartz S, Salmon-Divon M, Ungar L, Osenberg S, et al. Topology of the human and mouse m6A RNA methylomes revealed by m6A-seq. *Nature*. 2012;485(7397):201-6.
19. ENCODE Project Consortium. An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. *Nature*. 2012;489(7414):57-74.

20. Prüfer K, Racimo F, Patterson N, Jay F, Sankararaman S, Sawyer S, et al. The complete genome sequence of a Neanderthal from the Altai Mountains. *Nature*. 2014;505(7481):43-9.
21. Boycott KM, Vanstone MR, Bulman DE, MacKenzie AE. Rare-disease genetics in the era of next-generation sequencing: discovery to translation. *Nat Rev Genet*. 2013;14(10):681-91.
22. Brown NA, Elenitoba-Johnson KSJ. Enabling Precision Oncology Through Precision Diagnostics. *Annu Rev Pathol*. 2020;15:97-121.
23. Method of the year. *Nat Methods*. 2008;5(1):1.
24. Eid J, Fehr A, Gray J, Luong K, Lyle J, Otto G, et al. Real-time DNA sequencing from single polymerase molecules. *Science*. 2009;323(5910):133-8.
25. Jain M, Olsen HE, Paten B, Akeson M. The Oxford Nanopore MinION: delivery of nanopore sequencing to the genomics community. *Genome Biol*. 2016;17(1):239.
26. Wenger AM, Peluso P, Rowell WJ, Chang PC, Hall RJ, Concepcion GT, et al. Accurate circular consensus long-read sequencing improves variant detection and assembly of a human genome. *Nat Biotechnol*. 2019;37(10):1155-1162.
27. Oxford Nanopore Tech Update: new Duplex method for Q30 nanopore single molecule reads, PromethION 2, and more. [Accessed date 31 July 2023]. <https://nanoporetech.com/about-us/news/oxford-nanopore-tech-update-new-duplex-method-q30-nanopore-single-molecule-reads-0>
28. Nurk S, Koren S, Rhie A, Rautiainen M, Bzikadze AV, Mikheenko A, et al. The complete sequence of a human genome. *Science*. 2022;376(6588):44-53.
29. Method of the Year 2022: long-read sequencing. *Nat Methods*. 2023;20(1):1.
30. Kumar S, Sood A, Wegener J, Finn PJ, Nampalli S, Nelson JR, et al. Terminal phosphate labeled nucleotides: synthesis, applications, and linker effect on incorporation by DNA polymerases. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*. 2005;24(5-7):401-8.
31. Sood A, Kumar S, Nampalli S, Nelson JR, Macklin J, Fuller CW. Terminal phosphate-labeled nucleotides with improved substrate properties for homogeneous nucleic acid assays. *J Am Chem Soc*. 2005;127(8):2394-5.
32. Levene MJ, Korfach J, Turner SW, Foquet M, Craighead HG, Webb WW. Zero-mode waveguides for single-molecule analysis at high concentrations. *Science*. 2003;299(5607):682-6.
33. Korfach J, Marks PJ, Cicero RL, Gray JJ, Murphy DL, Roitman DB, et al. Selective aluminum passivation for targeted immobilization of single DNA polymerase molecules in zero-mode waveguide nanostructures. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(4):1176-81.
34. Lundquist PM, Zhong CF, Zhao P, Tomaney AB, Peluso PS, Dixon J, et al. Parallel confocal detection of single molecules in real time. *Opt Lett*. 2008;33(9):1026-8.
35. Lucas MC, Novoa EM. Long-read sequencing in the era of epigenomics and epitranscriptomics. *Nat Methods*. 2023;20(1):25-29.
36. PacBio Announces Revio, a Revolutionary New Long Read Sequencing System Designed to Provide 15 Times More HiFi Data and Human Genomes at Scale for Under \$1,000. 25 October. 2022. [Accessed 31 July 2023]. Available from: https://www.pacb.com/press_releases/pacbio-announces-revio-a-revolutionary-new-long-read-sequencing-system-designed-to-provide-15-times-more-hifi-data-and-human-genomes-at-scale-for-under-1000/
37. Deamer D, Akeson M, Branton D. Three decades of nanopore sequencing. *Nat Biotechnol*. 2016;34(5):518-24.
38. Bayley H, Cremer PS. Stochastic sensors inspired by biology. *Nature*. 2001;413(6852):226-30.
39. Kasianowicz JJ, Brandin E, Branton D, Deamer DW. Characterization of individual polynucleotide molecules using a membrane channel. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(24):13770-3.
40. Akeson M, Branton D, Kasianowicz JJ, Brandin E, Deamer DW. Microsecond time-scale discrimination among polycytidylic acid, polyadenylic acid, and polyuridylic acid as homopolymers or as segments within single RNA molecules. *Biophys J*. 1999;77(6):3227-33.
41. Stoddart D, Heron AJ, Mikhailova E, Maglia G, Bayley H. Single-nucleotide discrimination in immobilized DNA oligonucleotides with a biological nanopore. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(19):7702-7.
42. Manrao EA, Derrington IM, Pavlenok M, Niederweis M, Gundlach JH. Nucleotide discrimination with DNA immobilized in the MspA nanopore. *PLoS One*. 2011;6(10):e25723.
43. Hornblower B, Coombs A, Whitaker RD, Kolomeisky A, Picone SJ, Meller A, Akeson M. Single-molecule analysis of DNA-protein complexes using nanopores. *Nat Methods*. 2007;4(4):315-7.
44. Cockroft SL, Chu J, Amorin M, Ghadiri MR. A single-molecule nanopore device detects DNA polymerase activity with single-nucleotide resolution. *J Am Chem Soc*. 2008;130(3):818-20.
45. Cherf GM, Lieberman KR, Rashid H, Lam CE, Karplus K, Akeson M. Automated forward and reverse ratcheting of DNA in a nanopore at 5-Å precision. *Nat Biotechnol*. 2012;30(4):344-8.

46. Manrao EA, Derrington IM, Laszlo AH, Langford KW, Hopper MK, Gillgren N, et al. Reading DNA at single-nucleotide resolution with a mutant MspA nanopore and phi29 DNA polymerase. *Nat Biotechnol.* 2012;30(4):349-53.
47. Stoddart D, Maglia G, Mikhailova E, Heron AJ, Bayley H. Multiple base-recognition sites in a biological nanopore: two heads are better than one. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2010;49(3):556-9.
48. Wang Y, Zhao Y, Bollas A, Wang Y, Au KF. Nanopore sequencing technology, bioinformatics and applications. *Nat Biotechnol.* 2021;39(11):1348-1365.
49. Simpson JT, Workman RE, Zuzarte PC, David M, Dursi LJ, Timp W. Detecting DNA cytosine methylation using nanopore sequencing. *Nat Methods.* 2017;14(4):407-410.
50. Rand AC, Jain M, Eizenga JM, Musselman-Brown A, Olsen HE, Akeson M, et al. Mapping DNA methylation with high-throughput nanopore sequencing. *Nat Methods.* 2017;14(4):411-413.
51. Loose M, Malla S, Stout M. Real-time selective sequencing using nanopore technology. *Nat Methods.* 2016;13(9):751-4.
52. Payne A, Holmes N, Clarke T, Munro R, Debebe BJ, Loose M. Readfish enables targeted nanopore sequencing of gigabase-sized genomes. *Nat Biotechnol.* 2021;39(4):442-450.
53. At NCM, announcements include single-read accuracy of 99.1% on new chemistry and sequencing a record 10 Tb in a single PromethION run. 3 December 2020. [Accessed date 10 August 2023]. Available from: <https://nanoporetech.com/about-us/news/ncm-announcements-include-single-read-accuracy-991-new-chemistry-and-sequencing>
54. One technology, one platform for all your biology. [Accessed date 10 August 2023]. Available from: <https://nanoporetech.com/applications/techniques/short-fragment-mode>
55. Laver T, Harrison J, O'Neill PA, Moore K, Farbos A, Paszkiewicz K, et al. Assessing the performance of the Oxford Nanopore Technologies MinION. *Biomol Detect Quantif.* 2015;3:1-8.
56. Accuracy. [Accessed date 10 August 2023]. Available from: <https://nanoporetech.com/accuracy>
57. Brown CG, Clarke J. Nanopore development at Oxford Nanopore. *Nat Biotechnol.* 2016;34(8):810-1.
58. Cao B, Zhao Y, Kou Y, Ni D, Zhang XC, Huang Y. Structure of the nonameric bacterial amyloid secretion channel. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014;111(50):E5439-44.
59. Van der Verren SE, Van Gerven N, Jonckheere W, Hambley R, Singh P, Kilgour J, et al. A dual-constriction biological nanopore resolves homonucleotide sequences with high fidelity. *Nat Biotechnol.* 2020;38(12):1415-1420.
60. Garalde DR, Snell EA, Jachimowicz D, Sipos B, Lloyd JH, Bruce M, et al. Highly parallel direct RNA sequencing on an array of nanopores. *Nat Methods.* 2018;15(3):201-206.
61. Workman RE, Tang AD, Tang PS, Jain M, Tyson JR, Razaghi R, et al. Nanopore native RNA sequencing of a human poly(A) transcriptome. *Nat Methods.* 2019;16(12):1297-1305.
62. Liao WW, Asri M, Ebler J, Doerr D, Haukness M, Hickey G, et al. A draft human pangenome reference. *Nature.* 2023;617(7960):312-324.
63. Eukaryotic Genome Annotation at NCBI. [Accessed 15 August 2023]. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/annotation_euk/
64. Schneider VA, Graves-Lindsay T, Howe K, Bouk N, Chen HC, Kitts PA, et al. Evaluation of GRCh38 and de novo haploid genome assemblies demonstrates the enduring quality of the reference assembly. *Genome Res.* 27(5):849-864.
65. Rhie A, Nurk S, Cechova M, Hoyt SJ, Taylor DJ, Altemose N, et al. The complete sequence of a human Y chromosome. *Nature.* doi: 10.1038/s41586-023-06457-y.
66. Collins RL, Brand H, Karczewski KJ, Zhao X, Alföldi J, Francioli LC, et al. A structural variation reference for medical and population genetics. *Nature.* 2020;581(7809):444-451.
67. Ouzhuluobu; He Y, Lou H, Cui C, Deng L, Gao Y, et al. De novo assembly of a Tibetan genome and identification of novel structural variants associated with high-altitude adaptation. *Natl Sci Rev.* 2020;7(2):391-402.
68. McDonald-McGinn DM, Sullivan KE, Marino B, Philip N, Swillen A, Vorstman JA, et al. 22q11.2 deletion syndrome. *Nat Rev Dis Primers.* 2015;1:15071
69. D'Amico A, Mercuri E, Tiziano FD, Bertini E. Spinal muscular atrophy. *Orphanet J Rare Dis.* 2011;6:71.
70. Chintalaphani SR, Pineda SS, Deveson IW, Kumar KR. An update on the neurological short tandem repeat expansion disorders and the emergence of long-read sequencing diagnostics. *Acta Neuropathol Commun.* 2021;9(1):98.
71. Savić D, Rakovic-Stojanovic V, Keckarevic D, Culjkovic B, Stojkovic O, Mladenovic J, et al. 250 CTG repeats in DMPK is a threshold for correlation of expansion size and age at onset of juvenile-adult DM1. *Hum Mutat.* 2002;19(2):131-9.

72. Pešović J, Perić S, Brkušanić M, Brajušković G, Rakočević-Stojanović V, Savić-Pavićević D. Repeat Interruptions Modify Age at Onset in Myotonic Dystrophy Type 1 by Stabilizing DMPK Expansions in Somatic Cells. *Front Genet.* 2018;9:601.
73. Pešović J, Perić S, Radenković L, Rakočević-Stojanović V, Savić-Pavićević D. Genetička i epigenetička karakterizacija varijantnih DMPK ekspanzija kao modifikatora fenotipa miotonične distrofije tipa 1. In: Pavlović S, editor. *Tredovi u molekularnoj biologiji*. Beograd (Srbija): IMGGI; 2021. P. 60-70.
74. Gilpatrick T, Lee I, Graham JE, Raimondeau E, Bowen R, Heron A, et al. Targeted nanopore sequencing with Cas9-guided adapter ligation. *Nat Biotechnol.* 2020;38(4):433-438.
75. Rhie A, McCarthy SA, Fedrigo O, Damas J, Formenti G, Koren S, et al. Towards complete and error-free genome assemblies of all vertebrate species. *Nature.* 2021;592(7856):737-746.
76. Genomes of 50 critically endangered species are sequenced in successful pilot of conservation project ORG.one. [Accessed 26 August 2023]. Available from: <https://nanoporetech.com/about-us/news/genomes-50-critically-endangered-species-are-sequenced-successful-pilot-conservation>
77. Zhou Y, Zhang Z, Bao Z, Li H, Lyu Y, Zan Y, et al. Graph pangenome captures missing heritability and empowers tomato breeding. *Nature.* 2022;606(7914):527-534.
78. Tang D, Jia Y, Zhang J, Li H, Cheng L, Wang P, et al. Genome evolution and diversity of wild and cultivated potatoes. *Nature.* 2022 Jun;606(7914):535-541.
79. Sharon D, Tilgner H, Grubert F, Snyder M. A single-molecule long-read survey of the human transcriptome. *Nat Biotechnol.* 2013;31(11):1009-14.
80. Oikonomopoulos S, Wang YC, Djambazian H, Badescu D, Ragoussis J. Benchmarking of the Oxford Nanopore MinION sequencing for quantitative and qualitative assessment of cDNA populations. *Sci Rep.* 2016;6:31602.
81. Bolisetty MT, Rajadinakaran G, Graveley BR. Determining exon connectivity in complex mRNAs by nanopore sequencing. *Genome Biol.* 2015;16:204.
82. Treutlein B, Gokce O, Quake SR, Südhof TC. Cartography of neurexin alternative splicing mapped by single-molecule long-read mRNA sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014;111(13):E1291-9.
83. Byrne A, Beaudin AE, Olsen HE, Jain M, Cole C, Palmer T, et al. Nanopore long-read RNAseq reveals widespread transcriptional variation among the surface receptors of individual B cells. *Nat Commun.* 2017;8:16027.
84. Karlsson K, Linnarsson S. Single-cell mRNA isoform diversity in the mouse brain. *BMC Genomics.* 2017;18(1):126.
85. Lagarde J, Usczyńska-Ratajczak B, Carbonell S, Pérez-Lluch S, Abad A, Davis C, et al. High-throughput annotation of full-length long noncoding RNAs with capture long-read sequencing. *Nat Genet.* 2017;49(12):1731-1740.
86. Hua Y, Sahashi K, Hung G, Rigo F, Passini MA, Bennett CF, et al. Antisense correction of SMN2 splicing in the CNS rescues necrosis in a type III SMA mouse model. *Genes Dev.* 2010;24(15):1634-44.
87. Fleming AM, Burrows CJ. Nanopore sequencing for N1-methylpseudouridine in RNA reveals sequence-dependent discrimination of the modified nucleotide triphosphate during transcription. *Nucleic Acids Res.* 2023;51(4):1914-1926.
88. Runtuwene LR, Tuda JSB, Mongan AE, Suzuki Y. On-Site MinION Sequencing. *Adv Exp Med Biol.* 2019;1129:143-150.
89. Quick J, Loman NJ, Duraffour S, Simpson JT, Severi E, Cowley L, et al. Real-time, portable genome sequencing for Ebola surveillance. *Nature.* 2016;530(7589):228-232.
90. Peto L, Rodger G, Carter DP, Osman KL, Yavuz M, Johnson K, et al. Diagnosis of SARS-CoV-2 Infection with LampORE, a High-Throughput Platform Combining Loop-Mediated Isothermal Amplification and Nanopore Sequencing. *J Clin Microbiol.* 2021;59(6):e03271-20.
91. McIntyre ABR, Rizzardi L, Yu AM, Alexander N, Rosen GL, Botkin DJ, et al. Nanopore sequencing in microgravity. *NPJ Microgravity.* 2016;2:16035.
92. Miller DE, Sulovari A, Wang T, Loucks H, Hoekzema K, Munson KM, et al. Targeted long-read sequencing identifies missing disease-causing variation. *Am J Hum Genet.* 2021;108(8):1436-1449.
93. Martin S, Heavens D, Lan Y, Horsfield S, Clark MD, Leggett RM. Nanopore adaptive sampling: a tool for enrichment of low abundance species in metagenomic samples. *Genome Biol.* 2022;23(1):11.
94. Edwards HS, Krishnakumar R, Sinha A, Bird SW, Patel KD, Bartsch MS. Real-Time Selective Sequencing with RUBRIC: Read Until with Basecall and Reference-Informed Criteria. *Sci Rep.* 2019;9(1):11475.
95. Bošković F, Keyser UF. Nanopore microscope identifies RNA isoforms with structural colours. *Nat Chem.* 2022;14(11):1258-1264.
96. Bošković F, Zhu J, Tivony R, Ohmann A, Chen K, Alawami MF, et al. Simultaneous identification of viruses and viral variants with programmable DNA nanobait. *Nat Nanotechnol.* 2023;18(3):290-298.

97. Patiño-Guillén G, Pešović J, Panic M, Savic-Pavicevic D, Bošković F, Keyser UF. Single-Molecule RNA Sizing Enables Quantitative Analysis of Alternative Transcription Termination. *bioRxiv* 2023.07.14.549052. doi: 10.1101/2023.07.14.549052
98. Wasfi A, Falah Awwad F, Ayesb AI. DNA sequencing via Z-shaped graphene nano ribbon field effect transistor decorated with nanoparticles using first-principle transport simulations. *New J. Phys.* 2020; 22:063004.



BIOMEDICINA

BIOMEDICINE



Stereotipija B-ćelijskog receptora u hroničnoj limfocitnoj leukemiji

Teodora Karan-Đurašević

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

Kontakt: dora_karan@yahoo.com

APSTRAKT

Opsežne imunogenetičke studije sprovedene tokom proteklih nekoliko decenija u oblasti hronične limfocitne leukemije (HLL) su identifikovale grupe pacijenata koji ekspimiraju visoko homologne, skoro identične imunoglobulinske molekule koji ulaze u sastav B-ćelijskog receptora (BĆR IG). Ovaj fenomen, nazvan „BĆR stereotipija“, obuhvata oko 30% HLL i predstavlja najvažniju potvrdu uloge antigenske stimulacije u patogenezi i evoluciji bolesti. Na osnovu sekvence CDR3 regiona teških lanaca IG definisani su stereotipni subsetovi koji ispoljavaju konzistentne subset-specifične biološke i kliničke karakteristike. Neki od najzastupljenijih subsetova imaju i jasan prognostički značaj, tako da se čak mogu smatrati različitim varijantama bolesti. Subklasifikacija HLL bazirana na BĆR stereotipiji je omogućila kompartmentalizovan pristup u istraživanju ove bolesti, i otvorila mogućnost za precizniju stratifikaciju pacijenata, kao i uspešniju prognostiku i lečenje, uprkos izrazitoj kliničkoj heterogenosti HLL.

Ključne reči: hronična limfocitna leukemija, B-ćelijski receptor, stereotipija

B-cell receptor stereotypy in chronic lymphocytic leukemia

Teodora Karan-Djurasevic

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

Correspondence: dora_karan@yahoo.com

ABSTRACT

During the past several decades, extensive immunogenetic research of chronic lymphocytic leukemia (CLL) led to the identification of groups of patients expressing highly homologous, almost identical B-cell receptor immunoglobulin molecules (BCR IG). This phenomenon, termed „BCR stereotypy“, accounts for around 30% of all CLL and represents the strongest evidence for the role of antigenic stimulation in CLL pathogenesis and evolution. Based on the sequence of CDR3 region within IG heavy chains multiple stereotyped subsets have been defined, which display consistent subset-specific biological and clinical characteristics. Some of the most frequent subsets also exert strong prognostic significance and can be considered to be distinct disease variants. Stereotypy-based CLL subclassification enabled compartmentalized approach in the research of this disease, and offered the possibility of refining stratification of patients that can improve prognostication and clinical decision-making despite extreme heterogeneity of CLL.

Key words: chronic lymphocytic leukemia, B-cell receptor, stereotypy

UVOD

Hronična limfocitna leukemija (HLL) je najčešći tip leukemije adultnog doba u Zapadnom svetu i karakteriše se klonском ekspanzijom i akumulacijom zrelih CD5-pozitivnih B limfocita u krvi, kostnoj srži i sekundarnim limfnim organima. Najčešće se javlja u starijoj populaciji (medijana starosti je 72 godine pri postavljanju dijagnoze), i to predominantno kod muškaraca [1]. HLL se odlikuje izrazito heterogenim kliničkim tokom i prognozom. Većina pacijenata ima indolentnu, sporo progredirajuću bolest koja, u ekstremnim slučajevima, može da perzistira kao stabilna limfocitoza i nekoliko decenija bez pojave kliničkih simptoma. Sa druge strane, kod nekih pacijenata se razvija veoma agresivna forma HLL, gde se progresija bolesti i potreba za lečenjem javljaju ubrzo nakon postavljanja dijagnoze.

Intenzivna istraživanja HLL u poslednjih 30 godina su ukazala na to da je njena klinička heterogenost rezultat kompleksnosti mehanizama uključenih u patobiologiju HLL ćelija. HLL se danas smatra prototipom kancera čiji su inicijacija i progresija rezultat kombinovanog efekta intrinzičnih genetičkih abnormalnosti malignih B limfocita i ekstrinzičnih faktora iz tkivne mikrosredine, uključujući i antigene [2]. Tipičan neselektovani HLL genom obuhvata oko 2000 genetičkih promena u koje spadaju hromozomske aberacije, mutacije protein-kodirajućih gena i nekodirajućih RNK, i epigenetičke modifikacije [3-6]. Najčešće hromozomske aberacije u HLL su delecija 13q14, trizomija 12q, delecija 11q22-q23 i delecija 17p13, prisutne kod oko 80% pacijenata [1, 3]. Geni lokalizovani u okviru minimalno deletiranog/amplifikovanog regiona u ovim aberacijama su miR-15a i miR16-1 (del13q), *CDK4*, *GLI* i *MDM2* (trizomija 12), *ATM* i *BIRC3* (del11q) i *TP53* (del17p), i uključeni su u regulaciju apoptoze i reparacije DNK [7-14]. Pored hromozomskih aberacija, u HLL je identifikovano više od 40 rekurentno mutiranih gena. Ove rekurentne mutacije nisu homogeno rasprostranjene po genomu, već pogađaju gene integrisane u relativno mali broj signalnih puteva i ćelijskih procesa. Tu spadaju signalni putevi koji se pokreću medijatorima iz mikrosredine kao što su NOTCH (*NOTCH1*, *FBXW7*), TLR (*MYD88*), MAPK/ERK (*MAP2K1*, *BRAF*, *KRAS*, *NRAS*) i NF-κB (*BIRC3*, *NFKBIE*, *TRAF3*), kao i unutarćelijski programi uključeni u kontrolu ćelijskog ciklusa i odgovor na oštećenja DNK (*TP53*, *ATM*, *POT1*, *SAMHD1*), hromatinske modifikacije (*HIST1H1E*, *CHD2*, *ZMYM3*), transkripciju (*EGR2*, *IRF4*, *BCOR*, *MED12*), obradu, transport i ribozomalno procesovanje RNK (*SF3B1*, *XPO1*, *RPS15*) [4, 5, 15].

Iako su signalni putevi kojima se vrši transdukcija signala sa B-ćelijskog receptora (BĀR) retko pogođeni somatskim mutacijama, ovi putevi su konstitutivno aktivni u HLL B limfocitima. Velika ekspanzija istraživanja na polju imunogenetike HLL, koja se dogodila u poslednjih nekoliko decenija, dovela je do revolucionarnih otkrića koja su ukazala na centralnu ulogu klon-specifičnog BĀR u patogenezi i evoluciji ove bolesti [16-18]. Naime, brojni dokazi upućuju na to da je prepoznavanje određenih egzogenih ili autoantigena, praćeno selekcijom specifičnog B-ćelijskog klona, ključan događaj u patofiziologiji HLL [17]. Sa kliničke tačke gledišta, to je potvrđeno velikom terapijskom efikasnošću inhibitora BĀR-signalizacije, odnosno malih molekula antagonista kinaza asociranih sa BĀR (ibrutinib, idelalizib) [19-21].

STRUKTURA B-ĆELIJSKOG RECEPTORA I RAZVIĆE B LIMFOCITA

Diverzitet imunoglobulina

B-ćelijski receptor se eksprimira na površini B limfocita i sastoji se od molekula imunoglobulina (IG), koji predstavlja antigen-vezujuću komponentu BĀR, u kompleksu sa CD79A/79B heterodimerom, odgovornim za signalnu transdukciju. Signalizacija preko BĀR ima esencijalnu ulogu u preživljavanju, proliferaciji i diferencijaciji normalnih B limfocita, a implicirana je i u patogenezi nekih maligniteta zrelih B ćelija, uključujući i HLL.

Imunoglobulinski molekuli (antitela) su heterodimeri sastavljeni od dva identična teška (H) lanca i dva identična laka (L) lanca (κ ili λ), povezana disulfidnim mostovima. Oba tipa lanaca sadrže N-terminalni varijabilni (V) region i C-terminalni konstantni (C) region (Slika 1a). Jukstapozicijom varijabilnih regiona H i L lanaca (VH i VL, respektivno) se formira antigen-vezujuće mesto, od čije strukture zavisi specifičnost i afinitet IG molekula za antigen. Konstantni regioni nisu uključeni u prepoznavanje antigena. Konstantni region H lanca (CH) definiše izotip imunoglobulina (IgA, IgD, IgE, IgG i IgM) i učestvuje u efektorskim funkcijama antitela tokom imunog odgovora. Pored toga, CH region ukotvljava membranski vezane IG u plazma membranu B ćelija. Varijabilni region svakog IG lanca se sastoji od četiri relativno konzervisana „framework” regiona (FR1, FR2, FR3 i FR4) i tri hipervarijabilna „complementarity-determining” regiona (CDR1, CDR2 i CDR3) (Slika 1b). FR regioni su odgovorni za održavanje arhitekture IG molekula, dok CDR regioni H i L lanca formiraju površinu koja direktno interaguje sa antigenom. CDR3 region H lanca (VH CDR3) ispoljava najveću varijabilnost i predstavlja ključnu determinantu specifičnosti IG za antigen [22].

Imunoglobulinski molekuli su kodirani velikim brojem tandemski aranžiranih gena koji konstituišu *IGH* genski lokus (teški lanci), *IGK* i *IGL* genski lokus (κ i λ laki lanci). Humani *IGH* lokus, lociran na hromozomu 14q32.33, sastoji se od četiri vrste gena: *V* („variable”), *D* („diversity”), *J* („joining”) i *C* („constant”), u 5'-3' smeru. U humanom genomu prisutno je 38-46 funkcionalnih *IGHV* gena, grupisanih u 6-7 familija na osnovu homologije, 23 funkcionalna *IGHD* gena, 6 funkcionalnih *IGHJ* gena i 9 funkcionalnih *IGHC* gena (Slika 2). Lokusi za lake lance ne sadrže *D* gene. Humani *IGK* lokus (hromozom 2p11.2) sadrži klaster od 34-38 funkcionalnih *IGKV* gena koji su svrstani u 5 familija, 5 *IGKJ* gena i jedan *IGKC* gen. Humani *IGL* lokus (hromozom 22q11.2) se sastoji od 29-33 funkcionalna *IGLV* gena, grupisana u 10 familija, i 4-5 funkcionalnih *IGLJ-IGLC* tandemata [24]. Identifikovane su alelske varijante mnogih IG gena, a naročito gena koji pripadaju *IGH* lokusu. Treba naglasiti da je ukupan broj gena u sva 3 lokusa mnogo veći od navedenog, zahvaljujući prisustvu pseudogena i ORF-ova („open reading frame”). Pored toga, broj funkcionalnih gena u lokusu zavisi od haplotipa, s obzirom da neki geni mogu biti deletirani ili insertovani.

Varijabilni region IG molekula se formira tokom diferencijacije B limfocita putem somatskih rekombinacija između *V*, *D* i *J* gena (teški lanac), odnosno *V* i *J* gena (laki lanac). Na *IGH* lokusu, koji se rearanžira pre *IGL* lokusa, prvi rekombinacioni događaj dovodi do spajanja jednog od *IGHD* gena sa jednim od *IGHJ* gena, a region između rearanžiranih gena biva deletiran. Dobijeni *IGHD-IGHJ* rearanžman se zatim rekombinuje sa jednim od *IGHV* gena, formirajući tako kompletan *IGHV-IGHD-IGHJ* rearanžman koji će biti fuzionisan sa *IGHC* genom ($C\mu$ ili $C\delta$) tokom RNK splajsinga, i eksprimiran na površini ćelije kao IgM ili IgD. Produktivno rearanžiranje jednog *IGH* lokusa inhibira rearanžiranje *IGH* lokusa na drugom hromozomu (alelsko isključivanje), čime se se obezbeđuje monospecifičnost B limfocita [26]. Međutim, ako je rearanžman jednog alela neproduktivan, biće rekombinovan drugi alel, a u slučaju da rekombinacijom opet nastane neproduktivan rearanžman, ćelija će umreti apoptozom. Slični rekombinacioni procesi događaju se između *V* i *J* gena na lokusima za lake lance. *IGK* lokus se rearanžira pre *IGL* lokusa; uspešna rekombinacija jednog *IGK* alela inhibira rearanžiranje drugog (alelsko isključivanje), kao i rearanžiranje *IGL* lokusa (izotipsko isključivanje). U slučaju neproduktivnog rearanžiranja jednog *IGK* lokusa dolazi do rekombinovanja drugog *IGK* alela a, ako je i ta rekombinacija neuspešna, rearanžira se *IGL* lokus. I ponovo, ako ni jedan od pokušaja rekombinovanja ne dovede do nastanka produktivnog rearanžmana, ćelija će biti podvrgnuta apoptozi.

Imajući u vidu broj gena na IG lokusima koji mogu da učestvuju u rekombinaciji, kao i nasumično sparivanje teških i lakih lanaca, jasno je da B limfociti mogu da produkuju ogroman broj različitih antitela („combinatorial diversity”). Međutim, realan broj kombinacija je manji od teoretskih oko $1,6 \times 10^6$, s obzirom na to da se svi geni ne rekombinuju istom frekvencijom, kao i na to da nisu svi IGH-IGL parovi funkcionalni. Pored

toga, pokazano je da *V(D)J* rekombinacije nisu stohastički proces, već su determinisane genetičkim faktorima i precizno regulisane tokom ontogenije [27].

Diverzitet primarnog IG repertoara (repertoar naivnih B ćelija) se dalje povećava mehanizmom nazvanim „junctional diversity”. Naime, proces somatskih rekombinacija, katalizovan grupom enzima zajednički nazvanim *V(D)J* rekombinaze, iako veoma precizan, uvodi varijabilnost na mestima spojeva *V*, (*D*) i *J* gena. Rekombinacija je omogućena prisustvom konzerviranih rekombinacionih signalnih sekvenci (RSS) lociranih na 3' kraju *V* gena, 5' kraju *J* gena i oba kraja *D* gena. RS sekvence, koje prepoznaju enzimi kodirani genima *RAG1* i *RAG2* („recombination activating gene”), osiguravaju da *V* geni lakih lanaca mogu biti rekombinovani isključivo sa *J* genima, dok na *IGH* lokusu *IGHV* geni mogu da se rearanžiraju samo sa *IGHD* genima, a *IGHD* samo sa *IGHJ* genima. Tokom ovog procesa dešava se „trimovanje” krajeva gena koji se rekombinuju delovanjem egzonukleaza, adicija kratkih palindromskih sekvenci, kao i insercija nasumičnih nukleotida (katalizovana terminalnom deoksinukleotidil transferazom, TdT) [28]. Nasumičnom delecijom i adicijom nukleotida tokom *IGHV-IGHD* i *IGHD-IGHJ* ligacije formiraju se dva N regiona (N1 i N2) koji predstavljaju izvor ekstremne varijabilnosti VH CDR3, lociranog na mestu *VDJ* spajanja („*IGHV-IGHD-IGHJ* junction”) (Slika 1b). Diverzitet VH CDR3, kako po pitanju dužine, tako i po pitanju amino-kiselinske sekvence, rezultira u produkciji mnogo šireg IG repertoara (do 10¹¹ različitih IG) nego što bi bilo moguće samo na osnovu kombinovanja različitih „germline” gena.

Diverzifikacija antitela se nastavlja nakon susreta sa antigenom (sekundarni IG repertoar) putem somatskih hipermutacija i „class-switch” rekombinacija, čime nastaju B limfociti sa ogromnim opsegom antigenskih specifičnosti (vidi sledeći odeljak).

Diferencijacija B limfocita

Diferencijacija B limfocita je višestepeni proces podeljen u dve faze: antigen-nezavisnu fazu, koja se odvija u kostnoj srži (i fetalnoj jetri), i antigen-zavisnu fazu u sekundarnim limfnim organima.

Prvi stadijum u diferencijaciji B limfocita u kostnoj srži predstavlja rana pro-B ćelija, koju definiše početak *IGHD-IGHJ* rekombinacija. Spajanje *IGHV* gena sa *IGHD-IGHJ* rearanžmanom dešava se u stadijumu kasne pro-B ćelije, i dovodi do transkripcije i sinteze μ teškog lanca, koji sadrži *IGHV-IGHD-IGHJ* kompleks vezan za $C\mu$. μ teški lanac je pretežno citoplazmatski, ali može biti i asociran sa surogat lakim lancima i, u kompleksu sa CD79A/CD79B, prolazno eksprimiran na površini ćelije kao pre-B α R. Nakon toga nastupa sledeći stadijum diferencijacije, tzv. stadijum male pre B-ćelije, u kome se dešavaju rearanžmani lokusa za lake lance, čime je omogućeno sparivanje prethodno sintetisanih μ teških lanaca sa IGK ili IGL, odnosno formiranje IgM. Ekspresija površinski-vezanog IgM kao integralnog dela B α R definiše stadijum nezrele B ćelije. U ovoj fazi se eliminišu autoreaktivni B klonovi, ili se njihova specifičnost menja putem editovanja receptora ili zamene *IGHV* [29]. Nezreli B limfociti migriraju u slezinu gde postaju nezrele naivne B ćelije. Kao rezultat alternativnog splajsinga *IGH* transkripata, koji dovodi do fuzije *IGHV-IGHD-IGHJ* gena sa $C\mu$ ili $C\delta$, ove ćelije koeksprimiraju membranski-vezane IgM i Ig D sa istom antigenskom specifičnošću.

Naivni B limfociti su smešteni u sekundarnim limfnim organima (slezini, limfnim čvorovima i mukozalnim limfnim tkivima) gde dolazi do njihovog susreta sa različitim antigenima. Vezivanje B α R za određeni antigen pokreće signalnu kaskadu koja aktivira B ćeliju, što dovodi do proliferacije antigen-specifičnog klona i, na kraju, do diferencijacije u plazma ćelije, koje sekretuju specifična antitela, i memorijske ćelije. U zavisnosti od učešća T limfocita u aktivaciji B ćelija, razlikuju se dva tipa odgovora na antigensku stimulaciju. Bakterijski polisaharidi i lipopolisaharidi mogu direktno da aktiviraju B limfocite (T-nezavisan odgovor), što

dovodi do brze produkcije IgM. Nasuprot tome, odgovor na proteinske antigene je T-zavisan i zahteva interakciju B ćelija sa CD4+ T ćelijama i antigen-prezentujućim ćelijama. Nakon aktivacije posredovane T ćelijama, proliferišući B limfociti migriraju dublje u limfni čvorić, formirajući strukturu pod nazivom „germinalni centar“. U visoko specijalizovanoj mikrosredini germinalnih centara B ćelije počinju da proliferišu velikom brzinom, pri čemu podležu somatskim hipermutacijama i „class-switch“ rekombinacijama.

Proces somatskih hipermutacija (SHM), posredovan enzimom AID („activation-induced“ citidin deaminaza), uvodi tačkaste mutacije u rearanžirane *IG* lokuse i to stopom koja je 10^6 puta veća od stope spontanijih mutacija drugih gena. SHM se uvode u varijabilne regione H i L lanaca, dok konstantni regioni nisu zahvaćeni. SHM preferencijalno ciljaju specifična „vruća mesta“ (RGYW ili njemu inverzni WRCY motiv), tranzicije su češće od transverzija, i akumuliraju se kako u FR tako i u CDR regionima [30]. Mutacije koje dovode do amino-kiselinske zamene („missense“ mutacije) su koncentrisane u CDR regionima, s obzirom da one menjaju afinitet IG za antigen. S druge strane, one su retke u FR regionima jer bi tako mogle da naruše osnovnu arhitekturu IG molekula, i tu preovlađuju „silent“ mutacije. Proces SHM može da dovede i do uvođenja malih insercija i delecija, ali je ovo redak događaj i njegov mehanizam je drugačiji od SHM posredovanih AID enzimom.

Akumulacijom SHM nastaje klonalno potomstvo aktivirane B ćelije sa diverzifikovanim IG repertoarom i, stoga, različitim afinitetom za antigen. Ove ćelije zatim podležu selekciji antigenom: B ćelije koje efikasno prepoznaju antigen prezentovan od strane folikularnih dendritičnih ćelija primaju signale za preživljavanje, putem aktivacije BĆR i kostimulacije T ćelijama, i nastavljaju da proliferišu, dok B ćelije koje ne vezuju antigen ili ga vezuju niskim afinitetom umiru apoptozom. Višestruke runde proliferacije, SHM i selekcije dovode do tzv. „afinitetnog sazrevanja“, odnosno produkcije B limfocita sa sve većom specifičnošću i afinitetom za antigen. Uporedo sa afinitetnim sazrevanjem, odvijaju se „class-switch“ rekombinacije (takođe posredovane AID) koje dovode do fuzije *IGHV-IGHD-IGHJ* rearanžmana sa nizvodnim C genom, što omogućava sintezu drugih IG izotipova osim IgM i IgD, ali sa istom antigenskom specifičnošću [31]. Selektovane B ćelije na kraju ovog procesa napuštaju germinalni centar i završavaju svoju diferencijaciju u visoko specifične plazma ćelije i memorijske ćelije sa određenim efektorskim funkcijama.

SHM i „class-switch“ rekombinacije dalje povećavaju varijabilnost IG molekula i, u kombinaciji sa prethodno opisanim mehanizmima „combinatorial“ i „junctional“ diverziteta, omogućavaju produkciju do 10^{12} različitih antitela [24]. Potencijal B limfocita da proizvedu tako ogroman repertoar IG ima, međutim, visoku cenu, s obziroma da na putu diferencijacije dolazi do gubitka velikog broja ćelija. Naime, mehanizmi kojima se kreira diverzitet IG mogu dovesti do formiranja neproaktivnih rearanžmana, usled rekombinacije nefunkcionalnih pseudogena, „out-of-frame“ fuzija, nastanka stop kodona na mestima spajanja rekombinovanih gena, kao i uvođenjem stop kodona i „frameshift“ mutacija tokom SHM. Pored toga, „missense“ mutacije indukovane procesom SHM mogu da poremete strukturu IG molekula ili da smanje njegov afinitet za antigen. Kao što je već napomenuto, B limfociti koji ne uspeju da formiraju produktivni rearanžman H i L lanaca, te ne mogu da produkuju funkcionalna antitela, umiru apoptozom.

IMUNOGENETIKA HLL – RETROSPEKTIVA

Uloga BĆR u patogenezi HLL je dospela u prvi plan zahvaljujući studijama iz 1990-tih godina u kojima su otkrivene restrikcije u genskom repertoaru *IGHV-IGHD-IGHJ* rearanžmana HLL B limfocita, odnosno preovlađivanje određenih *IGHV* genskih familija (*IGHV1*>*IGHV3*>*IGHV4*) i *IGHV* gena (npr. *IGHV1-69*, *IGHV3-7*, *IGHV4-34*), što je ukazalo na selekciju B progenitora koji ekspimiraju određeni BĆR [32-35]. Rezultati ovih pionirskih studija

su inspirisali dalja istraživanja na polju imunogenetičke karakterizacije HLL, i ubrzo je otkriveno da veliki broj HLL pacijenata eksprimira klon-specifični BĆR IG sa somatskim hipermutacijama, čime je opovrgnuto dotadašnje shvatanje da je HLL malignitet antigen-naivnih B ćelija, i prvi put ukazano na učešće antigena u razvoju ove bolesti. Pokazano je da se patern SHM razlikuje kako kvantitativno (broj), tako i kvalitativno (tip i distribucija) u zavisnosti od *IGHV* gena u klon-specifičnom *IGHV-IGHD-IGHJ* rearanžmanu. Pored toga, odnos između broja „missense“ i „silent“ SHM (visok u CDR regionima, a nizak u FR regionima) ukazao je na potrebu za održanjem funkcionalnosti BĆR IG, odnosno na selekciju antigenom [35].

Sledeća velika prekretnica u izučavanju HLL dogodila se 1999. godine kada su dve istraživačke grupe, nezavisno jedna od druge, došle do otkrića da se HLL pacijenti mogu podeliti u dve grupe sa različitim kliničkim tokom i ishodom bolesti u zavisnosti od prisustva SHM u *IGHV* genu klon-specifičnog BĆR IG. Pacijenti sa značajnim SHM opterećenjem (<98% identičnosti između rearanžiranog i odgovarajućeg „germline“ *IGHV* gena; „mutirana HLL“, M-HLL) imaju blaži tok bolesti i povoljnu prognozu, nasuprot pacijentima sa visokim stepenom identičnosti (>98%; „nemutirana HLL“, N-HLL) koji imaju agresivnu formu bolesti i lošiju prognozu [36, 37]. *IGHV* mutacioni status je do danas ostao najpouzdaniji prognostički marker u HLL, nezavisan od kliničkog stadijuma i drugih biomarkera [38, 39]. Što je još važnije, to je i najstabilniji marker, koji se može odrediti u bilo kom trenutku bolesti, čime se razlikuje od drugih prognostičkih i prediktivnih markera (uključujući i hromozomske aberacije) koji se menjaju tokom evolucije HLL [15, 40]. Ipak, treba naglasiti da binarna podela na M-HLL i N-HLL ne odslikava u potpunosti kliničku heterogenost HLL, s obzirom da neki M-HLL pacijenti imaju stabilnu bolest bez potrebe za lečenjem, dok kod drugih ona ipak progredira u agresivnu formu [41]. U novije vreme se pokazalo da je *IGHV* SHM status ujedno i značajan prediktivni marker. Naime, N-HLL pacijenti mnogo bolje odgovaraju na nove ciljane terapije (BĆR i Bcl2 inhibitori) nego na hemoimunoterapiju koja je efikasna kod M-HLL pacijenata bez visoko rizičnih genetičkih lezija (*TP53* i/ili *ATM* aberacije) [1, 42-45]. Zato se danas određivanje ovog biomarkera smatra esencijalnim za donošenje odluke o prvoj liniji terapije za sve HLL pacijente, kako u svakodnevnoj kliničkoj praksi, tako i u kliničkim studijama [1].

Veliki interes za *IGHV* mutacioni status, i sa biološkog i sa kliničkog stanovišta, doveo je do nagle akumulacije podataka o velikom broju HLL-specifičnih BĆR IG i pokrenuo detaljnije analize njihove molekularne konfiguracije. Nekoliko godina nakon otkrića prognostičkog značaja *IGHV* SHM statusa primećeno je da oko 50% HLL *IGHV-IGHD-IGHJ* rearanžmana koji sadrže *IGHV3-21* gen imaju skoro identičan VH CDR3. Štaviše, kod ovih pacijenata je detektovana i restrikcija u lakom lancu IG, pošto je on uvek bio kodiran *IGLV3-21* genom [46, 47]. Imajući u vidu da je verovatnoća da dva različita B-ćelijska klona ekspimiraju identičan BĆR IG praktično zanemarljiva (oko 10^{-12}), bilo je jasno da nije u pitanju slučajnost, već da je verovatno reč o selekciji datih B ćelija nekim zajedničkim antigenskim epitopom. Ubrzo zatim, nekoliko studija je pokazalo da restrikcije u *IGHV* repertoaru i VH CDR3 amino-kiselinskoj kompoziciji nisu ograničene samo na slučajeve sa *IGHV3-21* genom, već da su odlika značajne frakcije HLL [48-52]. Ovi visoko homologni BĆR IG prisutni kod nesrodnih i na druge načine nepovezanih HLL pacijenata su nazvani „stereotipnim BĆR“ [50].

STEREOTIPIJA B-ĆELIJSKIH RECEPTORA – KLASIFIKACIJA U STEREOTIPNE SUBSETOVE

Od otkrića BĆR stereotipije 2004. godine počelo je intenzivno proučavanje ovog fenomena. Kako su studije postepeno obuhvatale sve veće kohorte HLL pacijenata, progresivno je rastao i broj identifikovanih različitih grupa pacijenata sa karakterističnim prototipskim BĆR IG (tzv. „stereotipni subsetovi“), kao i ukupna frekvencija stereotipije [48-59] (Slika 3). Ova istraživanja su otvorila niz novih pitanja: 1) da li je stereotipija prisutna samo u frakciji HLL, ili će obuhvatiti sve pacijente ukoliko se ispita dovoljno veliki broj slučajeva; 2)

koliko ima stereotipnih subsetova i koja je njihova učestalost; 3) da li je BĆR stereotipija karakteristična samo za HLL ili postoji i kod drugih B-ćelijskih maligniteta, i koji je njen biološki i klinički značaj.

Polazna tačka u definisanju stereotipnih subsetova bili su *IGHV* gen i kompozicija VH CDR3, s obzirom na njihovu ulogu u vezivanju antigena, a time i selekciji B ćelija. VH CDR3 je ključan za oblikovanje antigenvezujućeg mesta, tako da IG sa sličnom VH CDR3 amino-kiselinskom sekvencom imaju sličnu 3D strukturu i specifičnost za antigen [22]. Zato je prvobitni set kriterijuma za klasifikovanje BĆR IG u isti stereotipni subset podrazumevao: 1) prisustvo istih *IGHV*, *IGHD* i *IGHJ* gena; 2) upotrebu istog okvira čitanja *IGHD* gena, i 3) identičnost VH CDR3 amino-kiselinske sekvence $\geq 60\%$ [48, 50]. Ovaj inicijalni pristup je uskoro modifikovan, jer je uočeno da su u nekim slučajevima IGH sa različitim *IGHV* genima imali isti VH CDR3 i IGL partnere. *IGHV* geni su, u ovim slučajevima, uvek pripadali istom filogenetskom klanu i imali su homologne primarne sekvence s obzirom da potiču od zajedničkog ancestralnog gena [60, 61]. Tako je pokazano da sekvence *IGHV-IGHD-IGHJ* rearanžmana mogu da klasteruju zajedno, odnosno da se svrstaju u isti subset, ako sadrže različiti *IGHV* gen ali iz istog klana, iste *IGHD* i *IGHJ* gene, i ako imaju zajedničke amino-kiselinske motive u VH CDR3. Tipičan primer je subset #1 koji se karakteriše prisustvom *IGHD6-19* i *IGHJ4* gena u kombinaciji sa više različitih *IGHV* gena (*IGHV1-2*, *IGHV1-3*, *IGHV1-8*, *IGHV1-18*, *IGHV5-10-1*, *IGHV5-51*, *IGHV7-4-1*) koji svi pripadaju filogenetskom klanu I [50, 53]. Slično je i sa subsetovima #12 (*IGHV1-2* i *IGHV1-46*), #59 (*IGHV1-58* i *IGHV1-69*) i #77 (*IGHV4-4* i *IGHV4-59*) [53, 54].

Sa porastom broja sekvenciranih HLL *IGHV-IGHD-IGHJ* rearanžmana pojavila se potreba za njihovom automatizovanom analizom, i ubrzo su razvijeni specijalizovani bioinformatički alati koji su omogućili identifikaciju i klasterovanje sličnih VH CDR3 sekvenci [56]. To je dovelo do uspostavljanja novog seta kriterijuma za definisanje subsetova koji se i danas koristi, a podrazumeva da je za klasifikovanje rearanžmana u isti subset neophodno: 1) prisustvo *IGHV* gena koji pripadaju istom filogenetskom klanu (I, II ili III); 2) identična dužina VH CDR3 i prisustvo definisanih amino-kiselinskih motiva (identičnih amino-kiselina na kritičnim pozicijama u VH CDR3), i 3) najmanje 50% identičnosti i 70% sličnosti amino-kiselinske sekvence VH CDR3 [56, 57]. Ovaj pristup je prvi put primenjen u studiji iz 2012. godine koja je obuhvatila do tada najveći broj HLL pacijenata, preko 7000 [57]. Na osnovu jedinstvenih VH CDR3 motiva, u ovoj studiji je identifikovano više stotina stereotipnih subsetova i oko 30% svih analiziranih *IGHV-IGHD-IGHJ* rearanžmana je klasifikovano u stereotipnu frakciju HLL. Većina identifikovanih subsetova je sadržala samo po nekoliko slučajeva („minor“ subsetovi), dok je u 19 subsetova klasterovalo po više od 20 *IGHV-IGHD-IGHJ* sekvenci i oni su nazvani „major“ stereotipnim subsetovima. „Major“ subsetovi su u ovoj studiji obuhvatili 41% svih stereotipnih rearanžmana i 12,4% celokupne HLL kohorte. Slična metrika se zadržala i u studiji iz 2017. godine, sprovedenoj na oko 20000 pacijenata, dok je donekle promenjena u najnovijoj studiji iz 2021. godine koja je obuhvatila oko 30000 slučajeva i u kojoj je čak 41% rearanžmana klasifikovano u stereotipne subsetove [58, 59]. U ovoj, do sada najvećoj studiji, identifikovano je 10 novih „major“ subsetova, dok je 19 subsetova prethodno označenih kao „major“ zadržalo svoje relativne frekvencije; svi „major“ subsetovi su sadržali po minimum 60 slučajeva (0,2% kohorte). Na nivou celokupne kohorte „major“ subsetovi su bili zastupljeni sa 13%, „minor“ sa 28%, dok je ostatak predstavljao heterogenu (nestereotipnu) frakciju (59%) (Slika 4). Poređenje svih navedenih studija je pokazalo da, iako je sa porastom broja ispitivanih HLL pacijenata rastao i broj subsetova, frekvencija stereotipije se nije povećavala proporcionalno veličini kohorte, već je dostigla plato od oko 30% pri kritičnoj veličini od oko 2500 slučajeva (Slika 3).

Analizirani su i odnosi između BĆR stereotipije i drugih imunogenetičkih karakteristika HLL, kao što su *IGHV* genski repertoar i SHM status. Tako je pokazano da se *IGHV* repertoar stereotipne i heterogene frakcije HLL značajno razlikuju; rearanžmani sa *IGHV1-69* i *IGHV3-21* genom su češći u stereotipnoj HLL, rearanžmani sa *IGHV3-23* u heterogenoj HLL, dok su rearanžmani sa *IGHV4-34* genom zastupljeni sa sličnom

učestalošću u ove dve frakcije [59]. Pored toga, primećeno da je udeo stereotipnih BĆR IG veći u N-HLL nego u M-HLL, kao i da postoje značajne razlike u *IGHV* repertoaru i kompoziciji VH CDR3 stereotipnih subsetova u ove dve pogrupe HLL. Na primer, rearanžirani klasifikovani u subsetove #3, #5, #6, #7 i #8 sadrže nemutirane *IGHV* gene (*IGHV1-69*, *IGHV1-2*, *IGHV4-39*) i VH CDR3 sa dugačkim subset-specifičnim amino-kiselinskim motivima [41, 53, 57, 59]. S druge strane, stereotipni subsetovi u okviru M-HLL uglavnom sadrže gene iz *IGHV4* familije (*IGHV4-34*, *IGHV4-59*, *IGHV4-4*), a VH CDR3 motivi su definisani pomoću samo nekoliko amino-kiselinskih ostataka. Pored toga, SHM profili ovih subsetova se značajno razlikuju, čak i među subsetovima sa istim *IGHV* genom [53, 57, 59]. To je naročito upadljivo u slučaju subsetova #4, #16, #29 i #201 koji svi sadrže mutirani *IGHV4-34* a imaju različit spektar rekurentnih i subset-specifičnih SHM, što je verovatno odraz različitog tipa antigenske stimulacije [58].

Kristalografske analize i *in silico* modelovanje klonotipskih BĆR IG pokazali su visok stepen sličnosti 3D strukture BĆR IG koji pripadaju istom stereotipnom subsetu, što je još jedna potvrda da je klasterovanje na osnovu homologije primarne sekvence IG opravdano [62-64]. Ove analize su ukazale i na sposobnost homotipskih interakcija BĆR koji pripadaju određenim subsetovima. Na primer, specifični amino-kiselinski motiv u VH CDR3 subseta #4 omogućava homotipsko prepoznavanje receptora, što dovodi do njihovog kros-linkovanja na površini B limfocita i pokretanja unutarćelijske signalne kaskade (autonomna BĆR signalizacija) [63]. Homotipske interakcije su primećene i u subsetu #2, ali se u ovom slučaju ostvaruju putem lakih lanaca IG, a za kontakt je ključna jedna point mutacija u *IGLV3-21* genu [65].

U cilju ispitivanja tzv. „veza višeg reda“ između stereotipnih subsetova, u najnovijim studijama je razvijen novi bioinformatički pristup kako bi se identifikovali klasteri sličnih subsetova [59, 66]. To je podrazumevalo relaksiranje kriterijuma za definisanje subsetova, tako da su u isti klaster subsetova klasifikovani oni sa *IGHV* genima iz istog filogenetskog klana, ali je bilo dozvoljeno da se dužina VH CDR3 i karakteristični amino-kiselinski motiv razlikuju do dva amino-kiselinska ostatka. Na taj način je otkriveno da 156 različitih „minor“ subsetova ispoljava visok stepen sličnosti sa 21 od ukupno 29 „major“ subsetova. Ovi „minor“ subsetovi su nazvani „satelitskim subsetovima“ i činili su oko 3% celokupne ispitivane HLL kohorte, odnosno 7,5% stereotipne frakcije [59] (Slika 4).

Karakterističan primer „major“ subseta i njegovog satelita su subset #1 i subset #99 koji sadrže *IGHV* gene iz filogenetskog klana I (familije *IGHV1/5/7*) i imaju slične VH CDR3 koji se razlikuju samo u dužini (13 amino-kiselina u subsetu #1 i 14 amino-kiselina u subsetu #9) [59]. Drugi primer je subset #2, najveći stereotipni subset (oko 2,5% HLL), definisan prisustvom *IGHV3-21/IGLV3-21* genskog para, kratkim VH CDR3 (9 amino-kiselina) i amino-kiselinom Asp ili Glu na poziciji 3 u okviru VH CDR3. Ovaj karakterističan amino-kiselinski ostatak je prisutan u 8 satelitskih subsetova koji svi sadrže gene iz familije *IGHV3* i imaju VH CDR3 dugačke 7-11 amino-kiselina. Najveći od satelita je subset #169, koji inače spada u „major“ subsetove i čini 0,2% HLL, a sličan je subsetu #2 jer: 1) sadrži gen *IGHV3-48* koji je 97% identičan genu *IGHV3-21*; 2) sadrži L lanac kodiran *IGLV3-21* genom; 3) dužina VH CDR3 je 9 amino-kiselina, i 4) sadrži iste rekurentne SHM kao subset #2 [66]. Koklasterovanje subsetova #2 i #169 je podržano i drugim sličnostima, kao što je visoka frekvencija *SF3B1* mutacija (45% u subsetu #2 i 43% u subsetu #169) u odnosu na generalnu HLL populaciju (5-8%), homotipske interakcije BĆR, visok nivo intraklonalne diverzifikacije i agresivni tok bolesti [59, 63, 66-69].

Na kraju, treba naglasiti da BĆR stereotipija nije ekskluzivitet HLL, već je detektovana i u drugim B-ćelijskim limfomima, kao što su limfom „mantle“ ćelija i splenični limfom marginalne zone, ali sa značajno manjom frekvencijom. Poređenje HLL stereotipova sa stereotipovima identifikovanim u navedenim limfomima je pokazalo da među njima postoje fundamentalne razlike u dužini i amino-kiselinskoj sekvenci VH CDR3, što ukazuje na to da su u patogenezu ovih bolesti uključeni različiti imunološki mehanizmi [70, 71].

BIOLOŠKE KARAKTERISTIKE STEREOTIPNIH SUBSETOVA

Brojna istraživanja su pokazala da se stereotipija u HLL ne odnosi samo na klon-specifični BĆR IG, već da slučajevi klasifikovani u isti stereotipni subset imaju i slične genetičke, epigenetičke i transkriptomске profile, kao i da pokazuju sličan tip odgovora na stimulaciju BĆR i drugih receptora na površini B limfocita [58, 67-69, 72-81]. To implicira da je ekspresija stereotipnih BĆR na neki način spregnuta sa akvizicijom određenih bioloških karakteristika, verovatno kroz različite interakcije sa mikrosredinom i to u subset-specifičnom maniru [67]. Kao rezultat ovih mehanizama, nasuprot velikoj heterogenosti HLL u celini stoji izrazita homogenost stereotipnih subsetova, što naglašava potrebu za kompartmentalizovanim pristupom u istraživanju HLL.

U ovom odeljku će biti prikazane osnovne karakteristike četiri paradigmatična „major“ stereotipna sub-seta (#1, #2, #4 i #8) (Tabela 1).

Subset #1

Stereotipni subset #1 (*Klan I IGHV/IGKV1(D)-39*) obuhvata 2-2,5% HLL i odlikuje se karakterističnim ekspresionim profilom određenih gena uključenih u regulaciju apoptoze, proliferacije, oksidativnih procesa i BĆR signalnu transdukciju [57, 59]. To je uzrok rezistencije ćelija sub-seta #1 na apoptozu, kao i značajno veće stope proliferacije nakon stimulacije BĆR u odnosu na druge sub-setove [82]. Pored toga, ćelije sub-seta #1 se odlikuju i subset-specifičnom indukcijom ekspresije kostimulatornih molekula (CD25 i CD86) nakon stimulacije TLR7 receptora [77, 80]. Diferencijalna genska ekspresija u odnosu na druge sub-setove se odnosi i na različite miRNA. Na primer, zapažena je značajno snižena ekspresija miRNA-101, koja spada u tzv. „epi-miRNA“, grupu miRNA koje regulišu ekspresiju komponenti epigenetičke mašinerije [76]. miRNA-101 reguliše EZH2, enzimatiku sub-jedinicu PRC2 kompleksa koji dovodi do represije transkripcije putem metilacije histona H3. Niska ekspresija miRNA-101 u HLL ćelijama sub-seta #1 dovodi do overekspresije EZH2, što je povezano sa višom stopom proliferacije [76]. Subset 1# se karakteriše i većom zastupljenošću *NOTCH1* mutacija u odnosu na generalnu HLL populaciju (22% vs. 5-10%), kao i *NFKBIE* mutacija (15% vs. 7%) koje vode do konstitutivne aktivacije NF-κB signalnog puta [2, 59, 67, 83].

Subset #2

Subset #2 (*IGHV3-21/IGLV3-21*), najveći stereotipni subset, obuhvata 2,5-3% generalne HLL populacije i oko 5,5% HLL koja zahteva lečenje [57, 59, 84-86]. Oko 40% slučajeva koji se klasifikuju u subset #2 pripada N-HLL, dok su 60% M-HLL pacijenti, koji imaju karakterističan patern rekurentnih SHM [47, 53, 54, 57, 87, 88]. Izrazito agresivan klinički tok bolesti, bez obzira na SHM status, je dugo bio enigma, s obzirom da su aberacije gena *TP53* (mutacije i/ili delecije) retke u subsetu #2. Pored toga, nepovoljna prognoza nije mogla biti objašnjena ni najčešćim citogenetičkim aberacijama u ovom subsetu, a to su del11q22-q23 i del13q14 [73, 85, 89]. Zato je veoma značajno bilo otkriće da su mutacije u kodirajućem regionu gena *SF3B1*, koji kodira kritičnu komponentu splajsozoma, mnogo češće u subsetu #2 (45-50%) nego u generalnoj HLL populaciji na dijagnozi, kao i u drugim agresivnim subsetovima (5-10%) [15, 59, 67-69, 90]. Iako uloga poremećene funkcije splajsozoma u patogenezi HLL nije u potpunosti rasvetljena, primer sub-seta #2 je inspirisao mnoga istraživanja čiji je cilj razvijanje terapija usmerenih na rekurentne *SF3B1* mutacije [91].

Subset #4

Subset #4 (*IGHV4-34/IGKV2-30*) je najveći stereotipni subset u M-HLL, i obuhvata oko 1% svih HLL pacijenata [57, 59]. Klonovi koji pripadaju subsetu #4 su genetički prilično monotoni, s obzirom da su rekurentne

mutacije najčešće mutiranih gena izuzetno retke, a od hromozomskih aberacija je najčešća del13q, generalno asocirana sa povoljnom prognozom [59, 67, 72, 73, 85]. Nasuprot tome, imunogenetički gledano subset #4 je izuzetno interesantan, s obzirom na sledeće karakteristike: 1) BCR IG su IgG izotipa, što je u HLL retko (najčešće su IgM); 2) *IGHV4-34/IGKV2-30* je redak genski par; 3) VH CDR3 je dugačak i pozitivno naelektrisan, što podseća na patogena anti-DNK antitela; 4) patern SHM je karakterističan za editovane auto-reaktivne BCR IG, i 5) prisutna je intenzivna intraklonalna diverzifikacija u smislu konstantnog uvođenja SHM, što ukazuje na kontinuiranu interakciju sa antigenom [53, 54, 87, 92-97]. Na osnovu svih navedenih karakteristika, a imajući u vidu i indolentan tok bolesti kod pacijenata koji pripadaju subsetu #4, pretpostavljeno je da se ćelije ovog submeta nalaze u stanju anergije u kome imaju usporen odgovor na stimulišuće (auto)antigene [54, 87, 94, 96, 97]. Ova hipoteza se ispostavila ispravnom kada je pokazano da ćelije submeta #4 ispoljavaju konstitutivnu aktivaciju ERK1/2 signalnog puta i nakon BCR kros-linkovanja ne oslobađaju Ca^{2+} i ne aktiviraju MAP signalnu kaskadu, što su sve osobine B-ćelijske anergije [79, 98].

Subset #8

Subset #8 (*IGHV4-39/IGKV1(D)-39*) pripada N-HLL podtipu i eksprimira BCR IG gama izotipa [49, 59, 92]. Genetički profil ovog submeta se karakteriše visokom frekvencijom trizomije 12 (60%) i *NOTCH1* mutacija (34-62%) [67-69]. Interesantna odlika submeta #8 je njegova antigenska reaktivnost. Naime, testiranjem različitih (auto)antigena je pokazano da monoklonska antitela (mAb) submeta #8 ispoljavaju široku polireaktivnost, što je u suprotnosti sa mAb drugih agresivnih subsetova (#1 i #2), čija je reaktivnost mnogo restriktivnija [78]. Takođe je pokazano da promiskuitetna antigen-vezujuća specifičnost dovodi do snažne aktivacije primarnih B ćelija submeta #8 nakon stimulacije antigenima [78]. Na osnovu navedenih rezultata je pretpostavljeno da sposobnost ovih ćelija da odgovaraju na širok spektar stimulusa iz mikrosredine indukuje njihovu konstantnu aktivaciju dovodeći do progresivne selekcije sve agresivnijih klonova, što bi moglo biti objašnjenje za brzo napredovanje bolesti, kao i za povećan rizik od Rihterove transformacije (transformacija HLL u agresivni limfom, najčešće difuzni B krupnoćelijski limfom) u ovom subsetu [99].

KLINIČKI ZNAČAJ STEREOTIPIJE B-ĆELIJSKIH RECEPTORA

Pored homogenosti po pitanju bioloških karakteristika, mnoge studije su pokazale da stereotipni subsetovi ispoljavaju konzistentne subset-specifične kliničke karakteristike, kao što su starost i pol pacijenata klasifikovanih u određeni subset, tumorsko opterećenje na dijagnozi, evolucija i ishod bolesti. U fokusu ovih studija su bili prvenstveno subsetovi #1, #2 i #4 s obzirom da su najbrojniji (#1 je najveći u N-HLL, #4 u M-HLL, a #2 je najveći u celokupnoj HLL i sadrži i M-HLL i N-HLL pacijente) i, stoga, najbolje okarakterisani u biološkom i kliničkom smislu [58, 85, 86, 99] (Tabela 1). Rezultati ovih istraživanja ne samo što su ukazali na prognostički značaj BCR stereotipije, već i na njen potencijal za mnogo precizniju subklasifikaciju HLL nego što je to binarna podela na M-HLL i N-HLL na osnovu *IGHV* SHM statusa. Ilustrativan primer za ovo su subsetovi #4, #16, #29 i #201, koji svi ekspimiraju somatski hipermutiran *IGHV4-34*, ali imaju značajno različit klinički tok [58].

Poređenjem kliniko-bioloških karakteristika stereotipnih subsetova se došlo do zaključka da se neki od njih (subset #1, #2, #4, #8) mogu posmatrati kao različiti homogeni entiteti u okviru heterogene HLL. Na primer, pacijenti klasifikovani u subset #4 su značajno mlađi od pacijenata subsetova #1 i #2 (medijana starosti na dijagnozi je 55 vs. 65 godina) [85]. Što se tiče tumorskog opterećenja, >50% pacijenata u subsetu #2 se dijagnostikuje u uznapredovalim kliničkim stadijumima Bine B i C, iako većina pripada M-HLL podtipu, dok je frekvencija Bine B i C stadijuma na dijagnozi u subsetu #4 samo 7% [85]. Subset #4 je asociran sa veoma

indolentnim kliničkim tokom i medijalnim vremenom do prve terapije (eng. „time to first treatment“, TTFT) od 11 godina, što je odraz još sporijeg napredovanja bolesti nego kod pacijenata sa del13q14 (medijana TTFT je 6,7 godina) koji se smatraju prototipom indolentne HLL. Nasuprot tome, subsetovi #1 i #2 su asocirani sa izuzetno agresivnom formom bolesti (medijana TTFT je 1,6 i 1,9 godina, respektivno), i prognoza je slična kao u HLL sa aberacijama gena *TP53*. Treba naglasiti da su navedene asocijacije sa TTFT nezavisne od citogenetičkih aberacija, kao i od Bine stadijuma na dijagnozi [85].

Sa kliničkog stanovišta, posebno je interesantan slučaj stereotipnog subseta #2. Naime, ekspresija BCR IG sa genom *IGHV3-21* je dugo vremena smatrana nepovoljnim prognostičkim markerom u HLL, ali je bilo nejasno da li je loša prognoza povezana sa *IGHV3-21* genom *per se*, ili uzrok leži u tome što većina ovih slučajeva pripada subsetu #2 [51, 100, 101]. Tek nakon opsežnijih istraživanja na većim kohortama je pokazano da je pripadnost subsetu #2 nezavisan prognostički marker povezan sa agresivnom bolešću, odnosno kraćim TTFT, TTNT (eng. „time to next treatment“, vreme do sledeće terapije), PFS (eng. „progression-free survival“, vreme bez progresije bolesti) i OS (eng. „overall survival“, ukupno preživljavanje), i to bez obzira na SHM status. S druge strane, kod pacijenata koji ekspiriraju BCR IG sa *IGHV3-21* genom ali ne pripadaju subsetu #2 tok bolesti jasno zavisi od SHM statusa, kao i u ostatku HLL [84, 86]. Pripadnost subsetu #2 se pokazala kao nepovoljan prognostički marker i kada su analizirani samo pacijenti u ranom kliničkom stadijumu bolesti (Bine A). S obzirom da se danas kod najvećeg broj pacijenata dijagnoza postavlja upravo u ranoj fazi, kada su bez simptoma i u tzv. „posmatraj i čekaj“ režimu praćenja, grupa ERIC („European Research Initiative on CLL“) je predložila da se uz analizu *IGHV* SHM statusa u kliničku praksu uvede i testiranje *IGH* sekvenci pacijenata na pripadnost subsetu #2 [102].

Subset #8 je asociran sa agresivnom formom HLL, rekurentnim infekcijama, pojavom sekundarnih maligniteta, a karakteriše se i najvećim rizikom od Rihterove transformacije nezavisno od drugih prognostičkih faktora [99]. Zanimljivo je i da ovaj subset obuhvata pretežno žene, što je u suprotnosti sa predominacijom muškaraca u generalnoj HLL populaciji [49].

Nedavno otkriće satelitskih subsetova se u budućnosti takođe može ispostaviti klinički relevantnim, na šta ukazuju primeri subseta #2 i njegovog satelita #169, kao i subseta #1 i njegovog satelita #99; subsetovi u svakom od navedenih parova imaju sličan TTFT i OS [59, 66].

ZAKLJUČAK

Otkriće stereotipije B-ćelijskih receptora je unelo suštinske promene u razumevanje ontogenije i evolucije HLL. Dok se ranije HLL smatrala leukemijom naivnih B ćelija, danas je jasno da je njena patogeneza rezultat složenih interakcija B limfocita sa mikrosredinom, a BCR stereotipija predstavlja krunski dokaz da u tom procesu ključnu ulogu ima prepoznavanje određenih antigena. Prognostički značaj stereotipije je višestruko dokumentovan za nekoliko najvećih subsetova, i otvara mogućnost preciznije stratifikacije pacijenata kako bi se prevazišla velika klinička heterogenost HLL. Pored toga, pojavila se i ideja da se BCR stereotipija iskoristi za razvoj novih terapijskih strategija. Naime, u najnovijim studijama je ispitivana imunogenost VH CDR3 regiona subsetova #1 i #2 *in vivo*. Pokazano je da imunizacija Eμ-TCL1 miševa stereotipnim VH CDR3 peptidima pre transplantacije odgovarajućih HLL ćelija dovodi do sporijeg razvoja bolesti i dužeg preživljavanja, što ukazuje na mogućnost da se stereotipne VH CDR3 sekvence iskoriste za dizajniranje subset-specifičnih vakcina [103, 104].

Iako BCR stereotipija ima potencijal da postane veoma značajan prognostički i prediktivni marker u HLL, treba imati u vidu da je to relevantno samo za trećinu ukupnog broja pacijenata. Ipak, dalja istraživa-

nja stereotipije će doprineti ne samo boljoj karakterizaciji stereotipnih subsetova, već i boljem razumevanju biologije nestereotipne frakcije HLL.

ZAHVALNICA

Izrada ovog rada je omogućena zahvaljujući projektu Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije, broj ugovora - 451-03-47/2023-01/200042.

REFERENCE

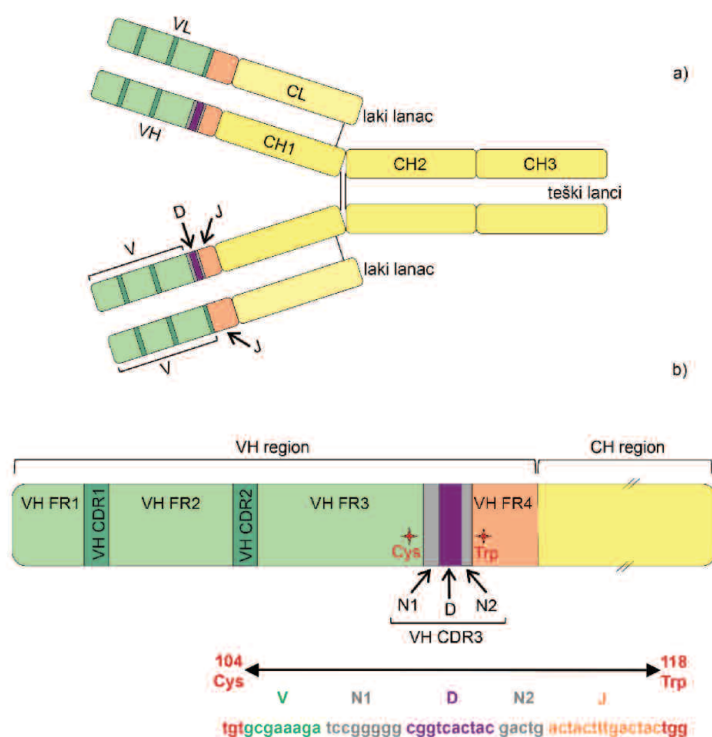
1. Hallek M. Chronic lymphocytic leukemia: 2020 update on diagnosis, risk stratification and treatment. *Am J Hematol.* 2019;94(11):1266-87.
2. Sutton LA, Rosenquist R. The complex interplay between cell-intrinsic and cell-extrinsic factors driving the evolution of chronic lymphocytic leukemia. *Semin Cancer Biol.* 2015;34:22-35.
3. Dohner H, Stilgenbauer S, Benner A, Leupolt E, Krober A, Bullinger L, et al. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med.* 2000;343(26):1910-6.
4. Landau DA, Tausch E, Taylor-Weiner AN, Stewart C, Reiter JG, Bahlo J, et al. Mutations driving CLL and their evolution in progression and relapse. *Nature.* 2015;526(7574):525-30.
5. Puente XS, Bea S, Valdes-Mas R, Villamor N, Gutierrez-Abril J, Martin-Subero JL, et al. Non-coding recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia. *Nature.* 2015;526(7574):519-24.
6. Mansouri L, Wierzbinska JA, Plass C, Rosenquist R. Epigenetic deregulation in chronic lymphocytic leukemia: Clinical and biological impact. *Semin Cancer Biol.* 2018;51:1-11.
7. Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, et al. Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(24):15524-9.
8. Klein U, Lia M, Crespo M, Siegel R, Shen Q, Mo T, et al. The DLEU2/miR-15a/16-1 cluster controls B cell proliferation and its deletion leads to chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Cell.* 2010;17(1):28-40.
9. Seiffert M, Dietrich S, Jethwa A, Glimm H, Lichter P, Zenz T. Exploiting biological diversity and genomic aberrations in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma.* 2012;53(6):1023-31.
10. Rossi D, Fangazio M, Rasi S, Vaisitti T, Monti S, Cresta S, et al. Disruption of BIRC3 associates with fludarabine chemorefractoriness in TP53 wild-type chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 2012;119(12):2854-62.
11. Rose-Zerilli MJ, Forster J, Parker H, Parker A, Rodriguez AE, Chaplin T, et al. ATM mutation rather than BIRC3 deletion and/or mutation predicts reduced survival in 11q-deleted chronic lymphocytic leukemia: data from the UK LRF CLL4 trial. *Haematologica.* 2014;99(4):736-42.
12. Alhourani E, Othman MA, Melo JB, Carreira IM, Grygalewicz B, Vujic D, et al. BIRC3 alterations in chronic and B-cell acute lymphocytic leukemia patients. *Oncol Lett.* 2016;11(5):3240-6.
13. Zenz T, Habe S, Denzel T, Mohr J, Winkler D, Buhler A, et al. Detailed analysis of p53 pathway defects in fludarabine-refractory chronic lymphocytic leukemia (CLL): dissecting the contribution of 17p deletion, TP53 mutation, p53-p21 dysfunction, and miR34a in a prospective clinical trial. *Blood.* 2009;114(13):2589-97.
14. Malcikova J, Smardova J, Rocnova L, Tichy B, Kuglik P, Vranova V, et al. Monoallelic and biallelic inactivation of TP53 gene in chronic lymphocytic leukemia: selection, impact on survival, and response to DNA damage. *Blood.* 2009;114(26):5307-14.
15. Baliakas P, Hadzidimitriou A, Sutton LA, Rossi D, Minga E, Villamor N, et al. Recurrent mutations refine prognosis in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia.* 2015;29(2):329-36.
16. Niemann CU, Wiestner A. B-cell receptor signaling as a driver of lymphoma development and evolution. *Semin Cancer Biol.* 2013;23(6):410-21.
17. Stevenson FK, Forconi F, Packham G. The meaning and relevance of B-cell receptor structure and function in chronic lymphocytic leukemia. *Semin Hematol.* 2014;51(3):158-67.

18. Chiorazzi N, Ferrarini M. B cell chronic lymphocytic leukemia: lessons learned from studies of the B cell antigen receptor. *Annu Rev Immunol.* 2003;21:841-94.
19. Byrd JC, Furman RR, Coutre SE, Flinn IW, Burger JA, Blum KA, et al. Targeting BTK with ibrutinib in relapsed chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med.* 2013;369(1):32-42.
20. Furman RR, Sharman JP, Coutre SE, Cheson BD, Pagel JM, Hillmen P, et al. Idelalisib and rituximab in relapsed chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med.* 2014;370(11):997-1007.
21. Skanland SS, Karlsen L, Tasken K. B cell signalling pathways-New targets for precision medicine in chronic lymphocytic leukaemia. *Scand J Immunol.* 2020;92(5):e12931.
22. Xu JL, Davis MM. Diversity in the CDR3 region of V(H) is sufficient for most antibody specificities. *Immunity.* 2000;13(1):37-45.
23. Lefranc MP, Pommie C, Ruiz M, Giudicelli V, Foulquier E, Truong L, et al. IMGT unique numbering for immunoglobulin and T cell receptor variable domains and Ig superfamily V-like domains. *Dev Comp Immunol.* 2003;27(1):55-77.
24. Lefranc M-P, G. L. The immunoglobulin FactsBook. London, UK: Academic Press; 2001.
25. Lefranc MP. Nomenclature of the human immunoglobulin heavy (IGH) genes. *Exp Clin Immunogenet.* 2001;18(2):100-16.
26. Brady BL, Steinell NC, Bassing CH. Antigen receptor allelic exclusion: an update and reappraisal. *J Immunol.* 2010;185(7):3801-8.
27. Glanville J, Kuo TC, von Budingen HC, Guey L, Berka J, Sundar PD, et al. Naive antibody gene-segment frequencies are heritable and unaltered by chronic lymphocyte ablation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108(50):20066-71.
28. Schatz DG, Spanopoulou E. Biochemistry of V(D)J recombination. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2005;290:49-85.
29. Luning Prak ET, Monestier M, Eisenberg RA. B cell receptor editing in tolerance and autoimmunity. *Ann N Y Acad Sci.* 2011;1217:96-121.
30. Peled JU, Kuang FL, Iglesias-Ussel MD, Roa S, Kalis SL, Goodman MF, et al. The biochemistry of somatic hypermutation. *Annu Rev Immunol.* 2008;26:481-511.
31. Stavnezer J, Guikema JE, Schrader CE. Mechanism and regulation of class switch recombination. *Annu Rev Immunol.* 2008;26:261-92.
32. Schroeder HW, Jr., Dighiero G. The pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia: analysis of the antibody repertoire. *Immunol Today.* 1994;15(6):288-94.
33. Hashimoto S, Dono M, Wakai M, Allen SL, Lichtman SM, Schulman P, et al. Somatic diversification and selection of immunoglobulin heavy and light chain variable region genes in IgG+ CD5+ chronic lymphocytic leukemia B cells. *J Exp Med.* 1995;181(4):1507-17.
34. Johnson TA, Rassenti LZ, Kipps TJ. Ig VH1 genes expressed in B cell chronic lymphocytic leukemia exhibit distinctive molecular features. *J Immunol.* 1997;158(1):235-46.
35. Fais F, Ghiotto F, Hashimoto S, Sellars B, Valetto A, Allen SL, et al. Chronic lymphocytic leukemia B cells express restricted sets of mutated and unmutated antigen receptors. *J Clin Invest.* 1998;102(8):1515-25.
36. Damle RN, Wasil T, Fais F, Ghiotto F, Valetto A, Allen SL, et al. Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 1999;94(6):1840-7.
37. Hamblin TJ, Davis Z, Gardiner A, Oscier DG, Stevenson FK. Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 1999;94(6):1848-54.
38. Karan-Djurasevic T, Pavlovic S. Somatic Hypermutational Status and Gene Repertoire of Immunoglobulin Rearrangements in Chronic Lymphocytic Leukemia. In: Isvoranu G, editor. *Lymphocyte Updates – Cancer, Autoimmunity and Infection.* In Tech, Rijeka; 2017. p. 49-78.
39. Lee J, Wang YL. Prognostic and Predictive Molecular Biomarkers in Chronic Lymphocytic Leukemia. *J Mol Diagn.* 2020;22(9):1114-25.
40. Sutton LA, Rosenquist R. Deciphering the molecular landscape in chronic lymphocytic leukemia: time frame of disease evolution. *Haematologica.* 2015;100(1):7-16.
41. Vardi A, Agathangelidis A, Sutton LA, Ghia P, Rosenquist R, Stamatopoulos K. Immunogenetic studies of chronic lymphocytic leukemia: revelations and speculations about ontogeny and clinical evolution. *Cancer Res.* 2014;74(16):4211-6.
42. Shanafelt TD, Wang XV, Kay NE, Hanson CA, O'Brien S, Barrientos J, et al. Ibrutinib-Rituximab or Chemoimmunotherapy for Chronic Lymphocytic Leukemia. *N Engl J Med.* 2019;381(5):432-43.
43. Fischer K, Al-Sawaf O, Bahlo J, Fink AM, Tandon M, Dixon M, et al. Venetoclax and Obinutuzumab in Patients with CLL and Coexisting Conditions. *N Engl J Med.* 2019;380(23):2225-36.

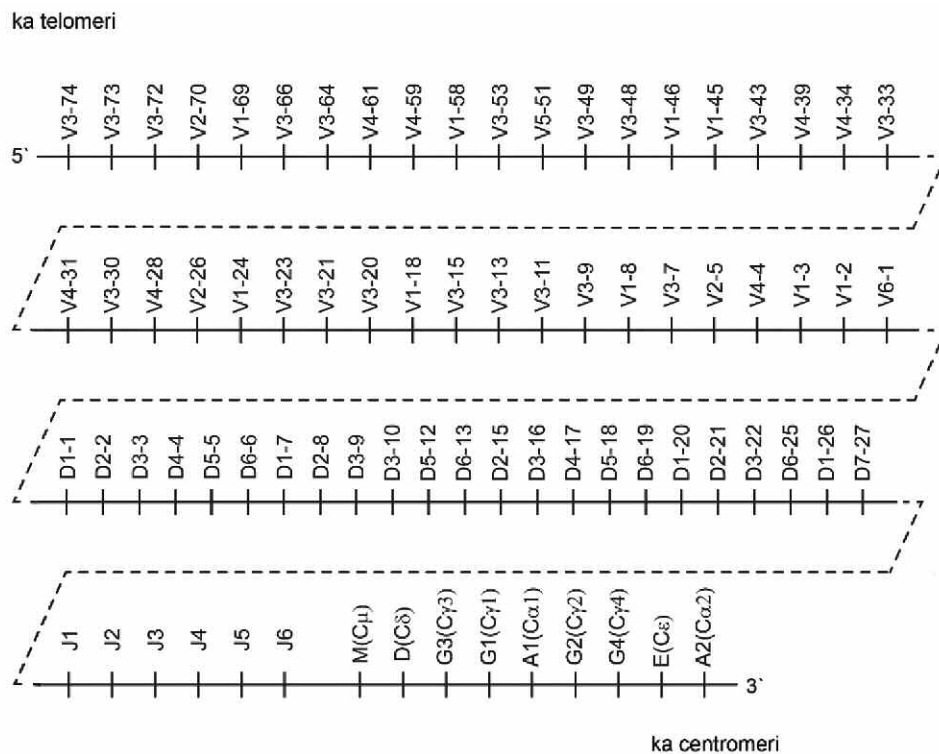
44. Fischer K, Bahlo J, Fink AM, Goede V, Herling CD, Cramer P, et al. Long-term remissions after FCR chemoimmunotherapy in previously untreated patients with CLL: updated results of the CLL8 trial. *Blood*. 2016;127(2):208-15.
45. Burger JA, Barr PM, Robak T, Owen C, Ghia P, Tedeschi A, et al. Long-term efficacy and safety of first-line ibrutinib treatment for patients with CLL/SLL: 5 years of follow-up from the phase 3 RESONATE-2 study. *Leukemia*. 2020;34(3):787-98.
46. Tobin G, Thunberg U, Johnson A, Thorn I, Soderberg O, Hultdin M, et al. Somatic mutated Ig V(H)3-21 genes characterize a new subset of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2002;99(6):2262-4.
47. Tobin G, Thunberg U, Johnson A, Eriksson I, Soderberg O, Karlsson K, et al. Chronic lymphocytic leukemias utilizing the VH3-21 gene display highly restricted Vlambda2-14 gene use and homologous CDR3s: implicating recognition of a common antigen epitope. *Blood*. 2003;101(12):4952-7.
48. Tobin G, Thunberg U, Karlsson K, Murray F, Laurell A, Willander K, et al. Subsets with restricted immunoglobulin gene rearrangement features indicate a role for antigen selection in the development of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2004;104(9):2879-85.
49. Ghiotto F, Fais F, Valetto A, Albesiano E, Hashimoto S, Dono M, et al. Remarkably similar antigen receptors among a subset of patients with chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Invest*. 2004;113(7):1008-16.
50. Messmer BT, Albesiano E, Efremov DG, Ghiotto F, Allen SL, Kolitz J, et al. Multiple distinct sets of stereotyped antigen receptors indicate a role for antigen in promoting chronic lymphocytic leukemia. *J Exp Med*. 2004;200(4):519-25.
51. Ghia P, Stamatopoulos K, Belessi C, Moreno C, Stella S, Guida G, et al. Geographic patterns and pathogenetic implications of IGHV gene usage in chronic lymphocytic leukemia: the lesson of the IGHV3-21 gene. *Blood*. 2005;105(4):1678-85.
52. Widhopf GF, 2nd, Rassenti LZ, Toy TL, Gribben JG, Wierda WG, Kipps TJ. Chronic lymphocytic leukemia B cells of more than 1% of patients express virtually identical immunoglobulins. *Blood*. 2004;104(8):2499-504.
53. Stamatopoulos K, Belessi C, Moreno C, Boudjograh M, Guida G, Smilevska T, et al. Over 20% of patients with chronic lymphocytic leukemia carry stereotyped receptors: Pathogenetic implications and clinical correlations. *Blood*. 2007;109(1):259-70.
54. Murray F, Darzentas N, Hadzidimitriou A, Tobin G, Boudjograh M, Scielzo C, et al. Stereotyped patterns of somatic hypermutation in subsets of patients with chronic lymphocytic leukemia: implications for the role of antigen selection in leukemogenesis. *Blood*. 2008;111(3):1524-33.
55. Bomben R, Dal Bo M, Capello D, Forconi F, Maffei R, Laurenti L, et al. Molecular and clinical features of chronic lymphocytic leukaemia with stereotyped B cell receptors: results from an Italian multicentre study. *Br J Haematol*. 2009;144(4):492-506.
56. Darzentas N, Hadzidimitriou A, Murray F, Hatzi K, Josefsson P, Laoutaris N, et al. A different ontogenesis for chronic lymphocytic leukemia cases carrying stereotyped antigen receptors: molecular and computational evidence. *Leukemia*. 2010;24(1):125-32.
57. Agathangelidis A, Darzentas N, Hadzidimitriou A, Brochet X, Murray F, Yan XJ, et al. Stereotyped B-cell receptors in one-third of chronic lymphocytic leukemia: a molecular classification with implications for targeted therapies. *Blood*. 2012;119(19):4467-75.
58. Xochelli A, Baliakas P, Kavakiotis I, Agathangelidis A, Sutton LA, Minga E, et al. Chronic Lymphocytic Leukemia with Mutated IGHV4-34 Receptors: Shared and Distinct Immunogenetic Features and Clinical Outcomes. *Clin Cancer Res*. 2017;23(17):5292-301.
59. Agathangelidis A, Chatzidimitriou A, Gemenetzi K, Giudicelli V, Karypidou M, Plevova K, et al. Higher-order connections between stereotyped subsets: implications for improved patient classification in CLL. *Blood*. 2021;137(10):1365-76.
60. Kirkham PM, Mortari F, Newton JA, Schroeder HW, Jr. Immunoglobulin VH clan and family identity predicts variable domain structure and may influence antigen binding. *EMBO J*. 1992;11(2):603-9.
61. Watson CT, Breden F. The immunoglobulin heavy chain locus: genetic variation, missing data, and implications for human disease. *Genes Immun*. 2012;13(5):363-73.
62. Marcatili P, Ghiotto F, Tenca C, Chailyan A, Mazzarello AN, Yan XJ, et al. Igs expressed by chronic lymphocytic leukemia B cells show limited binding-site structure variability. *J Immunol*. 2013;190(11):5771-8.
63. Minici C, Gounari M, Ubelhart R, Scarfo L, Duhren-von Minden M, Schneider D, et al. Distinct homotypic B-cell receptor interactions shape the outcome of chronic lymphocytic leukaemia. *Nat Commun*. 2017;8:15746.
64. Polychronidou E, Kalamaras I, Agathangelidis A, Sutton LA, Yan XJ, Bikos V, et al. Automated shape-based clustering of 3D immunoglobulin protein structures in chronic lymphocytic leukemia. *BMC Bioinformatics*. 2018;19(Suppl 14):414.
65. Maity PC, Bilal M, Koning MT, Young M, van Bergen CAM, Renna V, et al. IGLV3-21*01 is an inherited risk factor for CLL through the acquisition of a single-point mutation enabling autonomous BCR signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2020;117(8):4320-7.
66. Gemenetzi K, Psomopoulos F, Carriles AA, Gounari M, Minici C, Plevova K, et al. Higher-order immunoglobulin repertoire restrictions in CLL: the illustrative case of stereotyped subsets 2 and 169. *Blood*. 2021;137(14):1895-904.

67. Sutton LA, Young E, Baliakas P, Hadzidimitriou A, Moysiadis T, Plevova K, et al. Different spectra of recurrent gene mutations in subsets of chronic lymphocytic leukemia harboring stereotyped B-cell receptors. *Haematologica*. 2016;101(8):959-67.
68. Strefford JC, Sutton LA, Baliakas P, Agathangelidis A, Malcikova J, Plevova K, et al. Distinct patterns of novel gene mutations in poor-prognostic stereotyped subsets of chronic lymphocytic leukemia: the case of SF3B1 and subset #2. *Leukemia*. 2013;27(11):2196-9.
69. Rossi D, Spina V, Bomben R, Rasi S, Dal-Bo M, Bruscaggin A, et al. Association between molecular lesions and specific B-cell receptor subsets in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2013;121(24):4902-5.
70. Hadzidimitriou A, Agathangelidis A, Darzentas N, Murray F, Delfau-Larue MH, Pedersen LB, et al. Is there a role for antigen selection in mantle cell lymphoma? Immunogenetic support from a series of 807 cases. *Blood*. 2011;118(11):3088-95.
71. Bikos V, Darzentas N, Hadzidimitriou A, Davis Z, Hockley S, Traverse-Glehen A, et al. Over 30% of patients with splenic marginal zone lymphoma express the same immunoglobulin heavy variable gene: ontogenetic implications. *Leukemia*. 2012;26(7):1638-46.
72. Athanasiadou A, Stamatopoulos K, Gaitatzi M, Stavroyianni N, Fassas A, Anagnostopoulos A. Recurrent cytogenetic findings in subsets of patients with chronic lymphocytic leukemia expressing IgG-switched stereotyped immunoglobulins. *Haematologica*. 2008;93(3):473-4.
73. Marincevic M, Cahill N, Gunnarsson R, Isaksson A, Mansouri M, Goransson H, et al. High-density screening reveals a different spectrum of genomic aberrations in chronic lymphocytic leukemia patients with 'stereotyped' IGHV3-21 and IGHV4-34 B-cell receptors. *Haematologica*. 2010;95(9):1519-25.
74. Malek SN. The biology and clinical significance of acquired genomic copy number aberrations and recurrent gene mutations in chronic lymphocytic leukemia. *Oncogene*. 2013;32(23):2805-17.
75. Kanduri M, Marincevic M, Halldorsdottir AM, Mansouri L, Junevik K, Ntoufa S, et al. Distinct transcriptional control in major immunogenetic subsets of chronic lymphocytic leukemia exhibiting subset-biased global DNA methylation profiles. *Epigenetics*. 2012;7(12):1435-42.
76. Papakonstantinou N, Ntoufa S, Chartomatsidou E, Papadopoulos G, Hatzigeorgiou A, Anagnostopoulos A, et al. Differential microRNA profiles and their functional implications in different immunogenetic subsets of chronic lymphocytic leukemia. *Mol Med*. 2013;19(1):115-23.
77. Ntoufa S, Vardi A, Papakonstantinou N, Anagnostopoulos A, Aleporou-Marinou V, Belessi C, et al. Distinct innate immunity pathways to activation and tolerance in subgroups of chronic lymphocytic leukemia with distinct immunoglobulin receptors. *Mol Med*. 2012;18(1):1281-91.
78. Gounari M, Ntoufa S, Apollonio B, Papakonstantinou N, Ponzoni M, Chu CC, et al. Excessive antigen reactivity may underlie the clinical aggressiveness of chronic lymphocytic leukemia stereotyped subset #8. *Blood*. 2015;125(23):3580-7.
79. Ntoufa S, Papakonstantinou N, Apollonio B, Gounari M, Galigalidou C, Fonte E, et al. B Cell Anergy Modulated by TLR1/2 and the miR-17 approximately 92 Cluster Underlies the Indolent Clinical Course of Chronic Lymphocytic Leukemia Stereotyped Subset #4. *J Immunol*. 2016;196(10):4410-7.
80. Arvaniti E, Ntoufa S, Papakonstantinou N, Touloumenidou T, Laoutaris N, Anagnostopoulos A, et al. Toll-like receptor signaling pathway in chronic lymphocytic leukemia: distinct gene expression profiles of potential pathogenic significance in specific subsets of patients. *Haematologica*. 2011;96(11):1644-52.
81. Lionetti M, Fabris S, Cutrona G, Agnelli L, Ciardullo C, Matis S, et al. High-throughput sequencing for the identification of NOTCH1 mutations in early stage chronic lymphocytic leukaemia: biological and clinical implications. *Br J Haematol*. 2014;165(5):629-39.
82. Del Giudice I, Chiaretti S, Santangelo S, Tavolaro S, Peragine N, Marinelli M, et al. Stereotyped subset #1 chronic lymphocytic leukemia: a direct link between B-cell receptor structure, function, and patients' prognosis. *Am J Hematol*. 2014;89(1):74-82.
83. Mansouri L, Sutton LA, Ljungstrom V, Bondza S, Arngarden L, Bhoi S, et al. Functional loss of IkappaBepsilon leads to NF-kappaB deregulation in aggressive chronic lymphocytic leukemia. *J Exp Med*. 2015;212(6):833-43.
84. Baliakas P, Agathangelidis A, Hadzidimitriou A, Sutton LA, Minga E, Tsanousa A, et al. Not all IGHV3-21 chronic lymphocytic leukemias are equal: prognostic considerations. *Blood*. 2015;125(5):856-9.
85. Baliakas P, Hadzidimitriou A, Sutton LA, Minga E, Agathangelidis A, Nichelatti M, et al. Clinical effect of stereotyped B-cell receptor immunoglobulins in chronic lymphocytic leukaemia: a retrospective multicentre study. *Lancet Haematol*. 2014;1(2):e74-84.
86. Jaramillo S, Agathangelidis A, Schneider C, Bahlo J, Robrecht S, Tausch E, et al. Prognostic impact of prevalent chronic lymphocytic leukemia stereotyped subsets: analysis within prospective clinical trials of the German CLL Study Group (GCLLSG). *Haematologica*. 2020;105(11):2598-607.

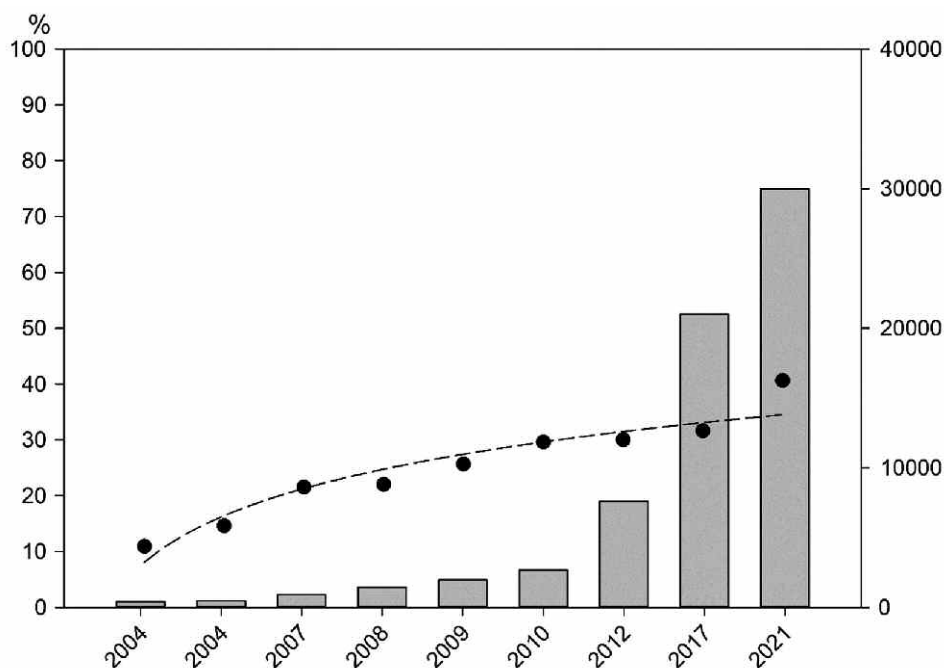
87. Hadzidimitriou A, Darzentas N, Murray F, Smilevska T, Arvaniti E, Tresoldi C, et al. Evidence for the significant role of immunoglobulin light chains in antigen recognition and selection in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2009;113(2):403-11.
88. Belessi CJ, Davi FB, Stamatopoulos KE, Degano M, Andreou TM, Moreno C, et al. IGHV gene insertions and deletions in chronic lymphocytic leukemia: "CLL-biased" deletions in a subset of cases with stereotyped receptors. *Eur J Immunol*. 2006;36(7):1963-74.
89. Malcikova J, Stalika E, Davis Z, Plevova K, Trbusek M, Mansouri L, et al. The frequency of TP53 gene defects differs between chronic lymphocytic leukaemia subgroups harbouring distinct antigen receptors. *Br J Haematol*. 2014;166(4):621-5.
90. Rossi D, Bruscaggin A, Spina V, Rasi S, Khiabani H, Messina M, et al. Mutations of the SF3B1 splicing factor in chronic lymphocytic leukemia: association with progression and fludarabine-refractoriness. *Blood*. 2011;118(26):6904-8.
91. Putowski M, Giannopoulos K. Perspectives on Precision Medicine in Chronic Lymphocytic Leukemia: Targeting Recurrent Mutations-NOTCH1, SF3B1, MYD88, BIRC3. *J Clin Med*. 2021;10(16).
92. Vardi A, Agathangelidis A, Sutton LA, Chatzouli M, Scarfo L, Mansouri L, et al. IgG-switched CLL has a distinct immunogenetic signature from the common MD variant: ontogenetic implications. *Clin Cancer Res*. 2014;20(2):323-30.
93. Jang YJ, Stollar BD. Anti-DNA antibodies: aspects of structure and pathogenicity. *Cell Mol Life Sci*. 2003;60(2):309-20.
94. Sutton LA, Kostareli E, Hadzidimitriou A, Darzentas N, Tsaftaris A, Anagnostopoulos A, et al. Extensive intraclonal diversification in a subgroup of chronic lymphocytic leukemia patients with stereotyped IGHV4-34 receptors: implications for ongoing interactions with antigen. *Blood*. 2009;114(20):4460-8.
95. Kostareli E, Sutton LA, Hadzidimitriou A, Darzentas N, Kouvatsi A, Tsaftaris A, et al. Intraclonal diversification of immunoglobulin light chains in a subset of chronic lymphocytic leukemia alludes to antigen-driven clonal evolution. *Leukemia*. 2010;24(7):1317-24.
96. Sutton LA, Kostareli E, Stalika E, Tsaftaris A, Anagnostopoulos A, Darzentas N, et al. Temporal dynamics of clonal evolution in chronic lymphocytic leukemia with stereotyped IGHV4-34/IGKV2-30 antigen receptors: longitudinal immunogenetic evidence. *Mol Med*. 2013;19(1):230-6.
97. Sutton LA, Papadopoulos G, Hadzidimitriou A, Papadopoulos S, Kostareli E, Rosenquist R, et al. An entity evolving into a community: defining the common ancestor and evolutionary trajectory of chronic lymphocytic leukemia stereotyped subset #4. *Mol Med*. 2015;20(1):720-8.
98. Muzio M, Apollonio B, Scielzo C, Frenquelli M, Vandoni I, Boussiotis V, et al. Constitutive activation of distinct BCR-signaling pathways in a subset of CLL patients: a molecular signature of anergy. *Blood*. 2008;112(1):188-95.
99. Rossi D, Spina V, Cerri M, Rasi S, Deambrogi C, De Paoli L, et al. Stereotyped B-cell receptor is an independent risk factor of chronic lymphocytic leukemia transformation to Richter syndrome. *Clin Cancer Res*. 2009;15(13):4415-22.
100. Thorselius M, Krober A, Murray F, Thunberg U, Tobin G, Buhler A, et al. Strikingly homologous immunoglobulin gene rearrangements and poor outcome in VH3-21-using chronic lymphocytic leukemia patients independent of geographic origin and mutational status. *Blood*. 2006;107(7):2889-94.
101. Ghia EM, Jain S, Widhopf GF, 2nd, Rassenti LZ, Keating MJ, Wierda WG, et al. Use of IGHV3-21 in chronic lymphocytic leukemia is associated with high-risk disease and reflects antigen-driven, post-germinal center leukemogenic selection. *Blood*. 2008;111(10):5101-8.
102. Baliakas P, Moysiadis T, Hadzidimitriou A, Xochelli A, Jeromin S, Agathangelidis A, et al. Tailored approaches grounded on immunogenetic features for refined prognostication in chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica*. 2019;104(2):360-9.
103. Rovida A, Maccalli C, Scarfo L, Dellabona P, Stamatopoulos K, Ghia P. Exploiting B-cell Receptor Stereotypy to Design Tailored Immunotherapy in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Clin Cancer Res*. 2021;27(3):729-39.
104. Seiffert M. Antibody Peptides as Cancer Vaccine-Turning Weapons to Targets. *Clin Cancer Res*. 2021;27(3):659-61.



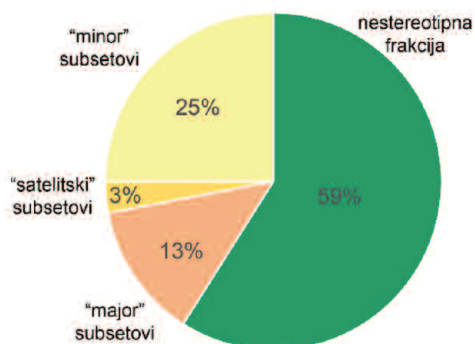
Slika 1. Shematski prikaz imunoglobulinskog molekula. (a) IG molekul se sastoji od dva identična teška (H) lanca i dva identična laka (L) lanca. H i L lanci sadrže varijabilni region (VH i VL, respektivno) i konstantni region (CH i CL, respektivno). VH region je kodiran rearanžiranim *IGHV*, *IGHD* i *IGHJ* genima, a VL region rearanžiranim *IGK(L)V* i *IGK(L)J* genima. **(b)** VH region sadrži 4 FR regiona (VH FR1-4) i 3 hipervarijabilna CDR regiona (VH CDR1-3). VH FR1-3, VH CDR1 i VH CDR2 su u potpunosti kodirani *IGHV* genom, a VH FR4 *IGHJ* genom. VH CDR3 je pozicioniran na mestu spajanja *IGHV*, *IGHD* i *IGHJ* gena („*IGHV-IGHD-IGHJ* junction“), i obuhvata amino-kiseline koje se nalaze između konzervisanog cisteina (kodon 104) u VH FR3 i konzervisanog triptofana (kodon 118) u VH FR4 [23]. N1 i N2 regioni se formiraju nasumičnom adicijom i delecijom nukleotida tokom *IGHV-IGHD* i *IGHD-IGHJ* rekombinacije. (Preuzeto iz [38])



Slika 2. Shematski prikaz humanog *IGH* lokusa. Humani *IGH* lokus sadrži 38-46 funkcionalnih *IGHV* gena, 23 funkcionalna *IGHD* gena, 6 funkcionalnih *IGHJ* gena i 9 funkcionalnih *IGHC* gena. Nomenklatura *IGHV* gena: prvi broj u nazivu gena označava pripadnost određenoj *IGHV* porodici, sledi povlaka a zatim broj koji označava poziciju datog gena u lokusu, u 3'-5' smeru. *IGHD* i *IGHJ* geni se numerišu u suprotnom smeru (5'-3') [25]. Prikazani su samo funkcionalni geni; rastojanja između gena nisu u razmeri. (Preuzeto iz [38])



Slika 3. Frekvencija BCR stereotipije. U studijama sprovedenim u periodu od 2004. do 2021. godine detektovan je porast relativne frekvencije BCR stereotipije sa povećanjem analiziranih HLL kohorti. Frekvencija je dostigla plato od oko 30% pri kritičnoj veličini kohorte od oko 2500 pacijenata [48, 50, 53-59]. Leva ordinata – relativna frekvencija stereotipne frakcije u datoj studiji; desna ordinata - broj HLL pacijenata analiziranih u datoj studiji.



Slika 4. Arhitektura BCR stereotipije u HLL. Oko 41% HLL pacijenata eksprimira stereotipne BCR IG, dok preostalih 59% (heterogeni BCR IG) ne može biti klasifikovano ni u jedan stereotipni subset. Stereotipna frakcija HLL se sastoji od 29 „major“ subsetova, koji obuhvataju oko 13% HLL, i velikog broja „minor“ subsetova (28% HLL). U „minor“ subsetove spada 156 „satelitskih subsetova“ (3% HLL) koji imaju veliku imunogenetičku sličnost sa 21 od 29 „major“ subsetova. Prikazani su rezultati studije Agatangelidisa i saradnika koja je obuhvatila 29856 HLL pacijenata [59].

subset	IGHV	IGHD	IGHJ	dužina VH CDR3*	VH CDR3 amino-kiselinska sekvenca**	IGKV/IGLV	IGHV SHM status	genomika	klinički tok
#1	IGHV1/5/7 (Klan I)	najčešće IGHD6-19	IGHJ4	13	ARxQWLxxxxFDY	IGKV1(D)-39	uglavnom N-HLL	del11q, NOTCH1 mut NFKBIE mut	agresivan
#2	IGHV3-21	bez IGHD različiti IGHD	IGHJ6	9	Ax[DE]xxxMDV	IGLV3-21	uglavnom M-HLL	del11q, del13q SF3B1 mut	agresivan varijacije unutar subeta
#4	IGHV4-34	najčešće IGHD5-18	IGHJ6	20	[AV]RGxxxxxxx[RK]RYYYYGMDV	IGKV2-30	M-HLL	del13q	indolentan
#8	IGHV4-39	IGHD6-13	IGHJ5	19	A[RST]xxxYSSSWYxxxNWFDP	IGKV1(D)-39	U-HLL	trizomija 12 NOTCH1 mut	agresivan Rihterova transformacija

Tabela 1. (Imuno)genetičke i kliničke karakteristike najvećih „major“ stereotipnih subsetova u HLL. * broj amino-kiselina u VH CDR3; ** x predstavlja bilo koju amino-kiselinu na datoj poziciji; uglaste zagrade predstavljaju jednu amino-kiselinsku poziciju, i bilo koja od amino-kiselina u zagradi može da se nađe na toj poziciji.

Sadašnjost i budućnost primene sekvenciranja nove generacije za retke bolesti

Maja Stojiljković i Jovana Komazec

Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Univerzitet u Beogradu

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

Apstrakt

Svaka bolest čija je učestalost manja od 1 u 2000 ljudi definiše se kao retka bolest. Iz tog razloga, broj retkih bolesti je veliki. Do sada je opisano preko 6000 različitih retkih bolesti. Preko 80% retkih bolesti ima genetičku osnovu i to je razlog zašto su znanja iz molekularne biologije od neprocenjivog značaja za istraživanje molekularne osnove retkih bolesti, postavljanje tačne dijagnoze i razvoj inovativnih terapija. Cilj ovog rada je da objasni važnost otkrivanja molekularno-genetičke osnove retkih bolesti i da prikaže desetogodišnje iskustvo primene sekvenciranja nove generacije u Srbiji (2014.-2023.) u tu svrhu. U prethodnom periodu za istraživanje retkih bolesti korišćeni su sekvenciranje kliničkog egzoma, sekvenciranje kompletnog egzoma i sekvenciranje kompletnog genoma. Takođe, date su i perspektive za budućnost gde će genomika biti kompletirana tehnologijom sekvenciranja dugačkih fragmenata i komplementirana upotrebom transkriptomike, proteomike, metabolomike i drugih „omika“.

Ključne reči: retke bolesti, sekvenciranje nove generacije, sekvenciranje kliničkog egzoma, sekvenciranje kompletnog egzoma, sekvenciranje kompletnog genoma, genetičke varijante

Present and future of next-generation sequencing application for rare diseases

Maja Stojiljković and Jovana Komazec

Institute of Molecular Genetics and Genetic Engineering, University of Belgrade

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

Abstract

Any disease found in less than 1 person out of 2000 people is defined as a rare disease. For this reason, the number of rare diseases is high. Over 6,000 different rare diseases have been described so far. More than 80% of rare diseases have a genetic basis, and this is the reason why knowledge of molecular biology is invaluable for research into the molecular basis of rare diseases, establishing an accurate diagnosis and developing innovative therapeutics. The aim of this paper is to explain the importance of discovering the molecular genetic basis of rare diseases and to present the ten-year experience of applying new generation sequencing in Serbia (2014-2023) for this purpose. During this period, clinical exome sequencing, complete exome sequencing and complete genome sequencing were used for research of rare diseases. In the future, it is expected that genomics, which until now was based mainly on the technology of short-read fragments, will be broaden with the long-reads sequencing technology, and complemented by the use of transcriptomics, proteomics, metabolomics and other omics.

Keywords: rare diseases, next generation sequencing, clinical exome sequencing, whole exome sequencing, whole genome sequencing, genetic variants

Retke bolesti i važnost postavljanja dijagnoze

Svaka bolest čija je učestalost manja od 1 u 2000 ljudi definiše se kao retka bolest. Iz tog razloga, broj retkih bolesti je veliki. Do sada je opisano preko 6000 različitih retkih bolesti i taj broj se iz godine u godinu povećava [1]. Povećanje broja opisanih retkih bolesti ne znači da je došlo do nastanka novih retkih bolesti, već da su nova znanja iz medicine, kao i razvoj preciznijih dijagnostičkih metoda omogućili bolju stratifikaciju već opisanih bolesti kao i dijagnostiku onih bolesti za koje prethodno nije bilo moguće uspostaviti dijagnozu.

Velika većina tih međusobno različitih bolesti, koje se samo na osnovu svoje učestalosti svrstavaju u retke, ipak imaju nešto zajedničko. Smatra se da oko 80% retkih bolesti ima monogensku genetičku osnovu. To je upravo i razlog zašto su znanja iz molekularne genetike od neprocenjivog značaja za istraživanje molekularne osnove retkih bolesti, postavljanje tačne dijagnoze i identifikaciju novih meta koje će poslužiti kao osnov za razvoj inovativnih terapeutika.

Pojedinačne retke bolesti su retke, ali su oboleli od retkih bolesti brojni. Broj obolelih od retkih bolesti u Evropi se procenjuje na 30 miliona, a u celom svetu na 330 miliona [2]. Procenjuje se da 6-8% populacije u toku života razvije neku retku bolest. Na osnovu takvih procena, smatra se da bi u Srbiji moglo biti registrovano izeđu 300 000 i 500 000 osoba sa nekom retkom bolešću (Slika 1).

Međutim, previše često se dešava da se do dijagnoze retke bolesti dolazi nakon dugog niza godina, mnogobrojnih poseta lekarima i brojnih dijagnostičkih pregleda. Ovaj proces koji se naziva i „dijagnostička odiseja“ zavisi od specifičnosti fenotipa i uzrasta pacijenta, kao i dostupnosti dijagnostičkih metoda i eksperata. Zato je glavni cilj Internacionalnog konzorcijuma za istraživanje retkih bolesti (eng. *International Rare Diseases Research Consortium*, IRDiRC) da se svim ljudima koji žive sa nekom retkom bolešću omogući tačna dijagnoza, nega i postojeća terapija pre nego što se navrší godinu dana od kako su prvi put posetili lekara [3]. Ujedinjene Nacije su u decembru 2021. godine usvojile rezoluciju u kojoj prepoznaju značaj problema osoba obolelih od retkih bolesti uz poruku da „niko ne sme biti zaboravljen“ [4]. U decembru 2022. godine završen je prvi nacionalni Program za retke bolesti koji je kao prioritet stavio poboljšanje dijagnostike i lečenja za sve osobe sa naslednim retkim bolestima (*Sl. glasnik RS*, broj 30/18) [5]. Prema podacima iz ovog Programa, u Srbiji svega 10.3% osoba sa retkom bolešću dobije tačnu dijagnozu u toku prve godine od pojave prvih simptoma, 19.6% u toku prve 3 godine, dok čak 70.1% osoba na dijagnozu čeka duže od 3 godine ili je nikada ne dobije. Prema tim podacima, prosečno vreme do postavljanja dijagnoze retke bolesti u Srbiji iznosi 7 godina. Ovo vreme je duže od vremena koje je za postavljanje dijagnoze retke bolesti potrebno u zemljama Evropske Unije, a koje prema podacima Eurordis-a (eng. *EURORDIS-Rare Diseases Europe*, EURORDIS) iznosi 4.1 godinu [6].

Najtačnija dijagnoza genetičkih retkih bolesti se postavlja genetičkim testiranjem. Međutim, dugi niz godina je primena genetičkog testiranja u dijagnostičke svrhe bila sputana malim kapacitetom Sangerovog DNK sekvenciranja, kao i visokim troškovima ove metode. Testiranje je u praksi rađeno za one monogenske bolesti za koje se na osnovu kliničkih manifestacija i/ili biohemijskih i drugih testova mogao odabrati ciljani genetički test, ciljana analiza jednog gena ili najčešćih genetičkih varijanti primenom Sangerovog DNK sekvenciranja i metoda baziranih na PCR-u.

Primer bolesti za koju je na osnovu biohemijskog testiranja sa velikom verovatnoćom moguće odrediti gen-uzročnik je fenilketonurija [7]. Za fenilketonuriju je u većini razvijenih zemalja, počevši od 60-tih godina prošlog veka, uspostavljen novorođenački skrining koji se bazira na biohemijskom određivanju nivoa fenilalanina u krvi novorođenčeta, a u Srbiji se ovaj skrining sprovodi od 1983. godine [8–10]. Kod 98% beba

kod kojih se na novorođenačkom biohemijском skriningu utvrdi hiperfenilalaninemija, genetičkim testiranjem će biti pronađene patogene genetičke varijante u genu za fenilalanin hidroksilazu. Međutim, u 2% slučajeva ispitanici bi ostajali bez dijagnoze, jer sem defekta enzima fenilalanin hidroksilaze, do hiperfenilalaninemije dovode i defekti u enzimima odgovornim za biosintezu (GTP ciklohidrolaza I i 6-piruvil-tetrahidropterin sintaza) i regeneraciju (pterin-4a-karbinolamin dehidrogenaza 1 i dihidropteridin reduktaza) tetrahidrobiopterina, kofaktora fenilalanin hidroksilaze [11]. U takvim slučajevima bilo bi neophodno raditi dodatne biohemijske testove (ukoliko su oni uopšte dostupni u određenoj zemlji) ili sprovoditi genetičko testiranje dodatnih gena (*GCH1*, *QDPR*, *PCBD1* i *PTS*), sve dok se ne detektuju uzročne genetičke varijante. Ovo je primer da čak i u slučajevima u kojima je proces testiranja jasan i jednoznačan, mali broj pacijenata bi ipak prolazio kroz dijagnostičku odiseju. Mnogo veći problem i duže traganje za tačnom dijagnozom prati one bolesti za koje ne postoje specifični biohemijski ili drugi testovi koji bi opredelili ciljano genetičko testiranje, zatim bolesti koje imaju heterogenu genetičku osnovu, bolesti kod kojih postoji fenotipsko preklapanje, kao i bolesti kod kojih se prvo javljaju nespecifični simptomi na osnovu kojih se ne može odabrati odgovarajući genetički test.

Sem toga, iako je za monogenske bolesti karakteristično da varijante u jednom određenom genu dovode do određene bolesti, situacija je u nekim slučajevima kompleksnija. Na primer, u slučaju propionske acidemije koja je uzrokovana deficijencijom dimernog enzima propionil-CoA karboksilaze, uzrok bolesti treba tražiti u jednom od dva gena (*PCCA* i *PCCB*) sa kojih se sintetišu 2 enzimске subjedinice [12]. Situacija u kojoj su dva ili više gena odgovorni za određeni fenotip označava se kao genetička heterogenost. Nasuprot tome, čak u preko 30% bolesti koje su registrovane na OMIM-u (eng. *Online Mendelian Inheritance in Man*, OMIM), različite genetičke varijante koje se nalaze u različitim regionima istog gena mogu biti povezane sa različitim bolestima/stanjima i to prateći različite tipove nasleđivanja [13]. Primer za to su varijante u *LMNA* genu koje su povezane sa 11 fenotipova sa preklapajućim karakteristikama (fenotipska heterogenost) [14].

Sekvenciranje nove generacije

Masovno paralelno sekvenciranje ili takozvano sekvenciranje nove generacije (eng. *Next generation sequencing*, NGS) je u potpunosti transformisalo dijagnostiku retkih bolesti. Zahvaljujući velikom kapacitetu ove metode, kao i smanjenju troškova, moguće je istovremeno sekvenciranje velikog broja gena i time skraćivanje vremena do postavljanja tačne dijagnoze. U zavisnosti od potreba, koriste se različiti genski paneli, kao i sekvenciranje kompletnog egzoma (eng. *Whole exome sequencing*, WES) ili sekvenciranje celog genoma (eng. *Whole genome sequencing*, WGS). Jedan od najčešće korišćenih, komercijalno dostupnih panela je onaj koji uključuje 4813 klinički relevantnih gena, poznat pod nazivom „klinički egzom“ (*TruSight One Gene Panel*, *Illumina*). Dok se primenom sekvenciranja kliničkog egzoma identifikuje oko 10 000 genetičkih varijanti koje su različite u odnosu na humani referentni genom, sekvenciranjem kompletnog egzoma se identifikuje oko 500 000, a sekvenciranjem kompletnog genoma preko 3,2 miliona genetičkih varijanti. Zbog kompleksnosti interpretacije velikog broja varijanti, sekvenciranje kliničkog egzoma i kompletnog egzoma su i dalje opcije koje se koriste u rutinskoj dijagnostici, dok je sekvenciranje kompletnog genoma rezervirano za slučajeve koji metodama manjeg opsega nisu bili uspešno rešeni.

S obzirom na to da je genomika veoma dinamično polje u kome se neprekidno poboljšavaju bioinformatički algoritmi, a baze podataka pune novim podacima, veoma je važno vršiti periodičnu re-analizu podataka dobijenih masivnim paralelnim sekvenciranjem, pogotovu u slučaju pojave novih specifičnih simptoma kod obolele osobe [15].

Desetogodišnje iskustvo primene sekvenciranja nove generacije u Srbiji (2014.-2023.)

U Srbiji je sekvenciranje nove generacije u svrhu istraživanja i otkrivanja molekularno-genetičke osnove kod pacijenata obolelih od retkih bolesti otpočelo 2014. godine, i to primenom panela za klinički egzom. Sekvenciranje kliničkog egzoma izvršeno je kod preko 1500 bolesnika kod kojih je postojala sumnja da bolest ima genetičku osnovu. Sekvence kodirajućih egzona i egzon-intron granica 4813 klinički relevantnih gena su dobijene korišćenjem *TruSight One* panela i upoređene sa sekvencom referentnog humanog genoma (hg19) kao što je prethodno opisano [16–19]. Ova analiza isključuje detekciju varijanti u promotorskim i intronskim regionima, detekciju velikih delecija i duplikacija tj. detekciju varijacija u broju ponovaka (eng. *Copy number variation*, CNV), kao i detekciju ekspanzije kratkih i dugačkih tandemskih ponovaka. Bioinformatički fajlovi (FASTQ, BAM i VCF) se generišu na samoj mašini (MiSeq, NextSeq 550, NextSeq 2000, Illumina). Prilikom interpretacije bioinformatičkih fajlova, koristi se softver za anotaciju i prioritizaciju detektovanih varijanti (npr. Variant Interpreter, Illumina). S obzirom na to da se traži uzrok retke bolesti, tokom analize se odbacuju genetičke varijante koje su u bazama podataka zdravih punoletnih ispitanika (GnomAD i 1000 Genomes, itd) prisutne sa učestalošću većom od 1%. Preostale retke varijante se dalje analiziraju uzimajući u obzir njihov efekat na protein, kao i odgovarajući model nasleđivanja za svaki gen. Genetičke varijante od interesa se na osnovu *in silico*, *in vitro* i *in vivo* dokaza klasifikuju prema pravilima Američkog koledža za medicinsku genetiku i genomiku i Udruženja za molekularnu patologiju (eng. *American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology*, ACMG) kao patogene, verovatno patogene, varijante neodređenog značaja, verovatno benigne i benigne varijante [20]. Varijante neodređenog značaja (eng. *Variants of uncertain significance*, VUS) za koje ne postoji dovoljno dokaza da budu klasifikovane kao patogene / verovatno patogene ili benigne / verovatno benigne se dalje klasifikuju prema verovatnoći da u budućnosti budu klasifikovane kao patogene [21]. Praksa koja je trenutno ustaljena je da se patogene, verovatno patogene, i varijante neodređenog značaja koje imaju verovatnoću >50% da u budućnosti budu okarakterisane kao patogene mogu smatrati varijantama uzročnicima bolesti, dok se VUS varijante sa <50% kao i verovatno benigne i benigne varijante ne mogu smatrati uzročnicima bolesti.

Osim naučne literature, osnovni resursi koji olakšavaju povezivanje gena sa kliničkim manifestacijama bolesti su OMIM i ORPHANET [1,13]. U ovim otvorenim bazama nalaze se podaci o načinu nasleđivanja, kao i pregled detalja kliničkih manifestacija za svaku bolest. Dodatni značaj ORPHANET-a je što je razvio nomenklaturu i enciklopediju koja uključuje sve opisane retke bolesti i koja je u tom aspektu bogatija i detaljnija od trenutno važeće Međunarodne Klasifikacije Bolesti, MKB-11 (eng. *International classification of diseases 11th Revision*, ICD-11) [22]. Sem ova dva resursa, Ontologija ljudskog fenotipa (eng. *Human Phenotype Ontology*, HPO) je koristan resurs za sistematizaciju i univerzalno korišćenje termina koji se odnose na opis fenotipskih karakteristika [23].

Dok je tačna sekvenca referentnog humanog genoma neophodna za identifikaciju i pravilnu anotaciju svih varijanti u analiziranom uzorku, baze podataka koje sadrže podatke o učestalosti varijanti kod zdravih osoba (1000 Genome Project, GnomAD exome, GnomAD genome) su ključne kako bi se izdvojile retke varijante, one varijante čija je učestalost manja od 1% u zdravoj populaciji [24,25].

Ogroman značaj za pravilnu funkcionalnu interpretaciju retkih varijanti imaju baze podataka koje sakupljaju informacije o fenotipskom efektu varijanti (ClinVar, LOVD i druge) [26,27]. Ove baze su dragoceni otvoreni resursi, jer omogućavaju da se dokazi o identifikaciji iste varijante kod obolelih osoba, ma gde na svetu da se nalaze, prikupljaju na jednom centralnom mestu. Još jedna značajna ali komercijalna baza podataka je „*Human Gene Mutation Database*” (HGMD) koja sadrži informacije o publikacijama u kojima je ge-

netička varijanta opisana, bilo da se radi o kohortama pacijenata, pojedinačnim prikazima slučaja ili funkcionalnim *in vitro* studijama [28]. Sličnu ulogu ima i Mastermind pretraživač koji je osmišljen da olakša pretraživanje literature koja sadrži genetičke podatke [29].

Postoji veliki broj *in silico* kompjuterskih programa koji olakšavaju predikciju efekta tačkastih varijanti koje dovode do aminokiselinske zamene, kao i varijanti koje dovode do nepravilnog iskrajanja introna (CADD, GERP, Mutation Assessor, MutPred2, PolyPhen-2, REVEL, SIFT, i druge) [30–36]. Sem toga, korisni su i alati u kojima se procenjuje konzerviranost aminokiselinske sekvence poređenjem različitih vrsta kičmenjaka (npr. Clustal Omega) [37]. Takođe, trodimenzionalni modeli proteina koji nose aminokiselinsku zamenu ili malu deleciju/inserciju mogu se napraviti korišćenjem AlphaFold algoritma, Phyre2 web portala ili Swiss-Pdb Viewer-a [38–40]. Ovi alati zahtevaju da se šifra za određeni protein nađe u proteinskim bazama podataka kako bi se teorijski proteinski model (po mogućstvu humani) upotrebio za dalje modeliranje i predikciju efekta varijante. Na ovaj način moguće je vizuelizovati promenu u strukturi polipeptidnog lanca (uspostavljanje ili ukidanje vodoničnih veza, posttranslacionih modifikacija, itd.) [12,41].

Izuzetno važan i koristan dokaz kojim se utvrđuje efekat genetičke varijante na protein dobija se iz različitih *in vitro* esaja u kojima se određuju stabilnost proteina, sklonost ka degradaciji, rezidualna enzimska aktivnost kao i potencijal da se na defekt utiče upotrebom farmakoloških šaperona [12,42,43].

Uzevši sve u obzir, može se zaključiti da su važni faktori koji utiču na postizanje visokog stepena detekcije varijanti pažljiva interpretacija svake varijante u kontekstu kliničkog fenotipa pacijenta i uzimanje u obzir svih dostupnih podataka iz literatura kako bi i geni koji su nedavno povezani sa određenim fenotipom bili uzeti u obzir. Sem toga, pokazano je da se istovremenom analizom deteta i oba roditelja (trijada) i do deset puta smanjuje broj genetičkih varijanti koje treba interpretirati [44] i duplira dijagnostička efikasnost u odnosu na situaciju u kojoj se genetička analiza radi samo za dete [45]. Ukoliko ne postoji mogućnost istovremene analize deteta i oba roditelja, naknadna segregaciona analiza kojom se utvrđuje da li je varijanta kod deteta nastala *de novo*, ili da li se dve varijante identifikovane kod deteta nalaze na različitim hromozomima, takođe ima veliki značaj za finalnu potvrdu dijagnoze.

Od 2022, u Srbiji je otpočela i primena sekvenciranja kompletnog egzoma i kompletnog genoma u svrhu genotipizacije pacijenata obolelih od retkih bolesti. Vremenom, kako cena kompletnog egzoma bude opadala, a bioinformatički alati za analizu budu dostupniji, očekivano je da će analiza kliničkog egzoma u potpunosti biti zamenjena analizom kompletnog egzoma i kompletnog genoma.

Perspektive za budućnost

Sekvenciranje nove generacije je tehnologija koja napreduje izuzetno brzo. Na tržištu su dostupne platforme koje funkcionišu po različitim principima (*Illumina*, *BGI Genomics*, *Oxford Nanopore Technologies*, *Pacific Biosciences*) [46–49], konstantno se uvode novi instrumenti sa povećanim kapacitetom i kvalitetom, kao i hemija koja će imati bolje performanse i biti pogodnija za transport i rad u raznovrsnim uslovima. Sve ove promene dovode do potrebe laboratorija da se konstantno prilagođavaju novim uslovima kako bi zadržale visok kvalitet analize i obezbedile visoku senzitivnost i specifičnost dobijenih rezultata. Preduslov za visoku senzitivnost (minimalizovanje lažno negativnih rezultata) je potpuna i uniformna pokrivenost svih regiona koji se sekvenciraju, bilo da se radi o panelu gena, egzomu ili genomu. Potrebno je da svaki nukleotid bude sekvenciran, i to najmanje 20 puta. Problem su visoko repetitivni, kao i GC bogati regioni koji su tradicionalno komplikovani za sekvenciranje. Visoka specifičnost (minimalizovanje lažno pozitivnih rezultata) zavisi od preciznosti procesa amplifikacije DNK i veća je kada se ne koristi PCR amplifikacija. Specifični pro-

blemi prate i identifikaciju insercija i delecija, identifikaciju tačkastih varijanti u regionima bogatim ponovcima ili u regionima koji imaju nisku pokrivenost [50]. Takođe, tačna identifikacija varijanti u genima za koje postoje visoko homologni pseudogeni takođe predstavlja izazov za bioinformatičku analizu.

Sekvenciranje kompletnog egzoma je superiornija analiza u odnosu na klinički egzom jer podrazumeva analizu svih, a ne samo klinički relevantnih gena. Sem toga, velika prednost kompletnog egzoma u odnosu na klinički egzom je mogućnost detekcije CNV [51,52]. Analiza CNV se pre svega preporučuje u slučaju ne-urorazvojnih oboljenja i/ili multiplih kongenitalnih anomalija, kao i za fetuse sa strukturnim anomalijama pri mećenim u toku ultrazvučnih pregleda [53]. Većina CNV su retke i jedinstvene što komplikuje razumevanje njihovog efekta na razvoj bolesti. Nedavno su date preporuke koje imaju za cilj da omoguće konzistentnu i pravilnu interpretaciju CNV [53].

Ograničenja koja su inherentna sekvenciranju kompletnog egzoma, ne-uniformna pokrivenost svih egzona, GC bogatih regiona, posledica su specifičnosti proba koje se koriste za izdvajanje protein-kodirajućih regiona [54]. Sekvenciranje kompletnog genoma nema ova ograničenja, pa se postiže uniformna pokrivenost svih euhromatskih regiona što otvara velike mogućnosti. Zahvaljujući tome što se vrši analiza i nekodirajućih regiona, moguće je identifikovati duboke intronske varijante, varijante u promotorima i drugim regulatornim elementima gena koje mogu biti uzročnici ili modifikatori bolesti. Sem toga, uniforma pokrivenost omogućava identifikaciju varijanti u kodirajućim regionima koji nisu adekvatno pokriveni egzomskom analizom, ali i strukturnih varijanti (delecije, duplikacije, insercije, inverzije, translokacije i drugi kompleksni rearanžmani veličine preko 50bp) [55], i kratkih tandemskih ponovaka (eng. *Short tandem repeats*, STR) dugih 1-6 bp i ponovljenih veći broj puta [56]. Ekspanzija kratkih tandemskih ponovaka je uzrok nekih retkih bolesti (Fragilni X sindrom, Fridrihova ataksija, Hantingtonova bolest, amiotofična lateralna skleroza, itd.), pa mogućnost da se ekspanzije kratkih tandemskih ponovaka detektuju NGS metodama omogućava da ne moraju da se rade dodatne komplementarne metode kao što je mikroerej [57]. Upravo zbog mogućnosti da se različiti tipovi varijanti (tačkaste varijante, male insercije/delecije, velike insercije/delecije, ekspanzije ponovaka i strukturne varijante) koje se nalaze u različitim regionima (protein-kodirajućim i nekodirajućim) detektuju jednim jedinstvenim genetičkim testom, sekvenciranje kompletnog genoma je omogućilo postavljanje dijagnoze kod pacijenata kod kojih je sekvenciranje kompletnog egzoma bilo neuspešno [58]. Međutim, zbog i dalje visokih troškova sekvenciranja kompletnog genoma, količine podataka koju treba analizirati (preko 3,2 miliona varijanti), količine podataka koju treba skladištiti, kao i nedovoljne razvijenosti bioinformatičkih alata za prioritizaciju velikog broja varijanti, sekvenciranje kompletnog genoma u ovom momentu nije spremno da postane rutinska dijagnostička metoda. Jedan od konkretnih problema za širu primenu sekvenciranja kompletnog genoma je interpretacija efekta varijanti u nekodirajućim regionima, kao i velikih kompleksnih varijanti [59], drugim rečima mogućnost da se proceni efekat detektovanih varijanti na nastajanje određenog fenotipa.

Iako je veoma moćna metoda, sekvenciranjem kompletnog genoma koje se bazira na sekvenciranju kratkih fragmenata DNK (eng. *Short-read sequencing*), nije moguće identifikovati velike kompleksne strukturne varijante i ekspanzije dugih tandemskih ponovaka (eng. *Long tandem repeats*, LTR) [60]. Ovo ograničenje je posledica toga što se prilikom bioinformatičke obrade, fragmenti dužine 100-300bp moraju svrstati na određeno mesto u genomu pa velike strukturne varijante i ekspanzije dugih ponovaka ne mogu biti prepoznate. Varijante ovog tipa mogu se detektovati jedino sekvenciranjem koje je bazirano na sekvenciranju dugačkih fragmenata (eng. *Long-read sequencing*) kod kojih je svrstavanje fragmenata na određeno mesto u genomu umnogome olakšano velikom dužinom fragmenata. Takođe, na ovaj način moguće je precizno odrediti tačke prekida kod kompleksnih rearanžmana. Prvu platformu za sekvenciranje dugačkih fragmenata

razvio je *Oxford Nanopore Technologies* [61], a zatim su usledili *Pacific Biosciences* [62], a od nedavno i *Illumina*. Već su opisani brojni slučajevi otkrivanja molekularno-genetičke osnove genetičke retke bolesti kod pacijenata kod kojih su sve prethodne metode sekvenciranja bile neuspešne [63].

Sem sekvenciranja DNK, sekvenciranje iRNK (kodirajući transkriptom), ima značajnu ulogu u otkrivanju molekularne osnove retkih bolesti kod pacijenata kod kojih su sekvenciranje egzoma/genoma bili neinformativni [64]. Fresard i saradnici su prijavili da sekvenciranje kompletne kodirajuće iRNK podiže dijagnostičku uspešnost za i do 34% ukazujući da bi ovu vrstu analize trebalo uraditi kao komplementarnu metodu ukoliko predhodno urađeni egzom/genom nisu doveli do postavljanja dijagnoze [65,66]. Međutim, u slučaju sekvenciranja iRNK mora se uzeti u obzir da nisu sve iRNK eksprimirane u svim tkivima, niti su eksprimirane sve u svakom trenutku. To predstavlja otežavajuću okolnost jer može da zahteva biopsiju određenih tkiva (mišića, jetre itd.).

Podaci koji se dobijaju sekvenciranjem iRNK mogu se analizirati na više načina, a to su diferencijalna analiza ekspresije, analiza nepravilnog iskrcavanja introna, alel-specifična ekspresija i analiza strukturnih varijanti [67]. Sem toga, sekvenciranje iRNK primenom sekvenciranja dugačkih fragmenata uvodi novu dimenziju, a to je detekcija različitih izoformi, kao i produkata genskih fuzija [68]. Mogućnost identifikacije različitih izoformi je posebno važna kod kompleksnih gena i genskih familija.

Pored transkriptomike, i druge tehnologije, kao što su epigenomika, proteomika ili metabolomika, mogu da obezbede komplementarne podatke sekvenciranju egzoma/genoma i tako doprinesu postavljanju dijagnoze retke bolesti ili razjašnjavanju molekularnih mehanizama njenog nastanka. Kombinovanje podataka dobijenih primenom različitih „omika“, omogućava bolje razumevanje efekta pojedinačnih varijanti na ekspresiju ili metilaciju gena, na proteinske mreže ili metabolizam tkiva. Koja od navedenih „omika“ će komplementirati neinformativno DNK sekvenciranje zavisice na prvom mestu od fenotipa pacijenta. Za neke retke bolesti (npr. *Rubinstein-Taybi*) jedini način za postavljanje dijagnoze je analiza metilacionog profila [69]. Kod urođenih bolesti metabolizma, metabolomika može imati ključnu ulogu za razumevanje mehanizma bolesti, pogotovo kada je genetička varijanta detektovana u genu čija uloga nije dovoljno istražena [70]. Proteomika daje direktnu informaciju o deficijenciji proteina, bilo da se radi o njegovoj sintezi, njegovoj stabilnosti, ili povećanoj podložnosti degradaciji. Proteomska analiza ukazuje na proteinsku mrežu koja je pogođena i u čijem je centru aberantni protein. U nekim slučajevim rezultati dobijeni iz različitih „omika“ mogu da ukažu na defekt koji nije identifikovan prethodnim sekvenciranjem egzoma/genoma, i da se tek ponovnom reanalizom/re-sekvenciranjem dobije potvrda postojanja genetičke varijante u odgovarajućem genu, varijante koja prvobitnom analizom nije bila detektovana usled greške ili metodološkog ograničenja [71].

Zaključak

Razvoj tehničkih mogućnosti će i u budućnosti pomerati granice identifikacije genetičkih varijanti koje su uzročnici monogenskih bolesti. Detekcija varijante koja je uzročnik bolesti je neprocenjiva za obolelu osobu i njenu porodicu. Međutim saznanje koja genetička varijanta dovodi do bolesti je najčešće nedovoljno za potpuno razumevanje molekularne patofiziologije bolesti. Neophodno je ići u dalja istraživanja i utvrditi promene u ćelijskim procesima na nivou RNK, proteina i metabolita. Takva detaljna istraživanja su ključna za potpuno razumevanje molekularnih karakteristika bolesti. Nova znanja o genetičkom uzroku bolesti, kao i procesima koji su poremećeni u okviru ćelije su neophodna baza za razvoj novih ideja koje će kroz translaciona istraživanja dovesti do inovativnih lekova i ultimativno omogućiti lečenje retkih bolesti.

Napomena: Ovaj rad je podržan projektom Ministarstva nauke, tehnološkog razvoja i inovacija Republike Srbije (451-03-47/2023-01/ 200042). Rad je rezultat naučne aktivnosti Centra za genetičku dijagnostiku retkih bolesti IMGGI.

Literatura

1. Orphanet [Internet]. [cited 2023 Sep 8]. Available from: <https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/index.php>
2. Nguengang Wakap S, Lambert DM, Olry A, Rodwell C, Gueydan C, Lanneau V, et al. Estimating cumulative point prevalence of rare diseases: analysis of the Orphanet database. *Eur J Hum Genet.* 2020;28:165–73.
3. IRDiRC – International Rare Diseases Research Consortium [Internet]. [cited 2023 Sep 8]. Available from: <https://irdirc.org/>
4. United Nations. Addressing the challenges of persons living with a rare disease and their families : resolution / adopted by the General Assembly [Internet]. Available from: <https://www.rarediseasesinternational.org/wp-content/uploads/2022/01/Final-UN-Text-UN-Resolution-on-Persons-Living-with-a-Rare-Disease-and-their-Families.pdf>
5. Program za retke bolesti i akcioni plan [Internet]. [cited 2023 Sep 11]. Available from: <https://www.zdravlje.gov.rs/tekst/343045/program-za-retke-bolesti-i-akcioni-plan.php>
6. EURORDIS [Internet]. [cited 2023 Sep 8]. Available from: <https://www.eurordis.org/>
7. Stojiljkovic M, Jovanovic J, Djordjevic M, Grkovic S, Cvorkov Drazic M, Petrucev B, et al. Molecular and phenotypic characteristics of patients with phenylketonuria in Serbia and Montenegro. *Clinical Genetics.* 2006;70:151–5.
8. Djordjevic M, Klaassen K, Sarajlija A, Tosic N, Zukic B, Kecman B, et al. Molecular Genetics and Genotype-Based Estimation of BH4-Responsiveness in Serbian PKU Patients: Spotlight on Phenotypic Implications of p.L48S. *JIMD Rep.* 2013;9:49–58.
9. Zerjav Tansek M, Groselj U, Angelkova N, Anton D, Baric I, Djordjevic M, et al. Phenylketonuria screening and management in southeastern Europe - survey results from 11 countries. *Orphanet J Rare Dis.* 2015;10:68.
10. Groselj U, Tansek MZ, Smon A, Angelkova N, Anton D, Baric I, et al. Newborn screening in southeastern Europe. *Mol Genet Metab.* 2014;113:42–5.
11. Stojiljković-Petrović M, Klaassen K, Pavlovic S. Molecular Characteristics, Phenotypic Diversity and Genotype-Estimated Therapeutic Responsiveness of Serbian Patients with Phenylketonuria. *Journal of Medical Biochemistry.* 2014;33.
12. Stojiljkovic M, Klaassen K, Djordjevic M, Sarajlija A, Brasil S, Kecman B, et al. Molecular and phenotypic characteristics of seven novel mutations causing branched-chain organic acidurias. *Clin Genet.* 2016;90:252–7.
13. OMIM - NCBI [Internet]. [cited 2023 Sep 8]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim>
14. Worman HJ, Bonne G. "Laminopathies": a wide spectrum of human diseases. *Exp Cell Res.* 2007;313:2121–33.
15. Denommé-Pichon A-S, Matalonga L, de Boer E, Jackson A, Benetti E, Banka S, et al. A Solve-RD ClinVar-based reanalysis of 1522 index cases from ERN-ITHACA reveals common pitfalls and misinterpretations in exome sequencing. *Genet Med.* 2023;25:100018.
16. Komazec J, Zdravkovic V, Sajic S, Jescic M, Andjelkovic M, Pavlovic S, et al. The importance of combined NGS and MLPA genetic tests for differential diagnosis of maturity onset diabetes of the young. *Endokrynol Pol.* 2019;70:28–36.
17. Andjelkovic M, Minic P, Vreca M, Stojiljkovic M, Skakic A, Sovtic A, et al. Genomic profiling supports the diagnosis of primary ciliary dyskinesia and reveals novel candidate genes and genetic variants. *PLoS One.* 2018;13:e0205422.
18. Anđelković M, Spasovski V, Vreća M, Sovtić A, Rodić M, Komazec J, et al. The importance of genomic profiling for differential diagnosis of pediatric lung disease patients with suspected ciliopathies. *Srpski arhiv za celokupno lekarstvo.* 2019;147:160–6.
19. Skakic A, Djordjevic M, Sarajlija A, Klaassen K, Tosic N, Kecman B, et al. Genetic characterization of GSD I in Serbian population revealed unexpectedly high incidence of GSD Ib and 3 novel SLC37A4 variants. *Clin Genet.* 2018;93:350–5.
20. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med.* 2015;17:405–24.
21. Ellard S, Baple E, Berry I, Forrester N, Turnbull C, Owens M, et al. ACGS Best Practice Guidelines for Variant Classification 2019. 2019 [cited 2023 Sep 11]. Available from: <https://www.semanticscholar.org/paper/ACGS-Best-Practice-Guidelines-for-Variant-2019-Ellard-Baple/86fa75f316823ef358a804fe1e45a98a85351bf9>
22. ICD-11 for Mortality and Morbidity Statistics [Internet]. [cited 2023 Sep 8]. Available from: <https://icd.who.int/browse11/l-m/en>
23. Human Phenotype Ontology [Internet]. [cited 2023 Sep 8]. Available from: <https://hpo.jax.org/app/>

24. 1000 Genomes | A Deep Catalog of Human Genetic Variation [Internet]. [cited 2023 Sep 8]. Available from: <https://www.internationalgenome.org/>
25. Gudmundsson S, Singer-Berk M, Watts NA, Phu W, Goodrich JK, Solomonson M, et al. Variant interpretation using population databases: Lessons from gnomAD. *Human Mutation*. 2022;43:1012–30.
26. ClinVar [Internet]. [cited 2023 Sep 8]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>
27. LOVD - An Open Source DNA variation database system [Internet]. [cited 2023 Sep 8]. Available from: <https://www.lovd.nl/>
28. HGMD® home page [Internet]. [cited 2023 Sep 8]. Available from: <https://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>
29. Mastermind Genomic Search Engine [Internet]. [cited 2023 Sep 8]. Available from: <https://www.genomenon.com/mastermind/>
30. Ioannidis NM, Rothstein JH, Pejaver V, Middha S, McDonnell SK, Baheti S, et al. REVEL: An Ensemble Method for Predicting the Pathogenicity of Rare Missense Variants. *Am J Hum Genet*. 2016;99:877–85.
31. UCSC Genome Browser: Citing Us [Internet]. [cited 2023 Sep 11]. Available from: <https://genome.ucsc.edu/cite.html>
32. MutationAssessor.org /// functional impact of protein mutations [Internet]. [cited 2023 Sep 11]. Available from: <http://mutationassessor.org/r3/>
33. Rentzsch P, Witten D, Cooper GM, Shendure J, Kircher M. CADD: predicting the deleteriousness of variants throughout the human genome. *Nucleic Acids Res*. 2019;47:D886–94.
34. Pejaver V, Urresti J, Lugo-Martinez J, Pagel KA, Lin GN, Nam H-J, et al. Inferring the molecular and phenotypic impact of amino acid variants with MutPred2. *Nat Commun*. 2020;11:5918.
35. Vaser R, Adusumalli S, Leng SN, Sikic M, Ng PC. SIFT missense predictions for genomes. *Nat Protoc*. 2016;11:1–9.
36. Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, Ramensky VE, Gerasimova A, Bork P, et al. A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods*. 2010;7:248–9.
37. Clustal Omega < Multiple Sequence Alignment < EMBL-EBI [Internet]. [cited 2023 Sep 11]. Available from: <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>
38. Arnold K, Bordoli L, Kopp J, Schwede T. The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics*. 2006;22:195–201.
39. Kelley LA, Mezulis S, Yates CM, Wass MN, Sternberg MJE. The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nat Protoc*. 2015;10:845–58.
40. Jumper J, Evans R, Pritzel A, Green T, Figurnov M, Ronneberger O, et al. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature*. 2021;596:583–9.
41. Milacic I, Barac M, Milenkovic T, Ugrin M, Klaassen K, Skakic A, et al. Molecular genetic study of congenital adrenal hyperplasia in Serbia: novel p.Leu129Pro and p.Ser165Pro CYP21A2 gene mutations. *J Endocrinol Invest*. 2015;38:1199–210.
42. Stojiljkovic M, Pérez B, Desviat LR, Aguado C, Ugarte M, Pavlovic S. The Missense p.S231F phenylalanine hydroxylase gene mutation causes complete loss of enzymatic activity in vitro. *Protein J*. 2009;28:294–9.
43. Pecimonova M, Polak E, Csicsay F, Reblova K, Stojiljkovic M, Levarski Z, et al. Functional and structural characterisation of 5 missense mutations of the phenylalanine hydroxylase. *Gen Physiol Biophys*. 2017;36:361–71.
44. Wright CF, Fitzgerald TW, Jones WD, Clayton S, McRae JF, van Kogelenberg M, et al. Genetic diagnosis of developmental disorders in the DDD study: a scalable analysis of genome-wide research data. *Lancet*. 2015;385:1305–14.
45. Clark MM, Stark Z, Farnaes L, Tan TY, White SM, Dimmock D, et al. Meta-analysis of the diagnostic and clinical utility of genome and exome sequencing and chromosomal microarray in children with suspected genetic diseases. *NPJ Genom Med*. 2018;3:16.
46. Illumina | Sequencing and array-based solutions for genetic research [Internet]. [cited 2023 Sep 11]. Available from: <https://www.illumina.com/>
47. BGI Genomics - Global [Internet]. [cited 2023 Sep 11]. Available from: <https://www.bgi.com/global>
48. Oxford Nanopore Technologies [Internet]. Oxford Nanopore Technologies. [cited 2023 Sep 11]. Available from: <https://nanoporetech.com>
49. PacBio - Sequence with confidence [Internet]. PacBio. [cited 2023 Sep 11]. Available from: <https://www.pacb.com/>
50. Corominas J, Smeekens SP, Nelen MR, Yntema HG, Kamsteeg E-J, Pfundt R, et al. Clinical exome sequencing-Mistakes and caveats. *Hum Mutat*. 2022;43:1041–55.
51. Hong CS, Singh LN, Mullikin JC, Biesecker LG. Assessing the reproducibility of exome copy number variations predictions. *Genome Medicine*. 2016;8:82.

52. Yamamoto T, Shimojima K, Ondo Y, Imai K, Chong PF, Kira R, et al. Challenges in detecting genomic copy number aberrations using next-generation sequencing data and the eXome Hidden Markov Model: a clinical exome-first diagnostic approach. *Hum Genome Var.* 2016;3:1–6.
53. Riggs ER, Andersen EF, Cherry AM, Kantarci S, Kearney H, Patel A, et al. Technical standards for the interpretation and reporting of constitutional copy-number variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) and the Clinical Genome Resource (ClinGen). *Genetics in Medicine.* 2020;22:245–57.
54. Wang Q, Shashikant CS, Jensen M, Altman NS, Girirajan S. Novel metrics to measure coverage in whole exome sequencing datasets reveal local and global non-uniformity. *Sci Rep.* 2017;7:885.
55. Sanchis-Juan A, Stephens J, French CE, Gleadall N, Mégy K, Penkett C, et al. Complex structural variants in Mendelian disorders: identification and breakpoint resolution using short- and long-read genome sequencing. *Genome Medicine.* 2018;10:95.
56. Kaiser F, Sadoway T, Yin Y, Zulfiqar Ali Q, Nguyen CM, Shum N, et al. Genome sequencing identifies rare tandem repeat expansions and copy number variants in Lennox–Gastaut syndrome. *Brain Communications.* 2021;3:fcab207.
57. Kvarnung, M., Nordgren, A. (2017). Intellectual Disability & Rare Disorders: A Diagnostic Challenge. In: Posada de la Paz, M., Taruscio, D., Groft, S. (eds) *Rare Diseases Epidemiology: Update and Overview*. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol 1031. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-67144-4_3
58. Souche E, Beltran S, Brosens E, Belmont JW, Fossum M, Riess O, et al. Recommendations for whole genome sequencing in diagnostics for rare diseases. *Eur J Hum Genet.* 2022;30:1017–21.
59. Krude H, Mundlos S, Øien NC, Opitz R, Schuelke M. What can go wrong in the non-coding genome and how to interpret whole genome sequencing data. *Medizinische Genetik.* 2021;33:121–31.
60. Chintalaphani SR, Pineda SS, Deveson IW, Kumar KR. An update on the neurological short tandem repeat expansion disorders and the emergence of long-read sequencing diagnostics. *Acta Neuropathologica Communications.* 2021;9:98.
61. Clarke J, Wu H-C, Jayasinghe L, Patel A, Reid S, Bayley H. Continuous base identification for single-molecule nanopore DNA sequencing. *Nat Nanotechnol.* 2009;4:265–70.
62. Eid J, Fehr A, Gray J, Luong K, Lyle J, Otto G, et al. Real-time DNA sequencing from single polymerase molecules. *Science.* 2009;323:133–8.
63. de la Morena-Barrio B, Stephens J, de la Morena-Barrio ME, Stefanucci L, Padilla J, Miñano A, et al. Long-Read Sequencing Identifies the First Retrotransposon Insertion and Resolves Structural Variants Causing Antithrombin Deficiency. *Thromb Haemost.* 2022;122:1369–78.
64. Kremer LS, Bader DM, Mertes C, Kopajtich R, Pichler G, Iuso A, et al. Genetic diagnosis of Mendelian disorders via RNA sequencing. *Nat Commun.* 2017;8:15824.
65. Cummings BB, Marshall JL, Tukiainen T, Lek M, Donkervoort S, Foley AR, et al. Improving genetic diagnosis in Mendelian disease with transcriptome sequencing. *Sci Transl Med.* 2017;9:eaal5209.
66. Frésard L, Smail C, Ferraro NM, Teran NA, Li X, Smith KS, et al. Identification of rare-disease genes using blood transcriptome sequencing and large control cohorts. *Nat Med.* 2019;25:911–9.
67. Marwaha S, Knowles JW, Ashley EA. A guide for the diagnosis of rare and undiagnosed disease: beyond the exome. *Genome Medicine.* 2022;14:23.
68. Oliver GR, Tang X, Schultz-Rogers LE, Vidal-Folch N, Jenkinson WG, Schwab TL, et al. A tailored approach to fusion transcript identification increases diagnosis of rare inherited disease. *PLoS One.* 2019;14:e0223337.
69. Berdasco M, Esteller M. Genetic syndromes caused by mutations in epigenetic genes. *Hum Genet.* 2013;132:359–83.
70. Abela L, Simmons L, Steindl K, Schmitt B, Mastrangelo M, Joset P, et al. N(8)-acetylspermidine as a potential plasma biomarker for Snyder-Robinson syndrome identified by clinical metabolomics. *J Inherit Metab Dis.* 2016;39:131–7.
71. Grabowski P, Hesse S, Hollizeck S, Rohlf M, Behrends U, Sherkat R, et al. Proteome Analysis of Human Neutrophil Granulocytes From Patients With Monogenic Disease Using Data-independent Acquisition. *Mol Cell Proteomics.* 2019;18:760–72.



Slika 1. Pregled osnovnih podataka o retkim bolestima

Uloga vazopresinskog sistema paraventrikularnog jedra u razvoju hipertenzije

Bojana Stevanović, Nina Japundžić-Žigon

Institut za Farmakologiju, Kliničku Farmakologiju i Toksikologiju, Medicinski Fakultet, Univerzitet u Beogradu

Kontakt: bojana.stevanovic@stomf.bg.ac.rs

Apstrakt

Vazopresin ili antidiuretički hormon je peptidni molekul koji na vrlo složen način utiče na kardiovaskularnu i osmotsku homeostazu. Glavni izvori vazopresina su supraoptičko i paraventrikularno jedro hipotalamusa. Paraventrikularno jedro je ključna centralna struktura u neuralnoj i endokrinog regulaciji krvnog pritiska. Sastoji se od dve funkcionalne celine – neuroendokrine (sekretorne) i autonomne, koje su integralno povezane u modulaciji kardiovaskularnog odgovora na različite fiziološke zahteve. Neuroendokrini magnocelularni neuroni sintetizuju i oslobađaju vazopresin u cirkulaciju, gde vazopresin ispoljava svoje hormonsko dejstvo. Jedan deo sintetisanog vazopresina oslobađa se i lokalno, unutar samog jedra, delujući kao neurotransmiter/neuromodulator i utičući na signalizaciju okolnih neurona. Manja grupacija parvocelularnih neurona učestvuje u sekretornom odgovoru paraventrikularnog jedra na različite stresore, menjajući aktivnost hipotalamo-hipofizno-nadbubrežne osovine. Autonomni deo paraventrikularnog jedra direktno ili indirektno reguliše simpatičku aktivnost usmerenu ka kardioresnalom sistemu. Brojne studije na životinjama i ljudima ukazuju na važnu vezu između nivoa sinteze vazopresina i nastanka hipertenzije. Različiti molekularno-biološki pristupi korišćeni su za procenu i izučavanje uticaja promene ekspresije i strukture centralnih i perifernih vazopresinskih receptora na krvni pritisak. Budući da je hipertenzija oboljenje sa izraženom incidencom u humanoju populaciji i da povećava rizik od razvoja kardiovaskularnih komplikacija visokog mortaliteta, od presudnog je značaja pronaći uzrok njenog nastanka. Rasvetljivanje mehanizama kojima vazopresinski sistem doprinosi genezi hipertenzije imalo bi veliki biomedicinski značaj i omogućilo bi razvoj antihipertenzivnih lekova nove generacije veće efikasnosti.

Ključne reči: vazopresin, vazopresinski receptori, paraventrikularno jedro, hipertenzija

The role of paraventricular nucleus vasopressin system in development of hypertension

Bojana Stevanović, Nina Japundžić-Žigon

Institute of Pharmacology, Clinical Pharmacology and Toxicology, Faculty of Medicine,
University of Belgrade, Belgrade

Correspondence: bojana.stevanovic@stomf.bg.ac.rs

Abstract

Vasopressin or antidiuretic hormone is a peptide molecule that regulates osmotic and cardiovascular homeostasis in a complex manner. The main sources of vasopressin are the supraoptic and paraventricular nucleus of the hypothalamus. Paraventricular nucleus is the pivotal central structure involved in neural and endocrine regulation of blood pressure. It is composed of two functionally separate compartments – neuroendocrine (secretory) and autonomic, which integratively modulate cardiovascular response according to various physiological demands. Neuroendocrine magnocellular neurons are responsible for vasopressin synthesis and its secretion into the bloodstream, where vasopressin exerts hormonal effects. Some portion of synthesized vasopressin is released locally within the nucleus itself, acting as neurotransmitter/neuromodulator and altering signalization of the surrounding neurons. Small amount of parvocellular neurons is involved in secretory response of the paraventricular nucleus to various stressors, changing the activity of hypothalamo-hypophyseal-adrenal axis. Autonomic part of the paraventricular nucleus directly or indirectly regulates the sympathetic charge toward the cardiorenal system. Numerous animal and human experimental studies indicate the important connection between vasopressin levels and the development of hypertension. Various genetic approaches have been used to determine and study the influence of expressional and structural changes in central and peripheral vasopressin receptors on blood pressure. Since hypertension shows high incidence in the human population and increases a risk for high mortality cardiovascular complications, it is essential to understand what causes it. Elucidating the mechanism behind vasopressin contribution to generate hypertension would have a significant biomedical impact and it would ensure the development of new generation antihypertensive drugs with increased efficacy.

Key word: vasopressin, vasopressin receptors, paraventricular nucleus, hypertension

HIPERTENZIJA I NJENA ETIOLOGIJA

Hipertenzija je bolest nepoznate etiologije, koju karakteriše hronično povećanje vrednosti sistolnog (>140 mmHg) i dijastolnog (>90 mmHg) krvnog pritiska [1–3]. Do porasta krvnog pritiska dolazi usled hipertrofije mišićnog dela zida arteriola, što za posledicu ima suženje lumena arteriola. Sveukupno, ovakve strukturne promene rezultuju smanjenjem priliva krvi u tkiva i organe, kulminirajući njihovim oštećenjem [1]. Prema zvaničnim podacima Svetske zdravstvene organizacije, hipertenziju odlikuje visoka incidenca u humanoj populaciji [4]. Statistički proračuni su u pogledu eradikacije ovog oboljenja nepovoljni i ukazuju da će do 2025. godine hipertenzija biti dijagnostikovana kod više od 1,56 milijardi ljudi širom sveta [4,5]. Dijagnoza hronično povećanog krvnog pritiska najčešće se postavlja tek nakon pojave prvih komplikacija sa visokom stopom mortaliteta, poput infarkta miokarda i mozga. Otuda se neretko se za hipertenziju kaže da je „tihi ubica“ [2,6]. Uzimajući u obzir da postojeća terapija ima ograničenu efikasnost (svega 45%) i vrlo često zahteva upotrebu većeg broja lekova, presudno je pojasniti patofiziološke mehanizme koji stoje u osnovi razvoja hipertenzije [7–9].

Različiti faktori rizika, takozvani “hipertenziogeni faktori” dovode se u vezu sa porastom krvnog pritiska [2]. Prisustvo gojaznosti, insulinske rezistencije, izloženost stresu i povećani unos soli kod osoba osetljivih na so, visoko korelira sa razvitkom hipertenzije [10,11]. Većina ovih faktora ima zbirni efekat - njihovo nado-davanje daje lošiju kliničku prognozu [2]. Iako je uzrok nastanka varijacija u pritisku nepoznat, studije sprovedene na bliskim srodnicima i brojnim animalnim modelima ukazuju na snažnu genetsku podlogu razvoja hipertenzije [12,13]. S obzirom na činjenicu da je veliki broj regulatornih mehanizama uključen u kontrolu krvnog pritiska, identifikovani su mnogi geni kandidati, čije mutacije imaju za posledicu njegovo povećanje [14]. Osim genetske predispozicije, nastanak hipertenzije je u velikoj meri i neurogene prirode [15]. Naglašena aktivnost simpatičkog nervnog sistema pod uticajem različitih vidova centralne signalizacije, takođe uzrokuje nastanak ovog oboljenja [16]. Jedan od takvih fizioloških sistema, koji objedinjuje nasledne i neurogene aspekte kontrole krvnog pritiska je vazopresinski sistem paraventricularnog jedra [17,18].

VAZOPRESIN - MOLEKULARNA PRIRODA I MEHANIZAM DEJSTVA

Brojni etiološki podaci iz literature upućuju na izraženo učešće vazopresina (VP) u nastanku hipertenzije [13,19]. Ovakav nalaz nije neočekivan, ukoliko se uzme u obzir fiziološko dejstvo VP-a i njegova ključna uloga u očuvanju osmotske i kardiovaskularne homeostaze [20]. VP je peptidni hormon, sačinjen od devet aminokiselina i kodiran genom koji se nalazi na hromozomu 20 [1].

Svoje biološko dejstvo ispoljava aktiviranjem posebnih vazopresinskih receptora koji pripadaju velikoj familiji receptora spregnutih sa G-proteinom. Postoje tri tipa vazopresinskih receptora (VR): V1aR, V1bR i V2 [21]. Ovi receptori poseduju sedam transmembranskih domena i odlikuju ih drugačiji farmakološki profili. Put aktivacije unutarćelijskih sekundarnih glasnika se razlikuje među vazopresinskim receptorima i šematski je prikazan na **Slici 1**. V1aR i V1bR dele nishodnu signalnu kaskadu vezujući svoje ligande na ćelijskoj površini. Oba tipa receptora spregnuta su sa Gq proteinskom subjedinicom, koja katalizuje izmenu guanozin difosfata (GDP) u guanozin trifosfat (GTP), regrutujući fosfolipazu C na ćelijsku membranu. Ovako aktivirana fosfolipaza hidrolizuje fosfadiliinozitol-4,5-bisfosfat (PIP2), vodeći stvaranju diaciglicerola (DAG) i inozitol-3,4,5-trifosfata (IP3) i posledičnom povećanju unutaćelijskog kalcijum [21]. Aktivacija V1aR i V1bR praćena je brзом fosforilizacijom i desenzitizacijom [22]. Signal pokrenut aktivacijom V2R razlikuje se od prethodno opisanog niza događaja. Kada se VP veže za V2R na membrani ćelije, Gs proteinska subjedinica pokreće put sinteze cikličnog adenozin monofosfata (cAMP), aktivacijom enzima adenilat ciklaze. Ceo proces dovodi do prelaska

enzima protein kinaze u aktivnu formu, koja je odgovorna za fosforilaciju proteina akvaporina 2 (AQP-2) i njegovu ugradnju u luminalnu membranu tubularnog epitela sabirnih kanalića bubrega [20,21] (**Slika 1**).

Vazopresinski receptori su široko rasprostranjeni u organizmu i shodno tome učestvuju u regulaciji brojnih procesa [23]. Distribucija i aktivnost vazopresinskih receptora zavise od nekoliko faktora. Pre svega, V1aR i V2R su skloni alosteričkim interakcijama formirajući homo- i hetero-dimere sa različitim receptorima (V1aR/V2R, V1aR/angiotenzinski receptor tipa 1-AT1, V1bR/receptor kortikotropin oslobađajućeg hormona-CRHR) [21]. Dalje, vazopresinski receptori podležu strukturnim promenama, usled mutacija i tačkastih polimorfizama (SNP) koji se javljaju u njihovim genima, dajući nove fenotipove koji vode u različita oboljenja. Čak i diskretne mutacione promene u promotoru gena za receptore ili bilo kojoj komponenti transkripcione mašinerije, mogu dovesti do redistribucije receptora u mozgu, što za posledicu ima promene u ponašanju i neuroendokrinim karakteristikama. Na primer, SNP-ovi u promotorskom regionu gena za VP dovode se u vezu sa prekomernom ekspresijom VP-a u paraventrikularnom jedru i pojavom anksioznosti i depresije kod pacova [24]. X-vezane mutacije u V2R udružene su sa urođenim nefrogenim dijabetesom insipidusom i nemogućnošću koncentrovanja urina [25]. Gustina receptora na površini ćelije je dinamična i menja se u različitim fiziološkim miljeima, kao posledica promene genske ekspresije i internalizacije receptora [24]. Stimulacija receptora dovodi do fosforilacije i endocitoze posredovane β -arestinom i klatrinom [26–29]. Nakon internalizacije, VR mogu podleći degradaciji (česta kod V2R-a) ili se reciklirati (V1aR, V1bR), što utiče na gustinu receptora u ćelijskoj membrani [22,30]. Degradacija V2R odigrava se u endozomsko-lizozomskom sistemu, vodeći smanjenju količine proteina [31]. Ipak, ovo ne mora biti zavšetak receptorske funkcije. Receptori mogu napustiti sistem kasnog endozoma/ lizozoma i ugraditi se u ćelijsku membranu [32]. Uočeno je da se V1aR efikasno recikliraju, dok se V1bR pretežno zadržavaju u citoplazmi (sekvestracija) [22,30].

PARAVENTRIKULARNO JEDRO - VAZOPRESINSKI CENTAR

Paraventrikularno jedro hipotalamusa je ključna struktura centralnog nervnog sistema sa istaknutnim učešćem u održanju kardiovaskularne homeostaze. Bez obzira na njegove male dimezije (zauzima svega 1% mozga kičmenjaka), paraventrikularno jedro je visokointegrisana efektorska struktura [33]. Prostire se bilateralno u nivou treće moždane komore i na mikroskopskim preparatima se uočava u vidu karakteristične forme leptira [34] (**Slika 2**).

Na osnovu morfoloških karakteristika u paraventrikularnom jedru se zapažaju dva tipa neurona: krupniji magnocelularni (MCN) i sitniji parvocelularni neuroni (PCN). Ove ćelije organizovane su u tri magnocelularne regije (anteriorna, posteriorna i medijalna) i pet parvocelularnih oblasti (dorzalno, lateralno, medijalno, periventrikularno i anteriorno subjedro) [33,35]. MCN i neki PCN imaju sekretorni potencijal i medijatori su neuroendokrine funkcije paraventrikularnog jedra. Nasuprot tome većina PCN ima ulogu u autonomnoj kardiovaskularnoj regulaciji, budući da direktno ili indirektno mogu menjati periferni simpatički tonus [36–38]. Narušavanje ravnoteže između neuroendokrine i autonomne funkcionalne celine dovodi do razvoja patoloških stanja poput hipertenzije [39].

Neuroendokrini deo paraventrikularnog jedra

U paraventrikularnom jedru sintetiše se preko 30 različitih neurotransmitera/neuromodulatora. Ipak, ovo jedro, zajedno sa supraoptičkim nukleusom predstavlja glavno mesto sinteze VP-a, koja se odigrava u MCN [40].

Uloga neurosekretornih MCN u regulaciji krvnog pritiska

Sekretorni kapacitet neuroendokrinih MCN vezan je za regulisanje kardiovaskularne i osmotske homeostaze [41]. Ovi neuroni su odgovorni za biosintezu VP-a u formi prekursora. Nakon obrade oko 85000 molekula VP-a se pakuje u krupne vezikule sa gustim jezgrom, koje su lokalizovane u dendritima i aksonima, gde čekaju signal za sekretovanje [42]. Aksoni neuroendokrinih MCN dosežu do zadnjeg reznja hipofize (neurohipofize) i tu se vrši oslobađanje VP-a u sistemsku cirkulaciju. Nošen krvotokom, VP dospeva do udaljenih ciljnih mesta gde ispoljava svoje hormonsko dejstvo na različita tkiva [36]. Najbolje izučene periferne uloge VP-a su stimulacija vazokonstrikcije (kontrakcije glatke muskulature krvnih sudova) i reapsorpcija vode u bubrežnim tubulima [37,43,44].

Osim oslobađanja iz aksona, dokazano je da se VP može oslobađati i lokalno, iz tela i dendrita MCN. Somatodendritski oslobođen VP ostvaruje autokrino ili parakrino dejstvo, vezujući se za V1aR i V1bR eksprimirane na okolnim neuronima [45,46]. Aksonsko i somatodendritsko oslobađanje su nezavisno regulisani. Somatodendritsko oslobađanje VP-a praćeno je porastom iRNK za VP, dok aksonska sekrecija može izostati [47]. Stoga, merenje VP-a u plazmi nije pouzdan pokazatelj sinteze samog VP-a [24,47]. MCN ne oslobađaju VP kontinuirano, već pokazuju fazni obrazac aktivacije, koji karakteriše smena perioda aktivnosti i "tišine". Različiti spoljašnji i unutrašnji stimuli, kao i sam somatodendritski oslobođen VP mogu menjati ovaj obrazac aktivacije (**Slika 3**) [48].

Uloga neurosekretornih PCN u regulaciji krvnog pritiska

Osim u MCN, poznato je da se VP eksprimira i u PCN. Neurosekretorni PCN imaju važnu ulogu u odgovoru paraventrikularnog jedra na stres i u aktivaciji hipotalamo-hipofizno-nadbubrežne osovine (HPA ose) [49]. Osim što anteriorni i medijalni PCN sintetisuje CRH u odgovoru na akutni stres, oni su izvor i VP-a [37,50,51]. Odnos CRH:VP je diktiran tipom stresora i važan je za održavanje osetljivosti HPA ose u odgovoru na hroničan stres [50,51]. CRH i VP se aksonima transportuju do *eminetia medianae* i oslobađaju u portalni krvotok, kojim se transportuju do kortikotropnih ćelija prednjeg reznja hipofize (adenohipofize). Na ovim ćelijama CRH stimuliše oslobađanje adrenokortikotropnog hormona-ACTH, dok VP dodatno pojačava dejstvo CRH vezujući se za V1bR [41]. ACTH deluje na ćelije kore nadbubrežne žlezede i stimuliše lučenje glukokortikoida. [52,53]. Kortizol je hormon stresa, koji je važan za održanje fizioloških vrednosti krvnog pritiska, a kada je u višku može izazvati hipertenziju [54]. Takođe, optogenetskim eksperimentima pokazano je da ovi CRH/VP pozitivni PCN mogu uticati na krvni pritisak i putem aksonskih projekcija usmerenih ka *nucleus tractus solitarius*-u [55].

Autonomni deo paraventrikularnog jedra

Osim VP-posredovanog ušesća u perifernoj regulaciji krvnog pritiska, paraventrikularno jedro ima važnu ulogu u centralnoj kardiovaskularnoj kontroli, utičući na povećanje simpatičke aktivnosti, koje se susreće i u hipertenziji [56]. Autonomni deo paraventrikularnog jedra čine različite populacije PCN-ova određene topografije. Ovi neuroni okupiraju ventrolateralne, medijalne i dorzalne delove jedra [57,58]. Često se označavaju „preautonomnim“, budući da menjaju aktivnost različitih simpatičkih i parasimpatičkih centara u mozgu i kičmenoj moždini, utičući na sveukupni autonomni odgovor usmeren ka kardioresnalnom sistemu [56,59,60]. Zahvaljujući ovako važnoj ulozi, paraventrikularno jedro se dodatno označava i kao, "glavni auto-nomni kontrolor" [61]. Najveći broj neuronskih projekcija autonomnog paraventrikularnog dela se pruža ka preganglijskim neuronima u torako-lumbalnim intermedio lateralnim (IML) rogovima kičmene moždine, na kojima su ekspimirani V1aR. Upravo zato, ovi neuroni predstavljaju atraktivna mesta za terapijsko delovanje [58].

Integracija funkcije neuroendokrinog i autonomnog dela paraventricularnog jedra

Važno je istaći da su neuroendokrini i autonomni deo paraventricularnog jedra funkcionalno povezani efektima lokalno oslobođenog VP-a, koji omogućava njihovu komunikaciju [24,62]. Osim autokontrole MCN, VP ima i parakrino dejstvo i difunduje kroz međucelijski prostor, delujući kao neurotransmiter. Važna odlika somatodendritskog otpuštanja VP-a je da je ono nesinaptičko. VP dugo opstaje u međucelijskoj sredini i doseže oblasti preauto-nomnih PCN na kojima aktivira V1aR [38,63], što je naročito izraženo tokom hiperosmotske stimulacije [64,65]. Takođe, efekti porasta pritiska, srčane frekvence i renalne simpatičke aktivnosti, indukovani mikro-injekcijama VP-a u paraventricularno jedro, poništavaju se blokadom V1bR antagoninom-nelivaptanom [66]. Sveukupno, podaci sugerišu da su oba tipa vazopresinskih receptora angažovana u integraciji funkcije paravnetrikularnog jedra.

Promena aktivnosti paraventricularnog jedra

Jasno je da je paraventricularno jedro izrazito dinamična struktura, koja poseduje veliku plastičnost sinteze neuropeptida. Ovakva prilagodljivost je diktirana hormonskim i neuronskim uticajima na ćelije paravnetrikularnog jedra, koje neprekidno primaju informacije o različitim fiziološkim parametrima [41]. Smatra se da je u hipertenziji narušena fina ravnoteža između stimulatornih i inhibitornih uticaja na paraventricularno jedro [41,56,67]. Glavni modulatori kardiovaskularne kontrole paraventricularnog jedra su osmotski i kardiovaskularni status organizma, ali i štetni uticaji različitih stresora.

Hiperosmotska stimulacija može dovesti do hidromineralnog disbalansa i rezultovati naglašenim odgovorom paraventricularnog jedra, uz koordiniranu aktivnost MCN i PCN. Dakle, povećanje osmolalnosti vodi simultanom porastu nivoa VP-a u cirkulaciji, ali i uvećanju simpatičkog uticaja na kardiorrenalni sistem, kao posledica lokalno oslobođenog VP-a [68,69]. Dominantni signali koji pristižu do paraventricularnog jedra, poreklom su iz cirkumventrikularnih organa, u kojima odsustvo krvno-moždane barijere omogućava direktno detektovanje promena u plazmi [70–72]. Ipak, MCN mogu i sami da prepoznaju izmene sastava okoloćelijske sredine, budući da poseduju i unutrašnju osmosenzitivnost [73].

Osim promene sastava telesnih tečnosti, porast ili smanjenje krvnog pritiska indirektno utiču na dinamiku paraventricularnog jedra. Sve perturbacije u pritisku deluju na baroreceptorski refleks (barorefleks), jedinstveni sistem negativne povratne sprege, čija funkcija počiva na aktivnosti različitih autonomnih jedara u produženoj moždini, ali i paraventricularnog jedra [74]. Osim međusobnog uticaja uzajamnih neuronskih projekcija između paraventricularnog jedra i barorefleksnih centara, sam VP iz plazme može uticati na barorefleks u nivou *area postremae*, angažovanjem V1aR [75].

Stres je priznati faktor rizika za nastanak hipertenzije. Dokazan je uticaj različitih stresora (spoljašnjih i unutrašnjih) na aktivnost HPA osovine i neurosekretorne MCN, ali i na lokalnu intranuklearnu vazopresinsku signalizaciju, što vodi promenama u ponašanju u odgovoru na stres [41,76,77].

VAZOPRESIN I HIPERTENZIJA

Različiti genetički animalni modeli koriste se za ispitivanje hipertenzije. Arterijska hipertenzija se najčešće proučava na spontano hipertenzivnim pacovima (engl. *Spontaneously Hypertensive Rats*-SHR) [78,79]. Kod ovih pacova, patofiziološke promene poput onih na endotelu, nastaju u ranoj dobi, dok se kod ljudi hipertenzija razvija kasnije u životu [80,81]. Iz ovog razloga SHR nisu pogodan model za ispitivanje prehipertenzivnih promena i mehanizama koji dovode do razvoja hipertenzije u kasnijoj životnoj dobi. Adekvatan model za ovakva istraživanja su granično hipertenzivni pacovi (engl. *Borderline Hypertensive Rats* -BHR),

koje karakteriše odsustvo strukturnih promena tipičnih za hipertenziju [82]. BHR je animalni model razvijen od strane Lawler-a i saradnika, nastao ukrštanjem SHR ženki i normotenzivnih mužjaka *Wistar-Kyoto* (WKY) pacova (**Slika 4**) [83,84].

BHR pacovi imaju granično-hipertenzivne vrednosti pritiska, slične onima kod ljudi, što je ujedno i glavni faktor rizika za razvoj hipertenzije (**Slika 5**) [85]. Bez obzira na naslednu predispoziciju BHR-ova za nastanak hipertenzije, oni je neće razviti ukoliko se ne izlože nepovoljnim uslovima sredine, kao što su stres i/ili povišeni unos soli [83,84]. To su potvrdili i rezultati naših istraživanja [84], koji su pokazali da unos soli nije dovoljan faktor za indukovanje hipertenzije kod ovih životinja. Tek kada su BHR-ovi bili izloženi kombinaciji povećanog unosa soli i hroničnom heterotipičnom stresu, vrednosti sistolnog krvnog pritiska kod ovih životinja premašile su granične vrednosti i dosegle su hipertenzivne [84].

Brojni podaci iz literature ukazuju na učešće kako centralnog, tako i perifernog VP-a u etiologiji hipertenzije [1,13]. Iako nije dokazano da je VP glavni uzročnik razvoja hipertenzije, disbalans u vazopresinkom sistemu u velikoj meri doprinosi težini i krajnjem ishodu bolesti [20].

Centralni vazopresin i hipertenzija

Učešće VP-a u nastanku hipertenzije potkrepljeno je njegovim pristupom u moždanim strukturama koje su od velikog značaja za kardiovaskularnu kontrolu [86–88]. Jedna takva struktura je i paraventrikularno jedro [1,13,19]. Uočeno je da je koncentracija centralnog VP-a u genetskoj hipertenziji izmenjena [89,90]. Nivo VP-a u neurohipofizi SHR-ova veći je za 26% u poređenju sa normotenzivnim životinjama [89]. U pre-hipertenzivnom stadijumu SHR-ovi imaju približno jednak nivo VP-a u odnosu na normotenzivne kontrole, ali sa progresijom bolesti njegov nivo opada [91]. Nasuprot ovakvim nalazima, druga istraživačka grupa [92] je pokazala da je ekspresija iRNK za VP kod posebnog varijeteta SHR-ova sklonih šlogu, uvećana u hipertenzivnom stadijumu. Povišena ekspresija VP-a detektovana je u paraventrikularnom jedru SHR-ova čak i u pre-hipertenzivnom stadijumu, sugerišući da uočen porast VP-a nije posledica hipertenzije [93]. U skladu sa ovakvim rezultatima i naša istraživanja [84] su potvrdila da se vazopresinski sistem paraventrikularnog jedra BHR-ova nalazi u stanju povišene aktivnosti. Ova studija [84] je po prvi put pokazala da je kod BHR-ova pod bazalnim uslovima, ekspresija paraventrikularnog VP-a značajno veća u odnosu na *Wistar* pacove. To ukazuje na povećanje sinteze VP-a i korelira sa pojačanim sistemskim otpuštanjem [84]. Eksperimentalne lezije paraventrikularnog jedra SHR-ova, koje vode smanjenju pritiska, dodatno potvrđuju neizostavnu ulogu ove moždane strukture u kardiovaskularnoj regulaciji. Sniženje krvnog pritiska kod životinja sa lezijom manifestuje se već u ranoj dobi. Ipak, vremenom krvni pritisak počinje da raste, ali nikada ne dostiže vrednosti koje su prisutne kod kontrola [94]. Dakle, može se zaključiti da je paraventrikularno jedro struktura koja je važna u početnim stadijumima hipertenzije, ali i za ispoljavanje maksimalnih hipertenzivnih efekata u kasnijim razvojnim fazama.

Pored promena ekspresije samog VP-a, zapažene su razlike i na nivou njegovih receptora [95,96]. Na primer, DOCA-NaCl eksperimentalni model hipertenzije pokazao je povećanu zastupljenost centralnih vazopresinskih receptora [97]. Dokazano je da V1aR i V1bR kolokalizuju u paraventrikularnom jedru i bogato su ekspimirani [46,98]. Poznato da je autokrina regulacija oslobađanja VP-a dominantno posredovana V1aR [46]. Ipak, naši eksperimenti [84] pokazali su uvećanje iRNK za V1bR kod BHR-ova pod bazalnim uslovima, dok ekspresija V1bR opada kada se ove životinje izlože povećanom unosu soli [84]. Iako su V1aR medijatori simpatoekscitacije uslovljene hipermosmotskim stimulusom [39], promene na nivou V1aR u ovoj studiji nisu uočene [84].

Periferni vazopresin i hipertenzija

Ljudi koji boluju od hipertenzije kao i genetski modifikovane hipertenzivne životinje imaju povećanu koncentraciju VP-a u plazmi. Takođe, njihovi krvni sudovi su osetljiviji na egzogeni VP [99,100]. Iako ovi podaci nisu direktan dokaz ušesća VP-a u porastu krvnog pritiska, promene na nivou perifernog VP-a koreliraju sa ozbiljnošću kliničke slike bolesti. Kada se vaskularni V1aR dugotrajno stimulišu agonistom, kod normotenzivnih životinja dolazi do razvoja hipertenzije [101,102]. VP nivo SHR-ova Okamoto-Aoki soja u cirkulaciji je povećan, a upotreba VP-blokirajućih antitela i antagoniste vodi ka smanjenju krvnog pritiska [19,103]. U našim eksperimentima [84], netretirani BHR-ovi imali su povećan nivo VP-a u plazmi u odnosu na normotenzivne životinje. Pretpostavlja se da je visokoekspimiran V1bR, okidač pozitivne autokrine kontrole VP-a kod BHR-ova i doprinosi povećanju sinteze i sekrecije VP-a. Ova autokontrola je kompleksan proces i zasniva se na finom balansu inhibitornih i ekscitatornih efekata posredovanih V1aR i V1bR [104]. Ipak, kada se BHR-ovi izlože povećanom unosu soli i hroničnom stresu dolazi do dramatičnog pada koncentracije VP-a u plazmi, iako nivo V1bR ostaje nepromenjen [84]. Poznato je da stres stimuliše vazopresinski sistem, ali jaki emocionalni stresori, poput onih koji su korišćeni u našoj eksperimentalnoj postavci [84], mogu dovesti do blokade otpuštanja VP-a u plazmu [105,106]. Osim toga, kod ovih životinja došlo je do uvećanja perifernog simpatičkog pražnjenja, pa se može zaključiti da periferni VP nije imao doprinosa u razvoju hipertenzije [84].

Nisu sva vaskularna korita jednako osetljiva na dejstvo VP-a [107]. Potrebne su relativno velike koncentracije VP-a u plazmi, koje daleko premašuju fiziološke vrednosti (100 pg/ml) [108,109], kako bi VP izazvao presorni efekat. To je posledica aktivacije puferskih mehanizama, poput barorefleksa, koji se protive povećanju pritiska nasuprot uvećanju perifernog otpora, usled vazokonstrikcije. VP je snažniji aktivator barorefleksa u odnosu na druge vazokonstriktore. U animalnim modelima kod kojih je dotok informacija od baroreceptora prekinut, VP dozno-zavisno povećava pritisak [109]. Glavno mesto dejstva VP na aktivnost barorefleksa postiže se u nivou *area postrema* aktivacijom V1aR [110]. Eksperimentalne lezije *area postremae* ukidaju efekte perifernog VP-a na barorefleks [111]. Soj *Brattleboro* pacova koji ima deficijenciju VP-a odlikuje se značajno sniženom senzitivnošću barorefleksa [112]. Naši rezultati [84] pokazuju uvećanu senzitivnost barorefleksa, koja može biti posledica povećane sinteze i otpuštanja VP-a kod BHR pacova pod bazalnim uslovima [84]. Ovo bi mogao biti mehanizam koji krvni pritisak kod ovih životinja održava u graničnim vrednostima. Osim povećanja senzitivnosti barorefleksa, parametri koji doprinose očuvanje hipertenzije su resetovanje barorefleksa i pomeranje težišta njegovog rada, a ovaj fenomen je uočen i u našim eksperimentima [84].

ZAKLJUČAK

Dobro je poznata uloga VP-a u održanju osmotske i kardiovaskularne ravnoteže. Brojni podaci iz literature naglašavaju važnost vasopresinskog sistema paraventrikularnog jedra u kardioresenalnoj regulaciji i ističu doprinos ove kompleksne signalne mreže u razvoju hipertenzije. Neuroendokrini i autonomni deo paraventrikularnog jedra imaju dinamičnu ulogu u modulaciji cirkulacije u skladu sa fiziološkim zahtevima. To su potvrdili i rezultati našeg istraživanja, koji pokazuju da bi porast ekspresije VP-a i V1bR u paraventrikularnom jedru, mogao doprineti konstitutivno uvećanim vrednostima krvnog pritiska uočenim kod granično hipertenzivnih pacova. Takođe, povišen nivo VP-a u plazmi izaziva resetovanje i povećanje senzitivnosti barorefleksa, što puferuje promene na nivou krvnog pritiska i održava ih u graničnim vrednostima. Ipak, naši rezultati ne ukazuju da je nastanak hipertenzije kod granično hipertenzivnih životinja posledica promena u vazopresinskom sistemu paraventrikularnog jedra, već rezultat uvećanja simpatičkog pražnjenja ka kardioresenalnom sistemu. Oprečni podaci iz literature ističu potrebu za dodatnim ispitivanjima na

različitim eksperimentalnim modelima, u bazalnim i patološkim uslovima, kako bi se razjasnili mehanizmi unutar vazopresinskog sistema koji doprinose razvoju hipertenzije. Takođe, poznavanje ovih složenih vazopresinskih puteva, omogućilo bi razvoj efikasnijih lekova za lečenje hipertenzije, budući da je učinkovitost postojeće terapije vrlo mala.

ZAHVALNICA

Izrada ovog rada je omogućena zahvaljujući projektu Ministarstva nauke, tehnološkog razvoja i inovacija Republike Srbije broj 200110.

LITERATURA

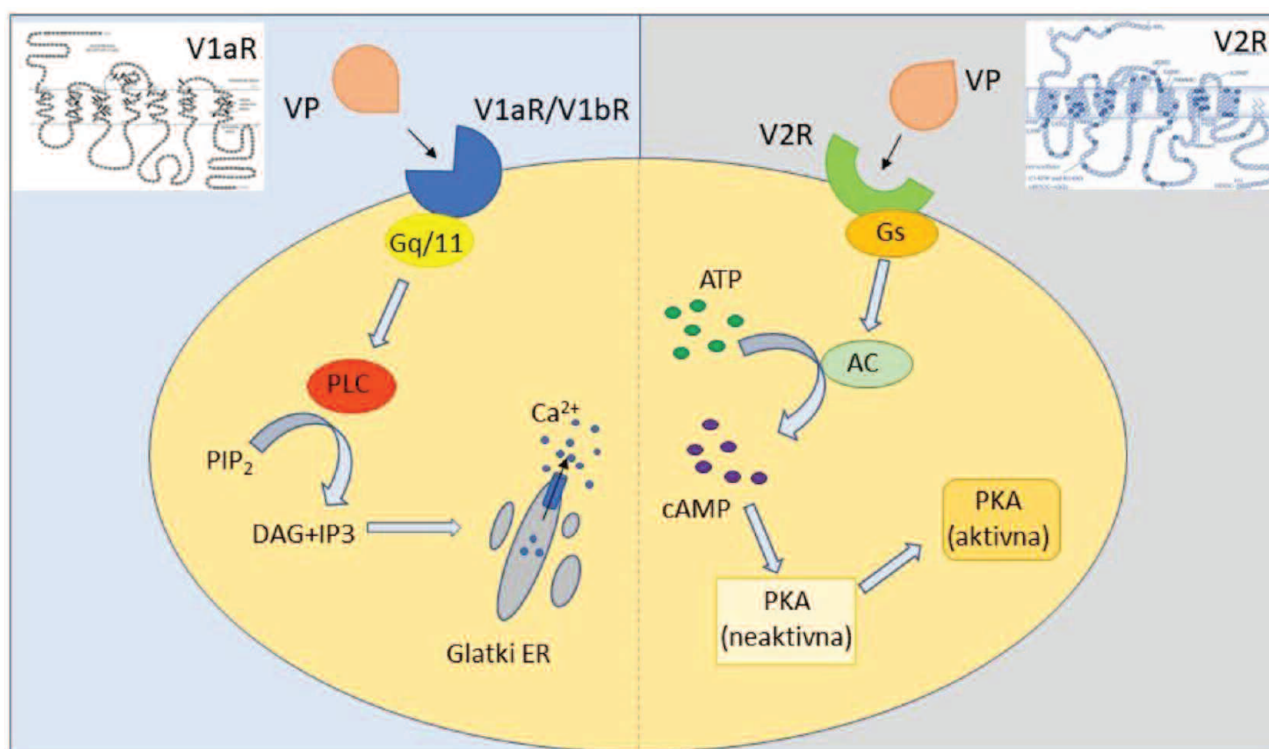
1. Japundžić-Žigon N, Lozić M, Šarenac O, Murphy D. Vasopressin & Oxytocin in Control of the Cardiovascular System: An Updated Review. *Curr Neuroparmacol*. 2020;18: 14–33.
2. Carretero OA, Oparil S. Essential Hypertension. *Circulation*. 2000. pp. 329–335. doi:10.1161/01.cir.101.3.329
3. Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure, National Institutes of Health (U.S.), Lenfant C, National Heart, Lung and Blood Institute. The Sixth Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. International Medical Pub; 1997.
4. Hypertension. [cited 15 Dec 2020]. Available: https://www.who.int/health-topics/hypertension/#tab=tab_1
5. Elliott WJ. Global Burden of Hypertension: Analysis of Worldwide Data. *Yearbook of Cardiology*. 2006. pp. 4–5. doi:10.1016/s0145-4145(07)70005-9
6. Center for Drug Evaluation, Research. High Blood Pressure–Understanding the Silent Killer. 12 Aug 2020 [cited 15 Dec 2020]. Available: <https://www.fda.gov/drugs/special-features/high-blood-pressure-understanding-silent-killer>
7. Feldman RD, Zou GY, Vandervoort MK, Wong CJ, Nelson SAE, Feagan BG. A Simplified Approach To The Treatment Of Uncomplicated Hypertension: A Cluster Randomized, Controlled Trial. *Hypertension*. 2009;53: 646–653.
8. Abstracts from 2020 national congress of the Italian Society of Hypertension (SIIA). *High Blood Press Cardiovasc Prev*. 2020;27: 421–492.
9. Burt VL, Whelton P, Roccella EJ, Brown C, Cutler JA, Higgins M, et al. Prevalence Of Hypertension In The Us Adult Population. Results from the Third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988–1991. *Hypertension*. 1995;25: 305–313.
10. Intersalt: An International Study Of Electrolyte Excretion And Blood Pressure. Results For 24 Hour Urinary Sodium And Potassium Excretion. Intersalt Cooperative Research Group. *BMJ*. 1988. pp. 319–328. doi:10.1136/bmj.297.6644.319
11. Sever PS, Poulter NR. A Hypothesis For The Pathogenesis Of Essential Hypertension: The Initiating Factors. *J Hypertens*. 1989;7: S9–S12.
12. Jeunemaitre X, Inoue I, Williams C, Charru A, Tichet J, Powers M, et al. Haplotypes of Angiotensinogen in Essential Hypertension. *The American Journal of Human Genetics*. 1997. pp. 1448–1460. doi:10.1086/515452
13. Johnston CI. Vasopressin In Circulatory Control And Hypertension. *J Hypertens*. 1985;3: 557–569.
14. Lifton RP. Molecular Genetics of Human Blood Pressure Variation. *Science*. 1996. pp. 676–680. doi:10.1126/science.272.5262.676
15. Mancia G, Grassi G, Giannattasio C, Seravalle G. Sympathetic Activation In The Pathogenesis Of Hypertension And Progression Of Organ Damage. *Hypertension*. 1999;34: 724–728.
16. Grassi G, Mark A, Esler M. The Sympathetic Nervous System Alterations in Human Hypertension. *Circulation Research*. 2015. pp. 976–990. doi:10.1161/circresaha.116.303604
17. Berecek KH, Webb RL, Brody MJ. Evidence For A Central Role For Vasopressin In Cardiovascular Regulation. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 1983. pp. H852–H859. doi:10.1152/ajpheart.1983.244.6.h852
18. Pittman QJ, Bagdan B. Chapter 11: Vasopressin Involvement In Central Control Of Blood Pressure. *Progress in Brain Research*. 1992. pp. 69–74. doi:10.1016/s0079-6123(08)62318-3
19. Crofton JT, Share L, Shade RE, Allen C, Tarnowski D. Vasopressin In The Rat With Spontaneous Hypertension. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 1978. pp. H361–H366. doi:10.1152/ajpheart.1978.235.4.h361
20. Savić B, Murphy D, Japundžić-Žigon N. The Paraventricular Nucleus of the Hypothalamus in Control of Blood Pressure and Blood Pressure Variability. *Front Physiol*. 2022;13: 858941.

21. Koshimizu T-A, Nakamura K, Egashira N, Hiroshima M, Nonoguchi H, Tanoue A. Vasopressin V1a And V1b Receptors: From Molecules To Physiological Systems. *Physiol Rev.* 2012;92: 1813–1864.
22. Innamorati G, Sadeghi H, Birnbaumer M. Transient Phosphorylation Of The V1a Vasopressin Receptor. *J Biol Chem.* 1998;273: 7155–7161.
23. Roper J, O'Carroll A-M, Young W 3rd, Lolait S. The Vasopressin Avp1b Receptor: Molecular And Pharmacological Studies. *Stress.* 2011;14: 98–115.
24. Landgraf R, Neumann ID. Vasopressin And Oxytocin Release Within The Brain: A Dynamic Concept Of Multiple And Variable Modes Of Neuropeptide Communication. *Frontiers in Neuroendocrinology.* 2004. pp. 150–176. doi:10.1016/j.yfrne.2004.05.001
25. Milano S, Carmosino M, Gerbino A, Svelto M, Procino G. Hereditary Nephrogenic Diabetes Insipidus: Pathophysiology and Possible Treatment. An Update. *Int J Mol Sci.* 2017;18. doi:10.3390/ijms18112385
26. Pierce KL, Lefkowitz RJ. Classical And New Roles Of B-Arrestins In The Regulation Of G-Protein-Coupled Receptors. *Nature Reviews Neuroscience.* 2001. pp. 727–733. doi:10.1038/35094577
27. Gainetdinov RR, Premont RT, Bohn LM, Lefkowitz RJ, Caron MG. Desensitization Of G Protein-Coupled Receptors And Neuronal Functions. *Annual Review of Neuroscience.* 2004. pp. 107–144. doi:10.1146/annurev.neuro.27.070203.144206
28. von Zastrow M, von Zastrow M, Williams JT. Modulating Neuromodulation by Receptor Membrane Traffic in the Endocytic Pathway. *Neuron.* 2012. pp. 22–32. doi:10.1016/j.neuron.2012.09.022
29. Innamorati G, Sadeghi HM, Tran NT, Birnbaumer M. A Serine Cluster Prevents Recycling Of The V2 Vasopressin Receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95: 2222–2226.
30. Kashiwazaki A, Fujiwara Y, Tsuchiya H, Sakai N, Shibata K, Koshimizu T-A. Subcellular Localization And Internalization Of The Vasopressin V1b Receptor. *European Journal of Pharmacology.* 2015. pp. 291–299. doi:10.1016/j.ejphar.2015.08.043
31. Tsao PI, von Zastrow M. Type-specific Sorting of G Protein-coupled Receptors after Endocytosis. *Journal of Biological Chemistry.* 2000. pp. 11130–11140. doi:10.1074/jbc.275.15.11130
32. Bonifacino JS, Traub LM. Signals for Sorting of Transmembrane Proteins to Endosomes and Lysosomes. *Annual Review of Biochemistry.* 2003. pp. 395–447. doi:10.1146/annurev.biochem.72.121801.161800
33. Pyner S. Neurochemistry Of The Paraventricular Nucleus Of The Hypothalamus: Implications For Cardiovascular Regulation. *J Chem Neuroanat.* 2009;38: 197–208.
34. Badoer E. Proceedings of the Australian Physiological and Pharmacological Society Symposium: The Hypothalamus Hypothalamic Paraventricular Nucleus And Cardiovascular Regulation. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology.* 2001. pp. 95–99. doi:10.1046/j.1440-1681.2001.03413.x
35. Sawchenko PE, Swanson LW. Immunohistochemical Identification Of Neurons In The Paraventricular Nucleus Of The Hypothalamus That Project To The Medulla Or To The Spinal Cord In The Rat. *The Journal of Comparative Neurology.* 1982. pp. 260–272. doi:10.1002/cne.902050306
36. Swanson LW, Sawchenko PE. Hypothalamic Integration: Organization Of The Paraventricular And Supraoptic Nuclei. *Annu Rev Neurosci.* 1983;6: 269–324.
37. Sladek CD, Michelini LC, Stachenfeld NS, Stern JE, Urban JH. Endocrine-Autonomic Linkages. *Compr Physiol.* 2015;5: 1281–1323.
38. Son SJ, Filosa JA, Potapenko ES, Biancardi VC, Zheng H, Patel KP, et al. Dendritic Peptide Release Mediates Interpopulation Crosstalk Between Neurosecretory And Preautonomic Networks. *Neuron.* 2013;78: 1036–1049.
39. Stern JE, Filosa JA. Bidirectional Neuro-Glial Signaling Modalities In The Hypothalamus: Role In Neurohumoral Regulation. *Auton Neurosci.* 2013;175: 51–60.
40. Burbach JP, Van Tol HH, Bakkus MH, Schmale H, Ivell R. Quantitation Of Vasopressin Mrna And Oxytocin Mrna In Hypothalamic Nuclei By Solution Hybridization Assays. *J Neurochem.* 1986;47: 1814–1821.
41. Benarroch EE. Paraventricular Nucleus, Stress Response, And Cardiovascular Disease. *Clinical Autonomic Research.* 2005. pp. 254–263. doi:10.1007/s10286-005-0290-7
42. Nordmann JJ, Morris JF. Method For Quantitating The Molecular Content Of A Subcellular Organelle: Hormone And Neuropeptide Content Of Newly Formed And Aged Neurosecretory Granules. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1984;81: 180–184.
43. Altura BM, Altura BT. Actions Of Vasopressin, Oxytocin, And Synthetic Analogs On Vascular Smooth Muscle. *Fed Proc.* 1984;43: 80–86.
44. Bankir L. Antidiuretic Action Of Vasopressin: Quantitative Aspects And Interaction Between V1a And V2 Receptor-Mediated Effects. *Cardiovasc Res.* 2001;51: 372–390.

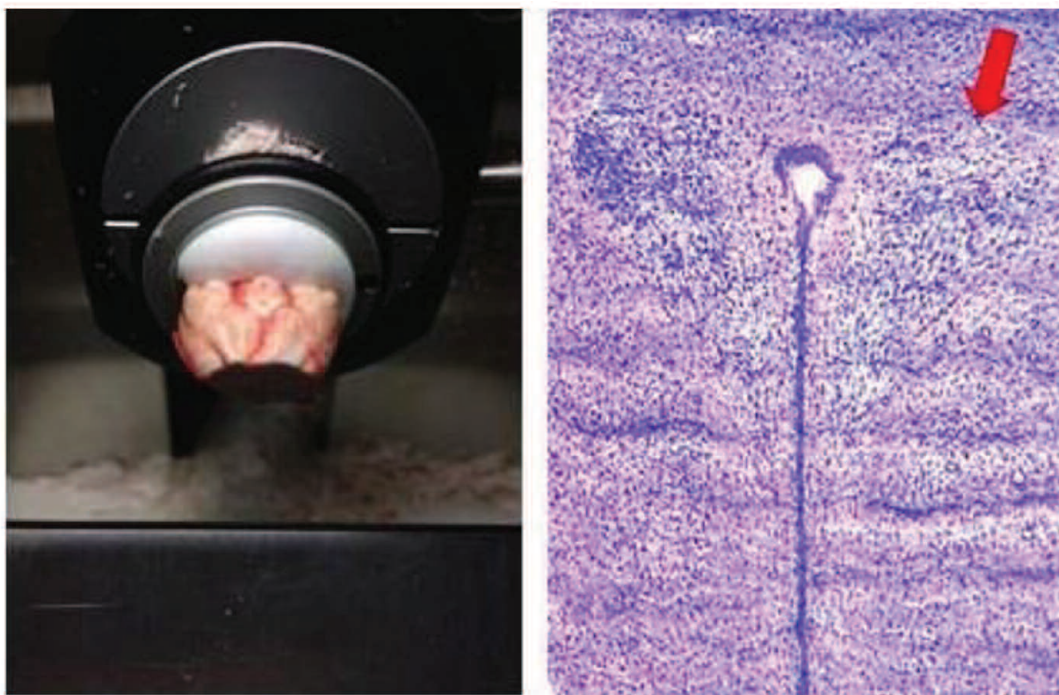
45. Ludwig M, Callahan MF, Morris M. Effects Of Tetrodotoxin On Osmotically Stimulated Central And Peripheral Vasopressin And Oxytocin Release. *Neuroendocrinology*. 1995;62: 619–627.
46. Hurbin A, Orcel H, Alonso G, Moos F, Rabié A. The Vasopressin Receptors Colocalize With Vasopressin In The Magnocellular Neurons Of The Rat Supraoptic Nucleus And Are Modulated By Water Balance. *Endocrinology*. 2002;143: 456–466.
47. Wotjak CT, Naruo T, Muraoka S, Simchen R, Landgraf R, Engelmann M. Forced Swimming Stimulates The Expression Of Vasopressin And Oxytocin In Magnocellular Neurons Of The Rat Hypothalamic Paraventricular Nucleus. *Eur J Neurosci*. 2001;13: 2273–2281.
48. Gouzènes L, Desarménien MG, Hussy N, Richard P, Moos FC. Vasopressin Regularizes The Phasic Firing Pattern Of Rat Hypothalamic Magnocellular Vasopressin Neurons. *J Neurosci*. 1998;18: 1879–1885.
49. Rivier C, Vale W. Interaction of Corticotropin-Releasing Factor and Arginine Vasopressin on Adrenocorticotropin Secretion in Vivo*. *Endocrinology*. 1983. pp. 939–942. doi:10.1210/endo-113-3-939
50. Swanson LW, Sawchenko PE. Hypothalamic Integration: Organization Of The Paraventricular And Supraoptic Nuclei. *Annu Rev Neurosci*. 1983;6: 269–324.
51. Aguilera G. Regulation of Pituitary ACTH Secretion during Chronic Stress. *Frontiers in Neuroendocrinology*. 1994. pp. 321–350. doi:10.1006/frne.1994.1013
52. Myers B, McKlveen JM, Herman JP. Neural Regulation of the Stress Response: The Many Faces of Feedback. *Cell Mol Neurobiol*. 2012. doi:10.1007/s10571-012-9801-y
53. Sladek CD, Michelini LC, Stachenfeld NS, Stern JE, Urban JH. Endocrine-Autonomic Linkages. *Compr Physiol*. 2015;5: 1281–1323.
54. Kelly JJ, Mangos G, Williamson PM, Whitworth JA. Cortisol And Hypertension. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. 1998. pp. S51–S56. doi:10.1111/j.1440-1681.1998.tb02301.x
55. Wang LA, Nguyen DH, Mifflin SW. Corticotropin-Releasing Hormone Projections From The Paraventricular Nucleus Of The Hypothalamus To The Nucleus Of The Solitary Tract Increase Blood Pressure. *J Neurophysiol*. 2019;121: 602–608.
56. Dampney RA, Michelini LC, Li D-P, Pan H-L. Regulation Of Sympathetic Vasomotor Activity By The Hypothalamic Paraventricular Nucleus In Normotensive And Hypertensive States. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2018;315: H1200–H1214.
57. Stern JE. Electrophysiological And Morphological Properties Of Pre-Autonomic Neurones In The Rat Hypothalamic Paraventricular Nucleus. *J Physiol*. 2001;537: 161–177.
58. Nunn N, Womack M, Dart C, Barrett-Jolley R. Function And Pharmacology Of Spinally-Projecting Sympathetic Pre-Autonomic Neurones In The Paraventricular Nucleus Of The Hypothalamus. *Curr Neuroparmacol*. 2011;9: 262–277.
59. Coote JH. A Role For The Paraventricular Nucleus Of The Hypothalamus In The Autonomic Control Of Heart And Kidney. *Experimental Physiology*. 2005. pp. 169–173. doi:10.1113/expphysiol.2004.029041
60. Strack AM, Sawyer WB, Hughes JH, Platt KB, Loewy AD. A General Pattern Of CNS Innervation Of The Sympathetic Outflow Demonstrated By Transneuronal Pseudorabies Viral Infections. *Brain Research*. 1989. pp. 156–162. doi:10.1016/0006-8993(89)90098-x
61. Loewy AD. Forebrain Nuclei Involved In Autonomic Control. *Prog Brain Res*. 1991;87: 253–268.
62. Szczepanska-Sadowska E. Role Of Neuropeptides In Central Control Of Cardiovascular Responses To Stress. *J Physiol Pharmacol*. 2008;59 Suppl 8: 61–89.
63. Ludwig M, Stern J. Multiple Signalling Modalities Mediated By Dendritic Exocytosis Of Oxytocin And Vasopressin. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2015;370. doi:10.1098/rstb.2014.0182
64. Son SJ, Filosa JA, Potapenko ES, Biancardi VC, Zheng H, Patel KP, et al. Dendritic Peptide Release Mediates Interpopulation Crosstalk Between Neurosecretory And Preautonomic Networks. *Neuron*. 2013;78: 1036–1049.
65. Swanson LW, Sawchenko PE. Paraventricular Nucleus: A Site For The Integration Of Neuroendocrine And Autonomic Mechanisms. *Neuroendocrinology*. 1980;31: 410–417.
66. El-Werfali W, Toomasian C, Maliszewska-Scislo M, Li C, Rossi NF. Haemodynamic And Renal Sympathetic Responses To V1b Vasopressin Receptor Activation Within The Paraventricular Nucleus. *Exp Physiol*. 2015;100: 553–565.
67. Leng G, Brown CH, Russell JA. Physiological Pathways Regulating The Activity Of Magnocellular Neurosecretory Cells. *Prog Neurobiol*. 1999;57: 625–655.
68. Bourque CW. Central Mechanisms Of Osmosensation And Systemic Osmoregulation. *Nat Rev Neurosci*. 2008;9: 519–531.
69. Ribeiro N, Panizza H do N, Santos KMD, Ferreira-Neto HC, Antunes VR. Salt-Induced Sympathoexcitation Involves Vasopressin V1a Receptor Activation In The Paraventricular Nucleus Of The Hypothalamus. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2015;309: R1369–79.

70. McKinley MJ, Allen AM, May CN, McAllen RM, Oldfield BJ, Sly D, et al. Neural Pathways From The Lamina Terminalis Influencing Cardiovascular And Body Fluid Homeostasis. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2001;28: 990–992.
71. Cunningham ET Jr, Sawchenko PE. Reflex Control Of Magnocellular Vasopressin And Oxytocin Secretion. *Trends Neurosci*. 1991;14: 406–411.
72. Leng G, Blackburn RE, Dyball REJ, Russell JA. Role of Anterior Peri-Third Ventricular Structures in the Regulation of Supraoptic Neuronal Activity and Neurohypophyseal Hormone Secretion in the Rat. *Journal of Neuroendocrinology*. 1989. pp. 35–46. doi:10.1111/j.1365-2826.1989.tb00074.x
73. Oliet SH, Bourque CW. Mechanosensitive Channels Transduce Osmosensitivity In Supraoptic Neurons. *Nature*. 1993;364: 341–343.
74. Dampney RAL. Resetting of the Baroreflex Control of Sympathetic Vasomotor Activity during Natural Behaviors: Description and Conceptual Model of Central Mechanisms. *Front Neurosci*. 2017;11: 461.
75. Hassler EM, Bishop VS, Hay M. Interactions Between Vasopressin And Baroreflex Control Of The Sympathetic Nervous System. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. 1997. pp. 102–108. doi:10.1111/j.1440-1681.1997.tb01791.x
76. Landgraf R, Wotjak CT, Neumann ID, Engelmann M. Release Of Vasopressin Within The Brain Contributes To Neuroendocrine And Behavioral Regulation. *Progress in Brain Research*. 1999. pp. 201–220. doi:10.1016/s0079-6123(08)61571-x
77. Milik E, Szczepanska-Sadowska E, Dobruch J, Cudnoch-Jedrzejewska A, Maslinski W. Altered Expression Of V1a Receptors Mrna In The Brain And Kidney After Myocardial Infarction And Chronic Stress. *Neuropeptides*. 2014;48: 257–266.
78. Savić B, Brkljačić J, Glumac S, Šarenac O, Murphy D, Blagojević D, et al. Effects Of Salt And Stress On Blood Pressure Parameters And Antioxidant Enzyme Function In The Heart And Aorta Of Borderline Hypertensive Rats. *Exp Physiol*. 2023. doi:10.1113/EP090714
79. Zicha J, Kunes J. Ontogenetic Aspects Of Hypertension Development: Analysis In The Rat. *Physiol Rev*. 1999;79: 1227–1282.
80. Limas C, Westrum B, Limas CJ. The Evolution Of Vascular Changes In The Spontaneously Hypertensive Rat. *Am J Pathol*. 1980;98: 357–384.
81. Williams B, Mancia G, Spiering W, Agabiti Rosei E, Azizi M, Burnier M, et al. 2018 ESC/ESH Guidelines for the management of arterial hypertension: The Task Force for the management of arterial hypertension of the European Society of Cardiology and the European Society of Hypertension: The Task Force for the management of arterial hypertension of the European Society of Cardiology and the European Society of Hypertension. *J Hypertens*. 2018;36: 1953–2041.
82. Púzserová A, Kopincová J, Slezák P, Bališ P, Bernátová I. Endothelial Dysfunction In Femoral Artery Of The Hypertensive Rats Is Nitric Oxide Independent. *Physiol Res*. 2013;62: 615–629.
83. Sanders BJ, Lawler JE. The Borderline Hypertensive Rat (BHR) As A Model For Environmentally-Induced Hypertension: A Review And Update. *Neurosci Biobehav Rev*. 1992;16: 207–217.
84. Savić B, Martin A, Mecawi AS, Bukumirić Z, Antunes-Rodrigues J, Murphy D, et al. Vasopressin And V1br Gene Expression Is Increased In The Hypothalamic Pvn Of Borderline Hypertensive Rats. *Hypertens Res*. 2020;43: 1165–1174.
85. Mancia G, Laurent S, Agabiti-Rosei E, Ambrosioni E, Burnier M, Caulfield MJ, et al. Reappraisal of European guidelines on hypertension management: a European Society of Hypertension Task Force document. *Blood Press*. 2009;18: 308–347.
86. Sofroniew MV, Weindl A. Projections From The Parvocellular Vasopressin- And Neurophysin-Containing Neurons Of The Suprachiasmatic Nucleus. *American Journal of Anatomy*. 1978. pp. 391–429. doi:10.1002/aja.1001530305
87. Buijs RM. Intra- And Extrahypothalamic Vasopressin And Oxytocin Pathways In The Rat. *Cell and Tissue Research*. 1978. doi:10.1007/bf00212323
88. Nilaver G, Zimmerman EA, Wilkins J, Michaels J, Hoffman D, Silverman A-J. Magnocellular Hypothalamic Projections to the Lower Brain Stem and Spinal Cord of the Rat. *Neuroendocrinology*. 1980. pp. 150–158. doi:10.1159/000122991
89. Rascher W, Lang RE, Unger T, Ganten D, Gross F. Vasopressin In Brain Of Spontaneously Hypertensive Rats. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 1982. pp. H496–H499. doi:10.1152/ajpheart.1982.242.4.h496
90. Lang RE, Rascher W, Unger T, Ganten D. Reduced Content Of Vasopressin In The Brain Of Spontaneously Hypertensive As Compared To Normotensive Rats. *Neuroscience Letters*. 1981. pp. 199–202. doi:10.1016/0304-3940(81)90040-9
91. Morris M, Keller M, Sundberg DK. Changes In Paraventricular Vasopressin And Oxytocin During The Development Of Spontaneous Hypertension. *Hypertension*. 1983;5: 476–481.
92. Yi SS, Kim H-J, Do S-G, Lee Y-B, Ahn HJ, Hwang IK, et al. Arginine Vasopressin (AVP) Expressional Changes In The Hypothalamic Paraventricular And Supraoptic Nuclei Of Stroke-Prone Spontaneously Hypertensive Rats. *Anatomy & Cell Biology*. 2012. p. 114. doi:10.5115/acb.2012.45.2.114

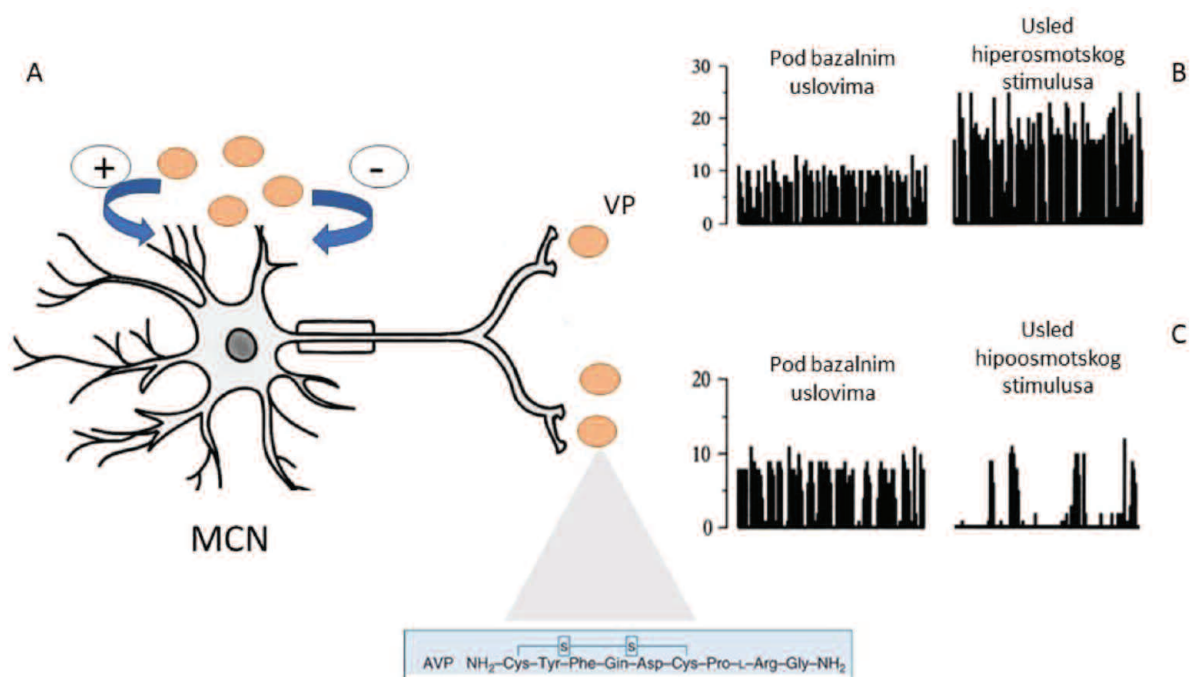
93. van Tol HH, van den Buuse M, de Jong W, Burbach JP. Vasopressin And Oxytocin Gene Expression In The Supraoptic And Paraventricular Nucleus Of The Spontaneously Hypertensive Rat (SHR) During Development Of Hypertension. *Brain Res.* 1988;464: 303–311.
94. Ciriello J, Kline RL, Zhang TX, Caverson MM. Lesions Of The Paraventricular Nucleus Alter The Development Of Spontaneous Hypertension In The Rat. *Brain Res.* 1984;310: 355–359.
95. Jackiewicz E, Szczepanska-Sadowska E, Dobruch J. Altered Expression Of Angiotensin AT1a And Vasopressin V1a Receptors And Nitric Oxide Synthase mRNA In The Brain Of Rats With Renovascular Hypertension. *J Physiol Pharmacol.* 2004;55: 725–737.
96. Szczepańska-Sadowska E, Paczwa P, Loń S, Ganten D. Increased Pressor Function Of Central Vasopressinergic System In Hypertensive Renin Transgenic Rats. *J Hypertens.* 1998;16: 1505–1514.
97. Swords BH, Michael Wyss J, Berecek KH. Central Vasopressin Receptors Are Upregulated By Deoxycorticosterone Acetate. *Brain Research.* 1991. pp. 10–16. doi:10.1016/0006-8993(91)90280-9
98. Berlove DJ, Piekut DT. Co-Localization Of Putative Vasopressin Receptors And Vasopressinergic Neurons In Rat Hypothalamus. *Histochemistry.* 1990;94: 653–657.
99. Johnston CI. Vasopressin in circulatory control and hypertension. *J Hypertens.* 1985;3: 557–569.
100. Mohring J, Kintz J, Schoun J, Robert McNeill J. Pressor Responsiveness and Cardiovascular Reflex Activity in Spontaneously Hypertensive and Normotensive Rats During Vasopressin Infusion. *Journal of Cardiovascular Pharmacology.* 1981. pp. 948–957. doi:10.1097/00005344-198109000-00004
101. Cowley AW Jr, Szczepanska-Sadowska E, Stepniakowski K, Mattson D. Chronic Intravenous Administration Of V1 Arginine Vasopressin Agonist Results In Sustained Hypertension. *Am J Physiol.* 1994;267: H751–6.
102. Szczepanska-Sadowska E, Stepniakowski K, Skelton MM, Cowley AW Jr. Prolonged Stimulation Of Intrarenal V1 Vasopressin Receptors Results In Sustained Hypertension. *Am J Physiol.* 1994;267: R1217–25.
103. Möhring J, Kintz J, Schoun J. Studies On The Role Of Vasopressin In Blood Pressure Control Of Spontaneously Hypertensive Rats With Established Hypertension (SHR, stroke-prone strain). *J Cardiovasc Pharmacol.* 1979;1: 593–608.
104. Hurbin A, Boissin-Agasse L, Orcel H, Rabié A, Joux N, Desarménien MG, et al. The V1a And V1b, But Not V2, Vasopressin Receptor Genes Are Expressed In The Supraoptic Nucleus Of The Rat Hypothalamus, And The Transcripts Are Essentially Colocalized In The Vasopressinergic Magnocellular Neurons. *Endocrinology.* 1998;139: 4701–4707.
105. Yagi K, Onaka T. Suppressive Vasopressin Response To Emotional Stress: The Neuroactive Substance That May Be Involved. *Ann N Y Acad Sci.* 1993;689: 685–688.
106. Aguilera G, Subburaju S, Young S, Chen J. The Parvocellular Vasopressinergic System And Responsiveness Of The Hypothalamic Pituitary Adrenal Axis During Chronic Stress. *Prog Brain Res.* 2008;170: 29–39.
107. Liard JF. Vasopressin in cardiovascular control: role of circulating vasopressin. *Clin Sci.* 1984;67: 473–481.
108. Pullan PT, Johnston CI, Anderson WP, Korner PI. Plasma Vasopressin In Blood Pressure Homeostasis And In Experimental Renal Hypertension. *Am J Physiol.* 1980;239: H81–7.
109. Cowley AW Jr, Monos E, Guyton AC. Interaction Of Vasopressin And The Baroreceptor Reflex System In The Regulation Of Arterial Blood Pressure In The Dog. *Circ Res.* 1974;34: 505–514.
110. Brizzee BL, Walker BR. Vasopressinergic Augmentation Of Cardiac Baroreceptor Reflex In Conscious Rats. *Am J Physiol.* 1990;258: R860–8.
111. Hasser EM, Bishop VS, Hay M. Interactions Between Vasopressin And Baroreflex Control Of The Sympathetic Nervous System. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 1997;24: 102–108.
112. Imai Y, Nolan PL, Johnston CI. Restoration Of Suppressed Baroreflex Sensitivity In Rats With Hereditary Diabetes Insipidus (Brattleboro Rats) By Arginine-Vasopressin And DDAVP. *Circ Res.* 1983;53: 140–149.
113. Ripoll GV, Pifano M, Garona J, Alonso DF. Commentary: Arginine Vasopressin Receptor 1a Is A Therapeutic Target For Castration-Resistant Prostate Cancer. *Frontiers in oncology.* 2019. p. 1490.
114. Hussy N, Deleuze C, Desarménien MG, Moos FC. Osmotic Regulation Of Neuronal Activity: A New Role For Taurine And Glial Cells In A Hypothalamic Neuroendocrine Structure. *Prog Neurobiol.* 2000;62: 113–134.



Slika 1. Signalna kaskada vazopresinskih receptora. VP – vazopresin; V1aR/V1bR – vazopresinski receptor tipa 1a/1b; V2R – vazopresinski receptor tipa 2; Gq/11 i Gs – subjedinice G proteina; PLC – fosfolipaza C; PIP₂ – fosfadiliinozitol-4,5-bisfosfat; IP3 – inozitol-3,4,5-trifosfat; AC – adenilat ciklaza; ATP – adenozin trifosfat; cAMP – ciklični adenozin monofosfat; PKA – protein kinaza A. Slika preuzeta iz doktorske disertacije Savić, 2021 i modifikovano iz Ripoll *et al*, 2019 [113].



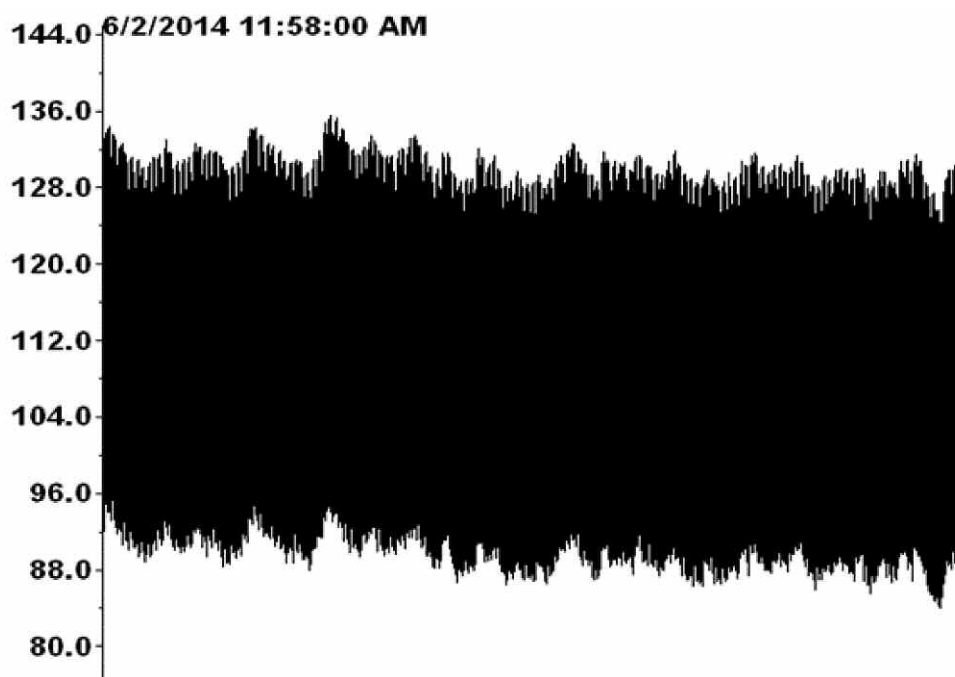
Slika 2. Uzorkovanje mikroisečaka mozga pacova na kriostatatu (levo) i izgled paraventrikularnog jedra pod mikroskopom, bojeno toulidin plavim (desno). Slika preuzeta iz doktorske disertacije Savić, 2021.



Slika 3. Autokrino dejstvo VP-a na fazni obrazac aktivacije.



Slika 4. BHR pacov tokom izlaganja hroničnom stresu usmerenim protokom vazduha u teme.



Slika 5. Softverski prikaz (*Dataquest A.R.T.4.0. Softver*; DSI, Transoma Medical) arterijskog pulsog pritika BHR pacova zabežen radiotelemetrijskim sistemom za kontinuirano merenje krvnog pritiska kod sitnih životinja (DSI, Transoma Medical, St Paul, MN, USA).

Antioksidativni i antiinflamatorni efekti suplementacije orasima (*Juglans regia* L.) na srce u metaboličkom sindromu izazvanom ishranom bogatom fruktozom

Maja Bubić, Maja Živković

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

Kontakt: majab@vinca.rs

Apstrakt

Povećana konzumacija fruktoze kroz industrijsku hranu doprinosi razvoju metaboličkog sindroma (MetS) koji prati hronična inflamacija niskog intenziteta, oksidativni stres i aktivacija renin-angiotenzin sistema (RAS). Orasi su bogat izvor antioksidanasa i polinezasićenih n-3 masnih kiselina sa antiinflamatornim efektima.

Na životinjskom modelu MetS-a je pokazano da suplementacija orasima ima zaštitni efekat na srce kroz smanjenje odnosa n-6/n-3 masnih kiselina i povećanje nivoa angiotenzin konvertujućeg enzima 2 (ACE2), kardioprotektivne komponente RAS-a. Orasi u srcu deluju protektivno i na antioksidativnu osu SIRT1-FoxO3a-MnSOD/katalaza, koja je kompromitovana ishranom bogatom fruktozom. Ulogu negativnih regulatora ove ose, Nox4 i ChREBP, u srcu treba dodatno ispitati kako bi se utvrdio njihov potencijal u nutritivnoj terapiji.

Dosadašnja istraživanja su potvrdila korisne efekte konzumacije oraha na kardiometaboličko zdravlje i predložila molekularne mehanizme u srcu koji leže u osnovi njihovih antiinflamatornih i antioksidativnih efekata koji mogu poništiti štetne efekte ishrane bogate fruktozom. Translacioni potencijal istraživanja ukazuje na mogućnost razvoja novih, nefarmakoloških pristupa u terapiji kardiometaboličkih bolesti.

Ključne reči: metabolički sindrom, orasi, SIRT1-FoxO3a-MnSOD/katalaza, renin-angiotenzin sistem, NF- κ B, masne kiseline

Antioxidative and antiinflammatory effects of walnut supplementation (*Juglans regia* L.) on heart with fructose-rich diet-induced metabolic syndrome

Maja Bubić, Maja Živković

“Vinča” Institute of Nuclear Sciences - National Institute of the Republic of Serbia, University of Belgrade, Laboratory for Radiobiology and Molecular Genetics, Belgrade

Correspondence: majab@vinca.rs

Abstract

Increased fructose intake via industrial food is associated with metabolic syndrome (MetS) which is characterized by chronic low-intensity inflammation, oxidative stress and activation of the renin-angiotensin system (RAS). Walnuts are a rich source of antioxidants and polyunsaturated n-3 fatty acids that exert anti-inflammatory effects.

Walnut supplementation in an animal model of MetS has been shown to have a protective effect on the heart through a reduction of n-6/n-3 fatty acid ratio and an increase of angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) level, a cardioprotective component of the RAS. Walnut consumption also showed a protective effect on the antioxidative axis SIRT1-FoxO3a-MnSOD/catalase in the heart, which was compromised by fructose-rich diet. The role of the negative regulators of this axis, Nox4 and ChREBP, in the heart should be further investigated to determine their nutritional therapy potential.

Previous studies confirmed the beneficial effects of walnut consumption on cardiometabolic health and proposed the molecular mechanisms underlying their anti-inflammatory and antioxidative effects in the heart, which could reverse the harmful effects of fructose-rich diet. The translational potential of the research indicates the possibility for development of novel, nutritional, non-pharmacological approaches in cardiometabolic disease therapy.

Key words: metabolic syndrome, walnuts, SIRT1-FoxO3a-MnSOD/catalase, renin-angiotensin system, NF- κ B, fatty acids

Uvod

Povećana konzumacija fruktoze kao nezaobilazne komponente savremenog načina ishrane ima ključnu ulogu u nastanku metaboličkog sindroma (MetS) [1]. To je skup metaboličkih poremećaja koji obuhvata abdominalnu gojaznost, insulinsku rezistenciju, hiperinsulinemiju, hipertenziju i dislipidemiju. MetS prethodi razvoju dijabetesa tipa 2 (T2D) i kardiovaskularnih bolesti (KVB), čime postaje glavni zdravstveni problem u svetu [2]. Istraživanja su pokazala da MetS prati hronična inflamacija niskog intenziteta, oksidativni stres i aktivacija renin-angiotenzin sistema (RAS). Razvoju MetS-a doprinosi interakcija genetskih determinanti i faktora životne sredine, uključujući ishranu [3], pa intervencije u načinu ishrane predstavljaju važan deo strategije za sprečavanje MetS-a. Orasi su bogat izvor antioksidanasa i omega-3 masnih kiselina sa antiinflamatornim efektima, pa se smatraju korisnim suplementom u ishrani, sa potencijalom poboljšanja metaboličkog statusa narušenog savremenim načinom ishrane u kojoj dominira visok sadržaj fruktoze. Cilj ovog revijskog rada jeste da sumira antioksidativne i antiinflamatorne efekte suplementacije orasima na srce u MetS-u izazvanom ishranom sa visokim sadržajem fruktoze.

Ishrana bogata fruktozom i metabolički sindrom

Konzumacija fruktoze iz njenih prirodnih izvora (voće, povrće i med) je umerena i ne izaziva značajne metaboličke promene. Međutim, istraživanja su pokazala da dramatičan porast konzumacije fruktoze u obliku kukuruznog sirupa sa visokim sadržajem fruktoze (engl. *High Fructose Corn Syrup*, HFCS, 42-90% fruktoze) koji je zastupljen u gotovo svim industrijskim proizvodima, predstavlja glavni uzrok razvoja metaboličkih poremećaja [1]. Prema podacima Svetske zdravstvene organizacije od 1975., kada je HFCS ušao u industrijsku upotrebu, pa do 2016. godine, prevalenca gojazne dece i adolescenata od 5–19 godina povećala se više od 4 puta, od 4% do 18% na globalnom nivou.

Glukoza predstavlja primarni izvor energije u svim ćelijama u kojima je njen metabolizam strogo regulisan usled negativne povratne sprege ključnog enzima glikolize, fosfofruktokinaze (Slika 1.). Metabolizam fruktoze je, međutim, gotovo neregulisan i odvija se najvećim delom u jetri, što je sa evolucionog stanovišta opravdano zanemarljivom upotrebom slobodne fruktoze u ishrani naših predaka. Fruktoza ulazi u glikolitički put zaobilazeći negativnu povratnu spregu fosfofruktokinaze, što za posledicu ima neograničen ulazak fruktoze u ovaj proces, akumulaciju fosforilanih supstrata i veliku potrošnju ATP-a, rezultujući nastankom urične kiseline. Osim toga, fruktoza zaobilazi kontrolu apetita posredstvom centara u hipotalamusu jer, za razliku od glukoze, ona ne stimuliše lučenje insulina koji reguliše nivo glukoze u krvi putem negativne povratne sprege.

Fruktoza doprinosi razvoju metaboličkih poremećaja i stimulacijom *de novo* lipogeneze. Naime, značajan deo fruktoznih metabolita koji se ne iskoristi kao izvor energije u ćelijama u vidu glukoze i laktata ili se ne skladišti u vidu glikogena u jetri, može biti iskorišćen za sintezu masnih kiselina. Ove masne kiseline dospevaju u cirkulaciju odakle ih intenzivno preuzimaju masno tkivo, skeletni mišići i srce kada su energetske potrebe organizma povećane, što dovodi do taloženja lipidnih intermedijera i nastanka insulinske rezistencije (IR) u ovim tkivima. Usled poremećaja u insulinskom delovanju, dolazi do intenzivne lipolize i oslobađanja masnih kiselina u plazmu. Dakle, glavne posledice metabolizma fruktoze su povećana koncentracija slobodnih masnih kiselina (SMK) i urične kiseline u cirkulaciji, kao i hiperглиkemija i posledična hiperinsulinemija usled nastanka IR.

U cilju kreiranja životinjskog modela MetS-a, koriste se različite koncentracije i načini administracije fruktoze, kao i dužina trajanja tretmana, što uzrokuje pojavu različitih karakteristika MetS-a [4]. Najčešće se u ove svrhe koristi laboratorijski pacov soja Wistar koji se podvrgava ishrani obogaćenoj 10% ili 20%

rastvorom fruktoze [5], čime se oponaša savremeni način ishrane. Rezultati ovakvih studija kod mladih pacova su od naročito značaja s obzirom da su adolescenti najveći konzumenti industrijskih napitaka i hrane zaslađene sa HFCS, što uzrokuje pojavu metaboličkih poremećaja u ranom životnom dobu povećavajući rizik i za raniji razvoj T2D i KVB [6]. Stoga, preporuke u načinu ishrane u mlađoj populaciji mogu biti korisne kako u prevenciji, tako i u tretmanu MetS-a i bolesti asociranih sa MetS-om.

Metabolička inflamacija

MetS se karakteriše hroničnom inflamacijom niskog intenziteta koja se označava kao metabolička inflamacija ili metainflamacija. Ona je uzrokovana prekomernim unosom hranljivih materija, a razlikuje se od akutne ili hronične inflamacije podstaknute infekcijom ili autoimunošću [7].

Lokalizovana inflamacija uzrokovana prekomernim unosom hranljivih materija započinje u adipoznom tkivu i pokreće sistemsku inflamaciju preko brojnih adipocitokina koji se oslobađaju iz nekrotičnih adipocita i putem cirkulacije dospevaju u druga insulin-zavisna tkiva (jetra, mišići, srce) [8] izazivajući infiltraciju imunskih ćelija u ova tkiva [9], čime se ostvaruje veza između MetS-a, inflamacije i bolesti asociranih sa MetS-om. U stanju narušene metaboličke ravnoteže, hiperoksidacija masti i ugljenih hidrata u mitohondrijama dovodi do nastanka reaktivnih vrsta kiseonika (RVK) koje stimulišu aktivnost inflamatornih kinaza, pa oksidativni stres doprinosi razvoju metainflamacije. Sa druge strane, metainflamacija prethodi razvoju IR koja leži u osnovi MetS-a.

U fiziološkim uslovima, energija potrebna za rad srčanog mišića dobija se najvećim delom oksidacijom masnih kiselina dugih lanaca, i u manjoj meri oksidacijom glukoze i laktata [10]. Kardiomiociti ekspresiraju fruktoza-specifični GLUT5 transporter, pa u malom procentu mogu koristiti i fruktozu kao energetski supstrat. Najveći deo masnih kiselina potrebnih za proizvodnju energije u srcu potiče iz cirkulacije, pa povišena koncentracija SMK u cirkulaciji dovodi do povećanog preuzimanja SMK od strane ćelija srca i povećane β -oksidacije, što za posledicu ima akumulaciju lipidnih intermedijera u miokardu i nastanak IR, kao i proizvodnju velike količine RVK-a koje izazivaju poremećaje u funkciji mitohondrija i apoptozu kardiomiocita [11].

Oksidativni stres u metaboličkom sindromu

Istraživanja su pokazala da oksidativni stres ima važnu ulogu u patogenezi MetS-a, doprinoseći razvoju metainflamacije i posledične IR. Kod pacijenata sa MetS-om pokazana je smanjena aktivnost antioksidativnih enzima u plazmi, kao i povećani nivoi markera oksidativnih oštećenja [12]. Povećanje oksidativnog stresa kao posledica ishrane bogate fruktozom pokazano je kod pacova kod kojih je nakon tretmana antioksidansima došlo do smanjenog stvaranja RVK-a i sprečavanja IR [13].

Oksidativni stres u srcu dovodi do razvoja IR [14], uzrokuje poremećaj u signalizaciji kalcijuma, što rezultuje dijastolnom i sistolnom disfunkcijom [15], izaziva povećano korišćenje masnih kiselina kao izvora energije izazivajući akumulaciju lipidnih intermedijera [16] i doprinosi razvoju inflamacije u srcu [17], što može izazvati disfunkciju i apoptozu kardiomiocita.

Uloga AMPK-SIRT1-FoxO3a-MnSOD/katalaza antioksidativne ose u metaboličkom sindromu

AMP-aktivirana protein kinaza (AMPK) i sirtuin 1 (SIRT1) su metabolički senzori koji imaju važnu ulogu u patogenezi MetS-a [18]. Pored uloge u održavanju energetske homeostaze u ćeliji, regulacijom metabolizma nutrijenata, ovi molekuli imaju ulogu u regulaciji metaboličke inflamacije [19] i sprečavanju oksida-

tivnog stresa [20] (Slika 2). Pokazano je da AMPK sprečava razvoj metaboličke inflamacije inhibicijom transkripcionog faktora NF- κ B (engl. *Nuclear Factor-kappa B*), a posredstvom nizvodnog medijatora, SIRT1 [21]. Osim toga, SIRT1 sprečava razvoj oksidativnog stresa posredstvom transkripcionog regulatora FoxO3a (engl. *Forkhead box O3*), koji reguliše ekspresiju gena uključenih u antioksidativnu odbranu, kao što su mitohondrijska mangan superoksid dismutaza (MnSOD) i katalaza [22, 23] koji katalizuju razgradnju reaktivnih vrsta kiseonika. SIRT1 sprečava razvoj oksidativnog stresa i putem inhibicije nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (engl. *Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate*, NADPH) oksidaze 4 (Nox4) [24], koja predstavlja glavni izvor mitohondrijskog oksidativnog stresa u kardiomiocitima [25].

Važnu ulogu u patogenezi MetS-a ima i ChREBP (engl. *Carbohydrate Response-Element-Binding Protein*) koji se vezuje za SIRT1 promotor u metabolički aktivnim tkivima [26] i reguliše gensku transkripciju u glikolizi/fruktolizi i *de novo* lipogenezi [27]. U metabolički aktivnim tkivima je pokazano da fruktoza aktivira ChREBP [26], međutim nema dovoljno podataka o ekspresiji ChREBP u srcu. U studiji Bošković i sar., ishrana bogata fruktozom je smanjila nivo ChREBP u srcu [28], što ukazuje na kompleksnost njegove tkivno-specifične ekspresije [29, 27]. Moguće je da ChREBP reguliše transkripciju gena uključenih u glikolizu/fruktolizu u metabolički aktivnim tkivima koja pre svega koriste ugljene hidrate kao energetski supstrat [30], za razliku od srca koje koristi masne kiseline dugih lanaca kao dominantan izvor energije [10].

Bošković i sar. su pokazali da ishrana bogata fruktozom inhibira antioksidativnu osu SIRT1-FoxO3a-MnSOD/katalaza kako u srcu ovarijektomisanih ženki pacova [31], tako i u srcu mužjaka pacova [28], dok su Li i sar. ustanovili da Ang II, posredstvom svog receptora, AT1R, inhibira ovu osu u mitohondrijama osteoblasta, povezujući RAS i oksidativni stres [32].

Uloga renin-angiotenzin sistema (RAS) u metaboličkom sindromu

RAS je hormonski sistem koji ima važnu ulogu u razvoju MetS-a (Slika 3). Kod pacova na ishrani bogatoj fruktozom pokazano je da oksidativni stres u srcu može biti posledica aktivacije RAS-a [33]. Pored sistemskog, u srcu je aktivan i lokalni RAS koji može da deluje nezavisno od sistemskog.

Angiotenzin konvertujući enzim (ACE) proteolitički seče angiotenzin I pri čemu nastaje biološki najaktivniji hormon RAS-a, angiotenzin II (Ang II). Pokazano je da hronična administracija Ang II dovodi do povećane produkcije RVK-a koja je posredovana aktivacijom Nox-a [34]. Bošković i sar. su detektovali povećani nivo ACE i Nox4 nakon ishrane bogate fruktozom [35, 28].

Fiziološka dejstva Ang II se ostvaruju posredstvom dva tipa angiotenzinskih receptora: receptora tipa 1 (AT1R) i receptora tipa 2 (AT2R), pri čemu AT1R ostvaruje štetne efekte Ang II, dok stimulacija AT2R ima blagotvorne metaboličke efekte [36] koji su potisnuti zbog dominantne ekspresije AT1R u većini adultnih tkiva. Stoga bi farmakološka modulacija balansa između AT1R i AT2R mogla biti značajna u terapiji MetS-a i njegovih krajnjih posledica, T2D i KVB [37].

ACE homolog, angiotenzin konvertujući enzim 2 (ACE2) direktno degraduje Ang II, na račun nastanka angiotenzina 1-7 (Ang 1-7), koji ima kontraregulatornu ulogu u odnosu na Ang II pa predstavlja glavnu komponentu deaktivirajuće kaskade RAS-a. Pokazano je da ACE2 ima značajnu kardioprotektivnu ulogu zahvaljujući svom antiinflamatornom i antifibroznom dejstvu na srce [38]. Farmakološka inhibicija ili genetička delecija ACE2 ima štetne efekte na srce [39, 40]. Sa druge strane, pokazano je da povećanje ekspresije ACE2 poboljšava funkciju srca [41, 42, 43]. Stoga bi upotreba prirodnih suplemenata u ishrani koji deluju kao ACE2 aktivatori, mogla imati dodatne kardioprotektivne efekte u terapiji KVB i MetS-a u kombinaciji sa konvencionalnim RAS blokatorima (ACE inhibitori i AT1R antagonisti).

Veza između RAS-a, oksidativnog stresa i inflamacije u metaboličkom sindromu

U stanju narušene metaboličke ravnoteže dolazi do povećane produkcije Ang II koji posredstvom svog receptora AT1R aktivira Nox4. To rezultuje povećanom produkcijom RVK-a i nastankom oksidativnog stresa. RVK aktiviraju transkripcijski faktor NF- κ B što uzrokuje transkripciju gena za proinflamatorne citokine [44] koji inhibiraju signalni put insulina aktivacijom intraćelijskih kinaza, izazivajući IR [45] (Slika 4). Na ovaj način RAS, oksidativni stres i inflamacija konvergiraju u zajedničke puteve koji rezultuju insulinskom rezistencijom koja leži u osnovi MetS-a [46]. Pokazano je da inhibicija AT1R u animalnom modelu MetS-a, uzrokovanom ishranom bogatom fruktozom, dovodi do smanjene ekspresije NF- κ B i proinflamatornih citokina u krvnim sudovima, kao i smanjene produkcije RVK-a i aktivnosti Nox-a u endotelu, ukazujući na ulogu RAS-a i oksidativnog stresa u metainflamaciji [47].

Orasi kao suplement u ishrani bogat n-3 masnim kiselinama - nutritivni tretman u terapiji metaboličkog sindroma?

Dosadašnja istraživanja su pokazala da redovna konzumacija orašastih plodova može poništiti štetne efekte konzumacije fruktoze na srce, pre svega zahvaljujući svojim antiinflamatornim i antioksidativnim svojstvima [48, 49, 28, 35]. Međutim, molekularni mehanizmi koji leže u osnovi ovih efekata nisu u potpunosti poznati, a njihovo rasvetljavanje pruža mogućnost razvoja novih, nefarmakoloških pristupa u terapiji kardio-metaboličkih bolesti.

U poređenju sa ostalim orašastim plodovima, orasi sadrže najveću količinu n-3 polinezasićenih masnih kiselina (engl. *Polyunsaturated Fatty Acid*, PUFA) [50], koje imaju značajnu kardioprotektivnu ulogu [48, 49]. Od ukupnog procenta masti (65.2%), PUFA čine čak 47.18% i to n-6, linolna kiselina (LA, 38.1%) i n-3, alfa-linoleinska kiselina (ALA, 9.08%) [51]. ALA je prekursor dugolančanih n-3 PUFA, eikozapentaenoične kiseline (EPA) i dokozaheksanoične kiseline (DHA), koje učestvuju u biosintezi eikozanoida, važnih medijatora i regulatora inflamacije, koji su manje biološki potentni nego oni sintetisani iz arahidonske kiseline (AA), dugolančane n-6 PUFA koja nastaje iz LA [52] (Slika 5). Osim toga, EPA i DHA su prekursori resolovina i protektina, lipidnih medijatora sa antiinflamatornim svojstvima, koji ublažavaju i/ili vrše rezoluciju inflamacije [53].

Zdravstveno preporučeni odnos n-3 i n-6 PUFA (1:4) je značajno narušen savremenim načinom ishrane (1:10 do 1:25) [54] u kome n-6 PUFA koje imaju proinflamatorne efekte dominiraju u odnosu na antiinflamatorne n-3 PUFA [55]. Narušen odnos n-6/n-3 PUFA uzrokuje inflamaciju koja doprinosi razvoju MetS-a [56, 57]. Bošković i sar. su pokazali povećan odnos AA/EPA u plazmi pacova na ishrani bogatoj fruktozom [28], koji je direktno asociran sa povećanim rizikom za nastanak KVB [58, 59]. Sa druge strane, u ovoj studiji je pokazano smanjenje odnosa AA/EPA i AA/DHA u plazmi [28], kao i smanjenje odnosa AA/EPA u srcu pacova [35] kao rezultat konzumacije oraha, ukazujući na njene antiinflamatorne i kardioprotektivne efekte. Na istom animalnom modelu MetS-a pokazano je smanjenje tkivno-specifičnog odnosa n-6/n-3 PUFA nakon konzumacije oraha [60]. U prilog ovim nalazima idu i rezultati studije koja je pokazala da konzumacija oraha značajno povećava nivo ALA i EPA, a smanjuje nivo AA u tkivu srca u poređenju sa kontrolnom grupom [50]. Iako i fruktoza i orasi stimulišu preuzimanje i oksidaciju masnih kiselina u srcu, suplementacija orasima pre svega povećava nivo i metabolizam n-3 PUFA, i smanjuje odnos POA (palmitoleinska kiselina)/PA (palmitinska kiselina) u srcu [61], koji predstavlja marker *de novo* lipogeneze i direktno je asociran sa MetS-om [62].

Orasi su i jedan od najbogatijih nutritivnih izvora antioksidanasa [63], bogat izvor vlakana, vitamina, minerala, arginina, fitosterola i fenola.

Rezultati studija koje istražuju asocijaciju između konzumacije orašastih plodova i telesne mase nisu konzistentni [64, 65, 66]. Kada se uvedu kao deo energetske kontrolisane, izokalorične ishrane, pokazano je da orašasti plodovi mogu da pomognu u gubitku telesne mase, uprkos visokoj energetske vrednosti [67, 68, 69]. Međutim, kada se uvedu u redovnu ishranu bez kontrole energetske unosa, uglavnom ili ne dovode do promena u telesnoj masi [70, 71, 72] ili dovode do povećanja telesne mase [28], ali u daleko manjoj meri nego što se može očekivati na osnovu njihove energetske vrednosti, kako zbog specifičnog hemijskog sastava, tako i zbog njihove fizičke strukture [73, 74].

Sa druge strane, istraživanja su pokazala da konzumacija oraša dovodi do smanjenja relativne mase srca, ukazujući na njen antihipertrofični kapacitet [28, 75] koji se može pripisati n-3 masnim kiselinama [76].

Bošković i sar. su pokazali blagotvorne efekte konzumacije oraša na antioksidativnu osu SIRT1-FoxO3a-MnSOD/katalaza u srcu mužjaka pacova na ishrani bogatoj fruktozom [28]. U ovoj studiji, ni ishrana bogata fruktozom, ni suplementacija orasima nisu uticali na nivo AMPK, dok su oba faktora značajno smanjila nivo SIRT1, što ukazuje na mogućnost da ekspresija SIRT1 u srcu nije regulisana putem AMPK [28]. To je u saglasnosti sa rezultatima drugih studija kako u srcu [31] tako i u aorti [77] na istom životinjskom modelu. Smanjenje nivoa SIRT1 u srcu pacova nakon ishrane bogate fruktozom [28] asocirano je sa MetS-om i hroničnom inflamacijom [78]. Suplementacija orasima u istoj studiji poništila je promene u nivou SIRT1 u srcu pacova na fruktoznoj ishrani, ukazujući na potencijalno smanjenje inflamacije [28]. S obzirom na anti-inflamatorni i kardioprotektivni efekat SIRT1, utvrđeni efekat konzumacije oraša na ovaj metabolički senzor u MetS-u predstavlja osnovu za razvoj nutritivne terapije u kardiometaboličkim bolestima. Kako SIRT1 deacetiluje transkripcioni regulator FoxO3a, promovišući njegovu defosforilaciju, jedarnu akumulaciju i inicijaciju FoxO3a – zavisne genske transkripcije [79], smanjenje nivoa SIRT1 uzrokovano fruktoznom ishranom dovodi do povećane fosforilacije FoxO3a [28] što za posledicu ima smanjenje nivoa enzima antioksidativne odbrane, MnSOD i katalaze [28]. Sa druge strane, suplementacija orasima povećala je nivo FoxO3a uz posledično povećanje nivoa MnSOD i katalaze [28]. Smanjenje aktivnosti MnSOD nakon ishrane obogaćene 10% fruktozom pokazano je u mozgu mužjaka pacova, uzrokujući razvoj hipertenzije [80], dok su Cavarape i saradnici ustanovili da ishrana bogata fruktozom smanjuje ekspresiju iRNK za katalazu u srcu pacova [81].

Konzumacija oraša doprinosi smanjenju oksidativnog stresa u srcu i posredstvom inhibicije Nox4-zavisne produkcije RVK-a. Ovaj efekat se može pripisati n-3 PUFA koje mogu sprečiti aktivaciju Nox-a [82] i posledičnu RVK-zavisnu aktivaciju transkripcionog faktora NF- κ B u endotelnim ćelijama [83]. Iako je većina studija ustanovila da ishrana obogaćena fruktozom povećava kako iRNK [84], tako i proteinski nivo Nox4 u srcu pacova [28], neke studije sugerišu da Nox4 ima ateroprotektivnu ulogu [85, 86], kao i ulogu u održavanju energetske statusa u srcu [87]. U studiji Bošković i sar., povećani nivo Nox4 nakon suplementacije orasima [28], ukazuje na potencijalnu ulogu Nox4 u održavanju energetske statusa u srcu i adaptaciji na hroničnu inflamaciju. Međutim, ulogu Nox4 u srcu treba dodatno rasvetliti.

Suplementacija orasima inhibira ekspresiju ChREBP u srcu pacova [28]. Ovaj efekat se pripisuje povišenim količinama masnih kiselina u srcu, što potvrđuje i studija u kojoj je nakon ishrane sa visokim sadržajem masti došlo do inhibicije ekspresije ChREBP u jetri pacova [88]. Nekoliko studija je pokazalo da ishrana bogata polinezasićenim masnim kiselinama ubrzava degradaciju iRNK za ChREBP [88, 89] i inhibira njegov transport u jedro [89], kao i da ishrana sa visokim sadržajem masti uzrokuje smanjenu DNK-vezujuću aktivnost ChREBP, u poređenju sa ishranom sa visokim sadržajem ugljenih hidrata [29, 88]. Međutim, neophodna su dodatna istraživanja ChREBP u srcu kako bi se mogao razmatrati kao potencijalni kandidat u nutritivnoj terapiji.

Rezultati studija koje istražuju asocijaciju između konzumacije orašastih plodova i krvnog pritiska nisu konzistentni. Međutim, mnoge studije su ustanovile smanjenje krvnog pritiska nakon konzumacije oraha [28, 71, 67]. Ovaj efekat se objašnjava bogatim sadržajem katjona, kao što su magnezijum i kalijum [90] i visokim sadržajem ALA [91], koja uzrokuje relaksaciju glatkih mišićnih ćelija vaskulature [92]. Stanišić i sar. su na eksperimentalnom modelu MetS-a pokazali da konzumacija oraha ima blagotvorni efekat na vaskularni tonus preko ATP zavisnog kanala za kalijum [77].

Bošković i sar. su ustanovili da suplementacija orasima značajno povećava nivo ACE2 u srcu [35]. To je u skladu sa nalazima da konzumacija oraha značajno smanjuje sistolni krvni pritisak u istom životinjskom modelu MetS-a [28]. Prethodna istraživanja su pokazala da nedostatak ACE2 uzrokuje umerenu sistolnu hipertenziju [93], dok sa druge strane, ACE2 aktivatori snižavaju krvni pritisak [94] i poboljšavaju funkciju srca [43, 95]. Ulu i saradnici su ustanovili da n-3 PUFA predstavljaju ACE2 modulatore, tako što povećavaju nivo iRNK za ACE2 u bubrezima smanjujući inflamaciju u Ang II - zavisnoj hipertenziji [96]. U MetS-u, međutim, efekat PUFA na nivo ACE2 još uvek nije dovoljno istražen.

Ustanovljeno je da je ekspresija ACE2 pod kontrolom SIRT1 [97]. Bošković i sar. su pokazali na animalnom modelu MetS-a da suplementacija orasima povećava kako nivo SIRT1 [28], tako i nivo ACE2 u srcu pacova [35].

Efekat konzumacije oraha na aktivaciju transkripcionog faktora NF-κB zavisi, pre svega, od dužine trajanja tretmana. Bošković i sar. su ustanovili da konzumacija oraha u trajanju od 6 nedelja nije uspela da revertuje nivo NF-κB u srcu pacova [35] koji je značajno povećan nakon ishrane bogate fruktozom [35, 98]. Sa druge strane, Zhang i saradnici su pokazali da konzumacija jestivih ulja sa niskim odnosom n-6/n-3 PUFA u trajanju od 12 nedelja smanjuje ekspresiju NF-κB, ublažavajući inflamaciju i progresiju osteoartritisa [99]. Takođe je pokazano da EPA i DHA smanjuju ekspresiju proinflamatornih citokina, kao i aktivnost NF-κB u humanim LPS-stimulisanim makrofagima [100].

Veliki broj istraživanja je pokazao da konzumacija oraha ima blagotvorne efekte na većinu simptoma MetS-a, sugerišući njihovu ulogu u nutritivnoj terapiji. Međutim, kada je u pitanju prevencija MetS-a, blagotvorni efekti konzumacije oraha u kontrolnim grupama nisu uvek prisutni. Bošković i sar. su u svojoj studiji ukazali da nema značajnih razlika između kontrolne i grupe na standardnoj ishrani koja je konzumirala orahe u trajanju od 6 nedelja, u komponentama RAS-a [35]. Gencoglu i sar. nisu detektovali nijedan značajan efekat konzumacije orahovog ulja u kontrolnoj grupi na telesnu težinu i težinu jetre, metaboličke faktore rizika, markere oksidativnog stresa (eNOS) i faktore transkripcije (NF-κB i Nrf2) kao i NADPH oksidazu (p22phox) i SIRT1, za razliku od blagotvornih efekata suplementacije orahovim uljem na ove komponente nakon ishrane sa visokim sadržajem ugljenih hidrata ili ishrane sa visokim sadržajem masti kod pacova [101]. Osim toga, Leung i sar. su pokazali da suplementacija orasima u kontrolnoj grupi ne dovodi do značajnih promena u ekspresiji gena za proinflamatorne citokine [50].

Zaključak

Dosadašnja istraživanja su potvrdila korisne kardiometaboličke efekte konzumacije oraha i predložila mehanizme koji leže u osnovi njihovih antiinflamatornih i antioksidativnih efekata u srcu. Suplementacija orasima deluje protektivno na antioksidativnu osu SIRT1-FoxO3a-MnSOD/katalaza u srcu, i promoviše antiinflamatorni profil masnih kiselina u plazmi i srcu, koji su kompromitovani ishranom bogatom fruktozom. Osim toga, suplementacija orasima u MetS-u ima zaštitni efekat na srce i kroz povećanje nivoa ACE2 u srcu. Stimulacija ACE2/Ang 1–7 ose RAS-a može predstavljati važan terapijski pristup u lečenju kardio-

metaboličkih bolesti, pa suplementacija orasima kao nutritivnih ACE2 aktivatora ukazuje na mogućnost razvoja novih, nefarmakoloških pristupa u terapiji ovih bolesti.

Zahvalnica

Ovaj rad je podržan sredstvima Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije, br. ugovora 451-03-47/2023-01/200017.

Literatura

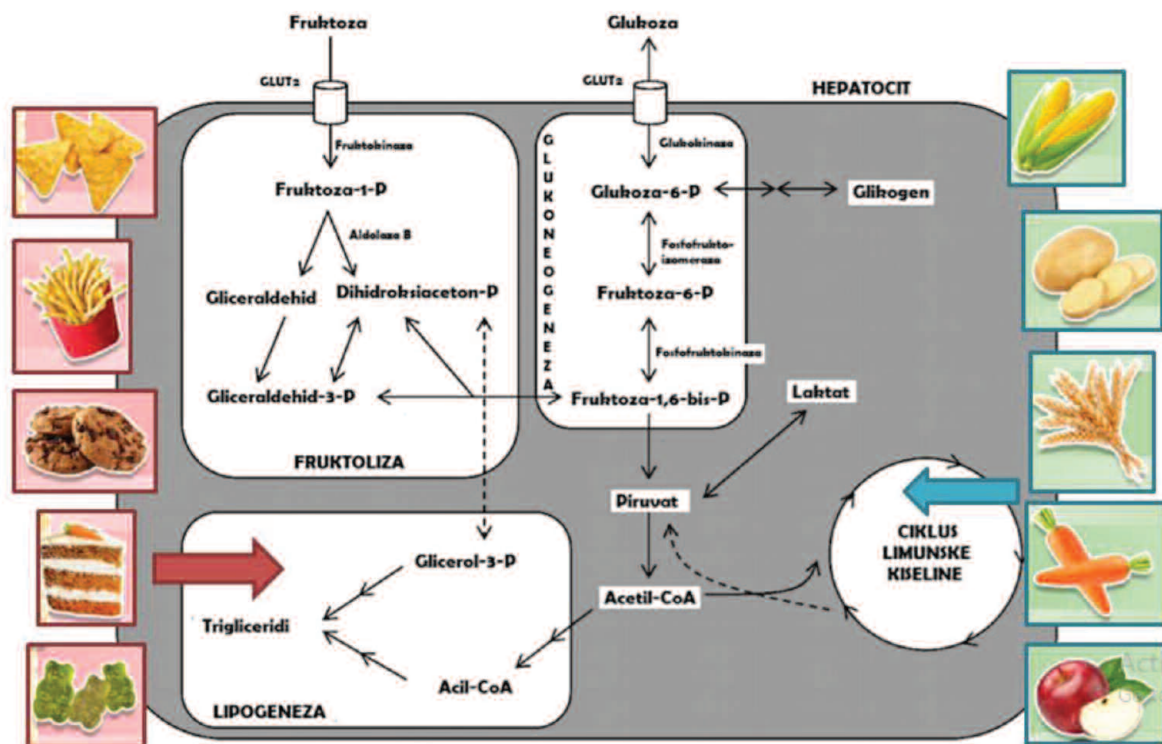
- Taskinen MR, Packard CJ, Borén J. Dietary Fructose and the Metabolic Syndrome. *Nutrients*. 2019; 11(9):1987. doi: 10.3390/nu11091987.
- Grundy SM. Metabolic syndrome pandemic. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008; 28(4):629-36. doi: 10.1161/ATVBAHA.107.151092.
- Phillips C, Lopez-Miranda J, Perez-Jimenez F, McManus R, Roche HM. Genetic and nutrient determinants of the metabolic syndrome. *Curr Opin Cardiol*. 2006; 21(3):185-93. doi: 10.1097/01.hco.0000221579.25878.11.
- Sanchez-Lozada LG, Tapia E, Jimenez A, Bautista P, Cristobal M, Nepomuceno T, et al. Fructose-induced metabolic syndrome is associated with glomerular hypertension and renal microvascular damage in rats. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2007; 292(1):F423-9. doi: 10.1152/ajprenal.00124.2006.
- Dai S, McNeill JH. Fructose-induced hypertension in rats is concentration-and duration-dependent. *J Pharmacol Toxicol Methods* 1995; 33(2):101-7. doi: 10.1016/1056-8719(94)00063-a.
- Yi KH, Hwang JS, Kim EY, Lee SH, Kim DH, Lim JS. Prevalence of insulin resistance and cardiometabolic risk in Korean children and adolescents: a population-based study. *Diabetes Res Clin Pract*. 2014; 103(1):106-13. doi: 10.1016/j.diabres.2013.10.021.
- Kopp A, Gross P, Falk W, Bala M, Weigert J, Buechler C, et al. Fatty acids as metabolic mediators in innate immunity. *Eur J Clin Invest*. 2009; 39(10):924-933. doi: 10.1111/j.1365-2362.2009.02185.x.
- Trayhurn P, Wood IS. Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. *Br J Nutr*. 2004; 92(3):347-55. doi: 10.1079/bjn20041213.
- van Greevenbroek MM, Schalkwijk CG, Stehouwer CD. Obesity-associated low-grade inflammation in type 2 diabetes mellitus: causes and consequences. *Neth J Med*. 2013; 71(4):174-87.
- Bertrand L, Horman S, Beauloye C, Vanoverschelde JL. Insulin signalling in the heart. *Cardiovasc Res*. 2008; 79(2):238-48. doi: 10.1093/cvr/cvn093.
- Gray S, Kim JK. New insights into insulin resistance in the diabetic heart. *Trends Endocrinol Metab*. 2011; 22(10):394-403. doi: 10.1016/j.tem.2011.05.001.
- Bekkouche L, Bouchenak M, Malaisse WJ, Yahia DA. The Mediterranean diet adoption improves metabolic, oxidative, and inflammatory abnormalities in Algerian metabolic syndrome patients. *Horm Metab Res*. 2014; 46(4):274-82. doi: 10.1055/s-0033-1363657.
- Song D, Hutchings S, Pang CC. Chronic N-acetylcysteine prevents fructose-induced insulin resistance and hypertension in rats. *Eur J Pharmacol*. 2005; 508(1-3):205-10. doi: 10.1016/j.ejphar.2004.12.018.
- Qatanani M, Lazar MA. Mechanisms of obesity-associated insulin resistance: many choices on the menu. *Genes Dev*. 2007; 21(12):1443-55. doi: 10.1101/gad.1550907.
- Barouch LA, Harrison RW, Skaf MW, Rosas GO, Cappola TP, Kobeissi ZA, et al. Nitric oxide regulates the heart by spatial confinement of nitric oxide synthase isoforms. *Nature*. 2002; 416(6878):337-9. doi: 10.1038/416337a.
- Bayeva M, Sawicki KT, Ardehali H. Taking diabetes to heart—deregulation of myocardial lipid metabolism in diabetic cardiomyopathy. *J Am Heart Assoc*. 2013; 2(6):e000433. doi: 10.1161/JAHA.113.000433.
- Kamata H, Honda S, Maeda S, Chang L, Hirata H, Karin M. Reactive oxygen species promote TNF α -induced death and sustained JNK activation by inhibiting MAP kinase phosphatases. *Cell*. 2005; 120(5):649-661. doi: 10.1016/j.cell.2004.12.041.
- Ruderman NB, Carling D, Prentki M, Cacicedo JM. AMPK, insulin resistance, and the metabolic syndrome. *J Clin Invest*. 2013; 123(7):2764-72. doi: 10.1172/JCI67227.

19. Lyons CL, Kennedy EB, Roche HM. Metabolic Inflammation-Differential Modulation by Dietary Constituents. *Nutrients*. 2016; 8(5):247. doi: 10.3390/nu8050247.
20. Price NL, Gomes AP, Ling AJ, Duarte FV, Martin-Montalvo A, North BJ, et al. SIRT1 is required for AMPK activation and the beneficial effects of resveratrol on mitochondrial function. *Cell Metab*. 2012; 15(5):675-90. doi: 10.1016/j.cmet.2012.04.003.
21. Salminen A, Hyttinen JM, Kaarniranta K. AMP-activated protein kinase inhibits NF- κ B signaling and inflammation: impact on healthspan and lifespan. *J Mol Med (Berl)*. 2011; 89(7):667-76. doi: 10.1007/s00109-011-0748-0.
22. Kops GJ, Dansen TB, Polderman PE, Saarloos I, Wirtz KW, Coffey PJ, et al. Forkhead transcription factor FOXO3a protects quiescent cells from oxidative stress. *Nature*. 2002; 419(6904):316-21. doi: 10.1038/nature01036.
23. Tan WQ, Wang K, Lv DY, Li PF. Foxo3a inhibits cardiomyocyte hypertrophy through transactivating catalase. *J Biol Chem*. 2008; 283(44):29730-9. doi: 10.1074/jbc.M805514200.
24. Zarzuelo MJ, López-Sepúlveda R, Sánchez M, Romero M, Gómez-Guzmán M, Ungvary Z, et al. SIRT1 inhibits NADPH oxidase activation and protects endothelial function in the rat aorta: implications for vascular aging. *Biochem Pharmacol*. 2013; 85(9):1288-96. doi: 10.1016/j.bcp.2013.02.015.
25. Kuroda J, Ago T, Matsushima S, Zhai P, Schneider MD, Sadoshima J. NADPH oxidase 4 (Nox4) is a major source of oxidative stress in the failing heart. *Proc Natl Acad Sci*. 2010; 107:15565-15570. doi:10.1073/pnas.1002178107.
26. Noriega LG, Feige JN, Canto C, Yamamoto H, Yu J, Herman MA, et al. CREB and ChREBP oppositely regulate SIRT1 expression in response to energy availability. 2011; *EMBO Rep*. 12:1069-1076. doi: 10.1038/embor.2011.151.
27. Iizuka K, Bruick RK, Liang G, Horton JD, Uyeda K. Deficiency of carbohydrate response element-binding protein (ChREBP) reduces lipogenesis as well as glycolysis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004; 101(19):7281-7286. doi: 10.1073/pnas.0401516101.
28. Bošković M, Živković M, Korićanac G, Stanišić J, Zec M, Krga I, et al. Walnut Supplementation Restores the SIRT1-FoxO3a-MnSOD/Catalase Axis in the Heart, Promotes an Anti-Inflammatory Fatty Acid Profile in Plasma, and Lowers Blood Pressure on Fructose-Rich Diet. *Oxid Med Cell Longev*. 2021; 2021:5543025. doi: 10.1155/2021/5543025.
29. Yamashita H, Takenoshita M, Sakurai M, Bruick RK, Henzel WJ, Shillinglaw W, et al. A glucose-responsive transcription factor that regulates carbohydrate metabolism in the liver. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001; 98(16):9116-21. doi: 10.1073/pnas.161284298.
30. Logan SM, Storey KB. Tissue-specific response of carbohydrate-responsive element binding protein (ChREBP) to mammalian hibernation in 13-lined ground squirrels. *Cryobiology*. 2016; 73(2):103-11. doi: 10.1016/j.cryobiol.2016.09.002.
31. Bošković M, Bundalo M, Živković M, Stanišić J, Kostić M, Korićanac G, et al. Estradiol ameliorates antioxidant axis SIRT1-FoxO3a-MnSOD/catalase in the heart of fructose-fed ovariectomized rats. *J Funct Foods*. 2018; 52:690-698. doi: 10.1016/j.jff.2018.11.053.
32. Li Y, Shen G, Yu C, Li G, Shen J, Gong J, et al. Angiotensin II induces mitochondrial oxidative stress and mtDNA damage in osteoblasts by inhibiting SIRT1-FoxO3a-MnSOD pathway. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014; 455(1-2):113-8. doi: 10.1016/j.bbrc.2014.10.123.
33. Giacchetti G, Sechi LA, Griffin CA, Don BR, Mantero F, Schambelan M. The tissue renin-angiotensin system in rats with fructose-induced hypertension: overexpression of type 1 angiotensin II receptor in adipose tissue. *J Hypertens*. 2000; 18(6):695-702. doi: 10.1097/00004872-200018060-00006.
34. Delbosc S, Cristol JP, Descomps B, Mimran A, Jover B. Simvastatin prevents angiotensin II-induced cardiac alteration and oxidative stress. *Hypertension*. 2002; 40(2):142-7. doi: 10.1161/01.hyp.0000024348.87637.6f.
35. Bošković M, Živković M, Korićanac G, Tepavčević S, Zec M, Debeljak-Martac J, et al. Walnut supplementation after fructose-rich diet is associated with a beneficial fatty acid ratio and increased ACE2 expression in the rat heart. *Front Physiol*. 2022; 13:942459. doi: 10.3389/fphys.2022.942459.
36. Mehta PK, Griendling KK. Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2007; 292(1):C82-97. doi: 10.1152/ajpcell.00287.2006.
37. Paulis L, Foulquier S, Namsolleck P, Recarti C, Steckelings UM, Unger T. Combined Angiotensin Receptor Modulation in the Management of Cardio-Metabolic Disorders. *Drugs*. 2016; 76(1):1-12. doi: 10.1007/s40265-015-0509-4.
38. Simões E Silva AC, Teixeira MM. ACE inhibition, ACE2 and angiotensin-(1-7) axis in kidney and cardiac inflammation and fibrosis. *Pharmacol Res*. 2016; 107:154-162. doi: 10.1016/j.phrs.2016.03.018.
39. Kim MA, Yang D, Kida K, Molotkova N, Yeo SJ, Varki N, et al. Effects of ACE2 inhibition in the post-myocardial infarction heart. *J Card Fail*. 2010; 16(9):777-85. doi: 10.1016/j.cardfail.2010.04.002.
40. Moritani T, Iwai M, Kanno H, Nakaoka H, Iwanami J, Higaki T, et al. ACE2 deficiency induced perivascular fibrosis and cardiac hypertrophy during postnatal development in mice. *J Am Soc Hypertens*. 2013; 7(4):259-66. doi: 10.1016/j.jash.2013.03.002.

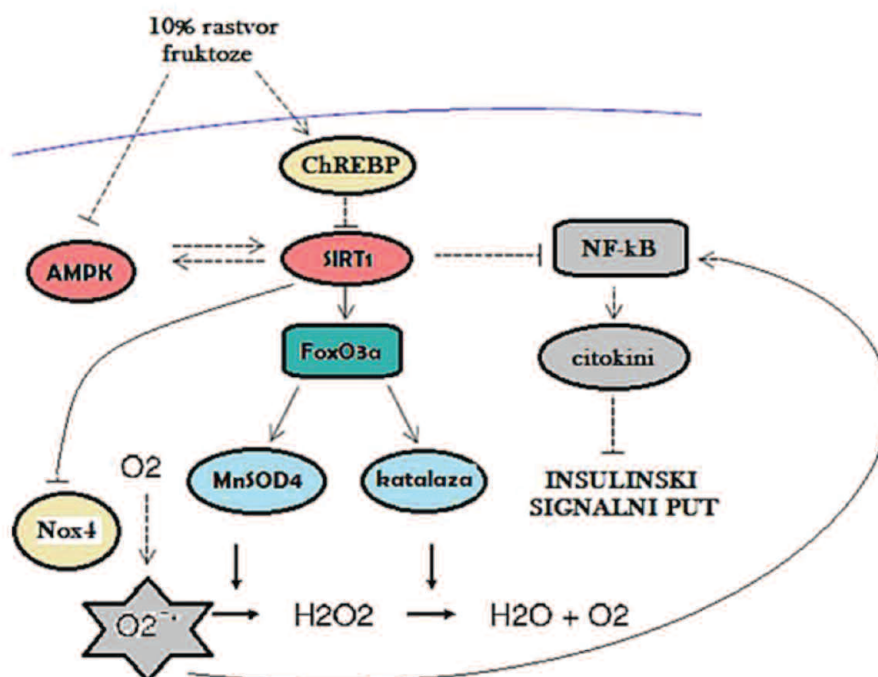
41. Huentelman MJ, Grobe JL, Vazquez J, Stewart JM, Mecca AP, Katovich MJ, et al. Protection from angiotensin II-induced cardiac hypertrophy and fibrosis by systemic lentiviral delivery of ACE2 in rats. *Exp Physiol*. 2005; 90(5):783-90. doi: 10.1113/expphysiol.2005.031096.
42. Díez-Freire C, Vázquez J, Correa de Adjoulian MF, Ferrari MF, Yuan L, Silver X, et al. ACE2 gene transfer attenuates hypertension-linked pathophysiological changes in the SHR. *Physiol Genomics*. 2006; 27(1):12-9. doi: 10.1152/physiolgenomics.00312.2005.
43. Dong B, Yu QT, Dai HY, Gao YY, Zhou ZL, Zhang L, et al. Angiotensin-converting enzyme-2 overexpression improves left ventricular remodeling and function in a rat model of diabetic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol*. 2012; 59(8):739-47. doi: 10.1016/j.jacc.2011.09.071.
44. Wang X, Khaidakov M, Ding Z, Mitra S, Lu J, Liu S, et al. Cross-talk between inflammation and angiotensin II: studies based on direct transfection of cardiomyocytes with AT1R and AT2R cDNA. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2012; 237(12):1394-401. doi: 10.1258/ebm.2012.012212.
45. Zhang J, Gao Z, Yin J, Quon MJ, Ye J. S6K directly phosphorylates IRS-1 on Ser-270 to promote insulin resistance in response to TNF-(alpha) signaling through IKK2. *J Biol Chem*. 2008; 283(51):35375-35382. doi: 10.1074/jbc.M806480200.
46. Nelson RA, Bremer AA. Insulin resistance and metabolic syndrome in the pediatric population. *Metab Syndr Relat Disord*. 2010; 8(1):1-14. doi: 10.1089/met.2009.0068.
47. Renna NF, Lembo C, Díez E, Miatello RM. Role of Renin-Angiotensin system and oxidative stress on vascular inflammation in insulin resistance model. *Int J Hypertens*. 2013; 2013:420979. doi: 10.1155/2013/420979.
48. Gutiérrez S, Svahn SL, Johansson ME. Effects of Omega-3 Fatty Acids on Immune Cells. *Int J Mol Sci*. 2019; 20(20):5028. doi: 10.3390/ijms20205028.
49. Oppedisano F, Macrì R, Gliozzi M, Musolino V, Carresi C, Maiuolo J, et al. The Anti-Inflammatory and Antioxidant Properties of n-3 PUFAs: Their Role in Cardiovascular Protection. *Biomedicines*. 2020; 8(9):306. doi: 10.3390/biomedicines8090306.
50. Leung KS, Galano JM, Yau YF, Oger C, Durand T, Lee JC. Walnut-Enriched Diet Elevated α -Linolenic Acid, Phytosterols, and Phytofurans in Rat Liver and Heart Tissues and Modulated Anti-inflammatory Lipid Mediators in the Liver. *J Agric Food Chem*. 2021; 69(32):9094-9101. doi: 10.1021/acs.jafc.0c06690.
51. Ros E, Mataix J. Fatty acid composition of nuts—implications for cardiovascular health. *Br J Nutr*. 2006; 96 Suppl 2:S29-35. doi: 10.1017/bjn20061861.
52. Calder PC. Functional Roles of Fatty Acids and Their Effects on Human Health. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*. 2015; 39(1 Suppl):18S-32S. doi: 10.1177/0148607115595980.
53. Bannenberg GL, Chiang N, Ariel A, Arita M, Tjonahen E, Gotlinger KH, et al. Molecular circuits of resolution: formation and actions of resolvins and protectins. *J Immunol*. 2005; 174(7):4345-55. doi: 10.4049/jimmunol.174.7.4345.
54. Petrovic S, Arsic A. Fatty Acids: Fatty Acids. In: Caballero B, Finglas P, and Toldrá F. (eds.) *The Encyclopedia of Food and Health* vol. 2, 2016; pp. 623-631. Oxford: Academic Press.
55. Calder PC. n-3 polyunsaturated fatty acids, inflammation, and inflammatory diseases. *Am J Clin Nutr*. 2006; 83(6 Suppl):1505S-1519S. doi: 10.1093/ajcn/83.6.1505S.
56. Simopoulos AP. Dietary omega-3 fatty acid deficiency and high fructose intake in the development of metabolic syndrome, brain metabolic abnormalities, and non-alcoholic fatty liver disease. *Nutrients*. 2013; 5(8):2901-23. doi: 10.3390/nu5082901.
57. Kromhout D, de Goede J. Update on cardiometabolic health effects of ω -3 fatty acids. *Curr Opin Lipidol*. 2014; 25(1):85-90. doi: 10.1097/MOL.0000000000000041.
58. Ninomiya T, Nagata M, Hata J, Hirakawa Y, Ozawa M, Yoshida D, et al. Association between ratio of serum eicosapentaenoic acid to arachidonic acid and risk of cardiovascular disease: the Hisayama Study. *Atherosclerosis*. 2013; 231(2):261-7. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2013.09.023.
59. Takahashi M, Ando J, Shimada K, Nishizaki Y, Tani S, Ogawa T, et al. The ratio of serum n-3 to n-6 polyunsaturated fatty acids is associated with diabetes mellitus in patients with prior myocardial infarction: a multicenter cross-sectional study. *BMC Cardiovasc Disord*. 2017; 17(1):41. doi: 10.1186/s12872-017-0479-4.
60. Zec MM, Krga I, Takić M, Debeljak-Martačić J, Korićanac G, Ranković S, et al. Walnut Consumption Induces Tissue-Specific Omega-6/Omega-3 Decrease in High-Fructose-Fed Wistar Rats. *ACS Omega*. 2020; 5(43):28136-28145. doi: 10.1021/acsomega.0c03784.
61. Romić S, Tepavčević S, Popović T, Zec M, Stojiljković M, Čulafić T, et al. Consumption of walnuts suppresses the conversion of palmitic to palmitoleic acid and enhances omega-3 fatty acid metabolism in the heart of fructose-fed rats. *Int J Food Sci Nutr*. 2022; 73(7):940-953. doi: 10.1080/09637486.2022.2107186.

62. Mayneris-Perxachs J, Guerendiain M, Castellote AI, Estruch R, Covas MI, Fitó M, et al.; for PREDIMED Study Investigators. Plasma fatty acid composition, estimated desaturase activities, and their relation with the metabolic syndrome in a population at high risk of cardiovascular disease. *Clin Nutr*. 2014; 33(1):90-97. doi: 10.1016/j.clnu.2013.03.001.
63. Halvorsen BL, Carlsen MH, Phillips KM, Bøhn SK, Holte K, Jacobs DR Jr, et al. Content of redox-active compounds (ie, antioxidants) in foods consumed in the United States. *Am J Clin Nutr*. 2006; 84(1):95-135. doi: 10.1093/ajcn/84.1.95.
64. Lutz M, Luna L. Nuts and Body Weight - An Overview. *J Nutr Health Sci*. 2016; 3(1): 104. doi: 10.15744/2393-9060.3.104.
65. Kim Y, Keogh JB, Clifton PM. Benefits of Nut Consumption on Insulin Resistance and Cardiovascular Risk Factors: Multiple Potential Mechanisms of Actions. *Nutrients*. 2017; 9(11):1271. doi: 10.3390/nu9111271.
66. Li H, Li X, Yuan S, Jin Y, Lu J. Nut consumption and risk of metabolic syndrome and overweight/obesity: a meta-analysis of prospective cohort studies and randomized trials. *Nutr Metab (Lond)*. 2018; 15:46. doi: 10.1186/s12986-018-0282-y.
67. Rock CL, Flatt SW, Barkai HS, Pakiz B, Heath DD. Walnut consumption in a weight reduction intervention: effects on body weight, biological measures, blood pressure and satiety. *Nutr J*. 2017; 16(1):76. doi: 10.1186/s12937-017-0304-z.
68. Neale EP, Tapsell LC, Martin A, Batterham MJ, Wibisono C, Probst YC. Impact of providing walnut samples in a lifestyle intervention for weight loss: a secondary analysis of the HealthTrack trial. *Food Nutr Res*. 2017; 61(1):1344522. doi: 10.1080/16546628.2017.1344522.
69. Freisling H, Noh H, Slimani N, Chajès V, May AM, Peeters PH, et al. Nut intake and 5-year changes in body weight and obesity risk in adults: results from the EPIC-PANACEA study. *Eur J Nutr*. 2018; 57(7):2399-2408. doi: 10.1007/s00394-017-1513-0.
70. Njike VY, Ayettey R, Petraro P, Treu JA, Katz DL. Walnut ingestion in adults at risk for diabetes: effects on body composition, diet quality, and cardiac risk measures. *BMJ Open Diabetes Res Care*. 2015; 3(1):e000115. doi: 10.1136/bmjdr-2015-000115.
71. Scott NJA, Ellmers LJ, Pilbrow AP, Thomsen L, Richards AM, Frampton CM, et al. Metabolic and Blood Pressure Effects of Walnut Supplementation in a Mouse Model of the Metabolic Syndrome. *Nutrients*. 2017; 9(7):722. doi: 10.3390/nu9070722.
72. Kim Y, Keogh J, Clifton PM. Nuts and Cardio-Metabolic Disease: A Review of Meta-Analyses. *Nutrients*. 2018; 10(12):1935. doi: 10.3390/nu10121935.
73. Sabaté J, Cordero-Macintyre Z, Siapco G, Torabian S, Haddad E. Does regular walnut consumption lead to weight gain? *Br J Nutr*. 2005; 94(5):859-64. doi: 10.1079/bjn20051567.
74. Baer DJ, Gebauer SK, Novotny JA. Walnuts Consumed by Healthy Adults Provide Less Available Energy than Predicted by the Atwater Factors. *J Nutr*. 2016; 146(1):9-13. doi: 10.3945/jn.115.217372.
75. Park SK, Oh CM, Kang JG, Seok HS, Jung JY. The association between left ventricular hypertrophy and consumption of nuts, including peanuts, pine nuts, and almonds. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2021; 31(1):76-84. doi: 10.1016/j.numecd.2020.08.009.
76. Toko H, Morita H, Katakura M, Hashimoto M, Ko T, Bujo S, et al. Omega-3 fatty acid prevents the development of heart failure by changing fatty acid composition in the heart. *Sci Rep*. 2020; 10(1):15553. doi: 10.1038/s41598-020-72686-0.
77. Stanisic J, Ivkovic T, Romic S, Zec M, Culafic T, Stojiljkovic M, et al. Beneficial effect of walnuts on vascular tone is associated with Akt signalling, voltage-dependent calcium channel LTCC and ATP-sensitive potassium channel Kv1.2. *Int J Food Sci Nutr*. 2021; 72(3):324-334. doi: 10.1080/09637486.2020.1796931.
78. Poulsen MM, Jørgensen JO, Jessen N, Richelsen B, Pedersen SB. Resveratrol in metabolic health: an overview of the current evidence and perspectives. *Ann N Y Acad Sci*. 2013; 1290:74-82. doi: 10.1111/nyas.12141.
79. Olmos Y, Sánchez-Gómez FJ, Wild B, García-Quintans N, Cabezero S, Lamas S, et al. SirT1 regulation of antioxidant genes is dependent on the formation of a FoxO3a/PGC-1 α complex. *Antioxid Redox Signal*. 2013; 19(13):1507-21. doi: 10.1089/ars.2012.4713.
80. Cheng PW, Ho WY, Su YT, Lu PJ, Chen BZ, Cheng WH, et al. Resveratrol decreases fructose-induced oxidative stress, mediated by NADPH oxidase via an AMPK-dependent mechanism. *Br J Pharmacol*. 2014; 171(11):2739-50. doi: 10.1111/bph.12648.
81. Cavarape A, Feletto F, Mercuri F, Quagliari L, Daman G, Ceriallo A. High-fructose diet decreases catalase mRNA levels in rat tissues. *J Endocrinol Invest*. 2001; 24(11):838-45. doi: 10.1007/BF03343940.
82. Park HS, Chun JN, Jung HY, Choi C, Bae YS. Role of NADPH oxidase 4 in lipopolysaccharide-induced proinflammatory responses by human aortic endothelial cells. *Cardiovasc Res*. 2006; 72(3):447-55. doi: 10.1016/j.cardiores.2006.09.012.
83. Maloney E, Sweet IR, Hockenbery DM, Pham M, Rizzo NO, Tateya S, et al. Activation of NF-kappaB by palmitate in endothelial cells: a key role for NADPH oxidase-derived superoxide in response to TLR4 activation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2009; 29(9):1370-5. doi: 10.1161/ATVBAHA.109.188813.
84. Nyby MD, Abedi K, Smutko V, Eslami P, Tuck ML. Vascular Angiotensin type 1 receptor expression is associated with vascular dysfunction, oxidative stress and inflammation in fructose-fed rats. *Hypertens Res*. 2007; 30(5):451-7. doi: 10.1291/hypres.30.451.

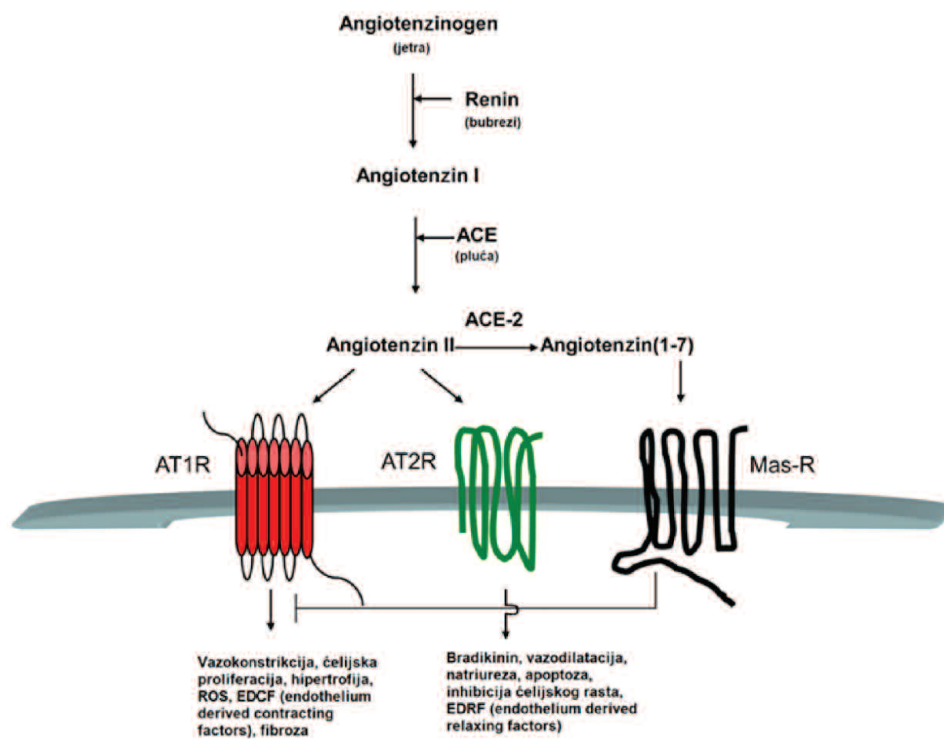
85. Schröder K, Zhang M, Benkhoff S, Mieth A, Pliquett R, Kosowski J, et al. Nox4 is a protective reactive oxygen species generating vascular NADPH oxidase. *Circ Res.* 2012; 110(9):1217-25. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.112.267054.
86. Gray SP, Di Marco E, Kennedy K, Chew P, Okabe J, El-Osta A, et al. Reactive Oxygen Species Can Provide Atheroprotection via NOX4-Dependent Inhibition of Inflammation and Vascular Remodeling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2016; 36(2):295-307. doi: 10.1161/ATVBAHA.115.307012.
87. Nabeebaccus AA, Zoccarato A, Hafstad AD, Santos CX, Aasum E, Brewer AC, et al. Nox4 reprograms cardiac substrate metabolism via protein O-GlcNAcylation to enhance stress adaptation. *JCI Insight.* 2017; 2(24):e96184. doi: 10.1172/jci.insight.96184.
88. Kawaguchi T, Osatomi K, Yamashita H, Kabashima T, Uyeda K. Mechanism for fatty acid "sparing" effect on glucose-induced transcription: regulation of carbohydrate-responsive element-binding protein by AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem.* 2002; 277(6):3829-35. doi: 10.1074/jbc.M107895200.
89. Dentin R, Benhamed F, Pégrier JP, Foullet F, Viollet B, Vaulont S, et al. Polyunsaturated fatty acids suppress glycolytic and lipogenic genes through the inhibition of ChREBP nuclear protein translocation. *J Clin Invest.* 2005; 115(10):2843-54. doi: 10.1172/JCI25256.
90. Elin RJ, Hosseini JM. Is the magnesium content of nuts a factor for coronary heart disease? *Arch Intern Med.* 1993; 153(6):779-80. doi:10.1001/archinte.1993.00410060079014
91. Croitoru A, Ficai D, Craciun L, Ficai A, Andronescu E. Evaluation and Exploitation of Bioactive Compounds of Walnut, *Juglans regia*. *Curr Pharm Des.* 2019; 25(2):119-131. doi: 10.2174/1381612825666190329150825.
92. Pomposiello SI, Alva M, Wilde DW, Carretero OA. Linoleic acid induces relaxation and hyperpolarization of the pig coronary artery. *Hypertension.* 1998; 31(2):615-20. doi: 10.1161/01.hyp.31.2.615.
93. Gurley SB, Allred A, Le TH, Griffiths R, Mao L, Philip N, et al. Altered blood pressure responses and normal cardiac phenotype in ACE2-null mice. *J Clin Invest.* 2006; 116(8):2218-25. doi: 10.1172/JCI16980.
94. Hernández Prada JA, Ferreira AJ, Katovich MJ, Shenoy V, Qi Y, Santos RA, et al. Structure-based identification of small-molecule angiotensin-converting enzyme 2 activators as novel antihypertensive agents. *Hypertension.* 2008; 51(5):1312-7. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.107.108944.
95. Murça TM, Moraes PL, Capurço CA, Santos SH, Melo MB, Santos RA, et al. Oral administration of an angiotensin-converting enzyme 2 activator ameliorates diabetes-induced cardiac dysfunction. *Regul Pept.* 2012; 177(1-3):107-15. doi: 10.1016/j.reg-pep.2012.05.093.
96. Ulu A, Harris TR, Morisseau C, Miyabe C, Inoue H, Schuster G, et al. Anti-inflammatory effects of ω -3 polyunsaturated fatty acids and soluble epoxide hydrolase inhibitors in angiotensin-II-dependent hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2013; 62(3):285-97. doi: 10.1097/FJC.0b013e318298e460.
97. Clarke NE, Belyaev ND, Lambert DW, Turner AJ. Epigenetic regulation of angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) by SIRT1 under conditions of cell energy stress. *Clin Sci (Lond).* 2014; 126(7):507-16. doi: 10.1042/CS20130291.
98. Bundalo M, Zivkovic M, Culafic T, Stojiljkovic M, Koricanac G, Stankovic A. Oestradiol Treatment Counteracts the Effect of Fructose-Rich Diet on Matrix Metalloproteinase 9 Expression and NF κ B Activation. *Folia Biol (Praha).* 2015; 61(6):233-40.
99. Zhang T, Dai Y, Zhang L, Tian Y, Li Z, Wang J. Effects of Edible Oils with Different n-6/n-3 PUFA Ratios on Articular Cartilage Degeneration via Regulating the NF- κ B Signaling Pathway. *J Agric Food Chem.* 2020; 68(45):12641-12650. doi: 10.1021/acs.jafc.0c05240.
100. Weldon SM, Mullen AC, Loscher CE, Hurley LA, Roche HM. Docosahexaenoic acid induces an anti-inflammatory profile in lipopolysaccharide-stimulated human THP-1 macrophages more effectively than eicosapentaenoic acid. *J Nutr Biochem.* 2007; 18(4):250-8. doi: 10.1016/j.jnutbio.2006.04.003.
101. Gencoglu H, Orhan C, Tuzcu M, Sahin N, Juturu V, Sahin K. Effects of walnut oil on metabolic profile and transcription factors in rats fed high-carbohydrate-/fat diets. *J Food Biochem.* 2020; 44(7):e13235. doi: 10.1111/jfbc.13235.



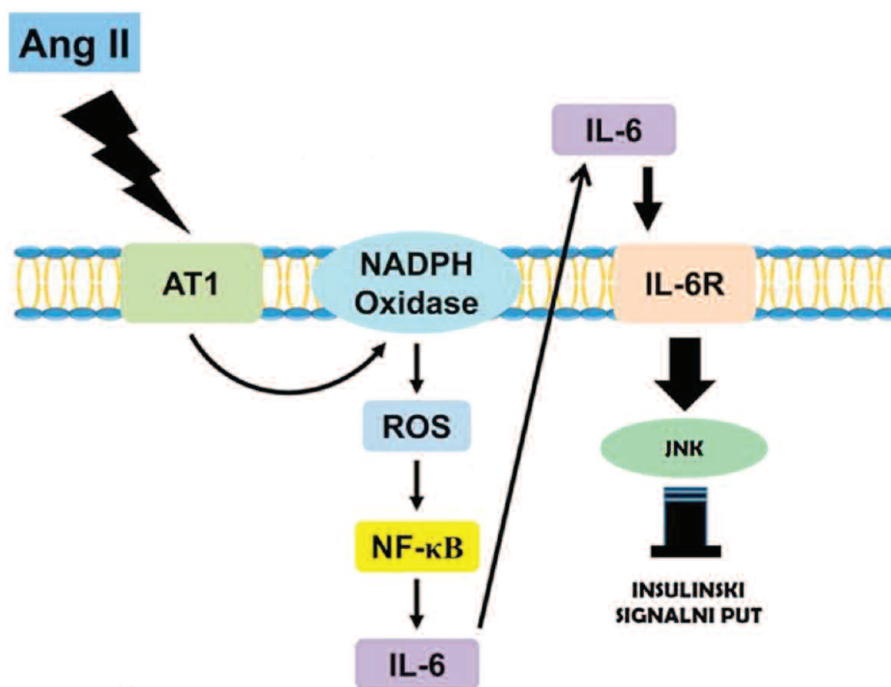
Slika 1. Metabolizam fruktoze i glukoze (preuzeto i modifikovano sa https://www.researchgate.net/figure/Hepatic-fructose-metabolism-provides-substrate-for-multiple-metabolic-pathways-Ingested_fig1_319507329)



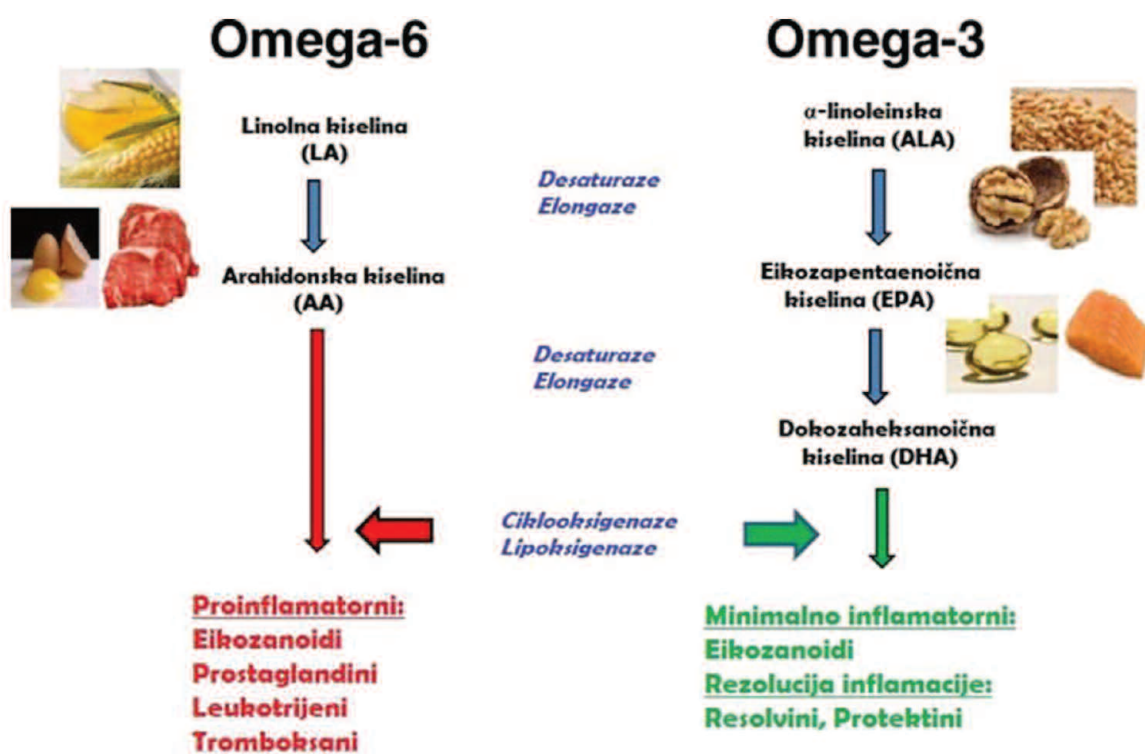
Slika 2. AMPK-SIRT1-FoxO3a-MnSOD/katalaza antioksidativna osa i njeni regulatori



Slika 3. Renin-angiotenzin sistem (RAS) (preuzeto i modificovano sa <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3022115/figure/F1/?report=objectonly>)



Slika 4. Veza između RAS-a, oksidativnog stresa i inflamacije u metaboličkom sindromu (preuzeto i modificovano sa <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2213231717300666>)



Slika 5. Nutritivni izvori i metabolički putevi omega-6 i omega-3 PUFA, i njihovi proinflamatorni i antiinflamatorni produkti (preuzeto i modifikovano sa <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4418048/figure/Fig1/>)

PHACTR1 u kardiovaskularnim bolestima: od studija asocijacije na celokupnom genomu do funkcionalnih studija

Jovana Kuveljić, Tamara Djurić

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

Kontakt: jovana@vin.bg.ac.rs

Apstrakt

Gen za regulator protein fosfataze i aktina 1 (eng. *protein phosphatase and actin regulator 1, PHACTR1*) je ušao u žižu interesovanja kada je u studijama asocijacije na celokupnom genomu pokazao značajnu povezanost sa različitim fenotipovima kardiovaskularnih bolesti (KVB). Nekoliko validacionih studija je istaklo uticaj varijanti gena *PHACTR1* na koronarnu bolest, infarkt miokarda, kalcifikaciju arterija i disekciju cervikalnih arterija. Vodeća varijanta rs9349379 je pokazala protektivan ili štetan efekat na KVB, jasno definišući podelu na bolesti u čijoj osnovi je ateroskleroza i one do kojih dovode drugi procesi. U srpskoj populaciji, analiziran je haplotipski efekat tri varijante gena *PHACTR1*, rs9349379 A/G, rs2026458 C/T i rs2876300 A/G, na aterosklerozi karotidnih i koronarnih arterija, kao i njihov efekat na transkripciju gena *PHACTR1* u karotidnom plaku i mononuklearnim ćelijama periferne krvi. Na ovom polju se vodi dugogodišnja polemika oko toga da li je varijanta rs9349379 povezana sa KVB preko funkcionalnog uticaja na *PHACTR1* ili na gen za endotelin 1, *EDN1*. U funkcionalnim studijama je predloženo nekoliko mehanizama delovanja *PHACTR1* na kardiovaskularni sistem imajući u vidu da interaguje sa dva esencijalna ćelijska proteina, protein fosfatazom 1 i G-aktinom. U ovom radu dat je pregled dosadašnjih istraživanja *PHACTR1* u KVB.

Ključne reči: *PHACTR1*; kardiovaskularne bolesti; ateroskleroza; studije asocijacije na celokupnom genomu; genska varijanta; haplotip

***PHACTR1* in cardiovascular diseases: from genome-wide association studies to functional studies**

Jovana Kuveljić, Tamara Djurić

Laboratory for Radiobiology and Molecular Genetics, "Vinča" Institute of Nuclear Sciences,
National Institute of the Republic of Serbia, University of Belgrade, Belgrade

Correspondence: jovana@vin.bg.ac.rs

Abstract

Protein phosphatase and actin regulator 1 (*PHACTR1*) gene entered the spotlight when it showed a significant association with various phenotypes of cardiovascular diseases (CVD) in genome-wide association studies. Several validation studies have highlighted the impact of *PHACTR1* variants on coronary artery disease, myocardial infarction, arterial calcification, and cervical artery dissection. The leading *PHACTR1* variant rs9349379 showed a protective or pathogenic effect on CVD, clearly defining the division into atherosclerosis-based diseases and those caused by other processes. In Serbian population, analysis has been conducted on haplotype effect of three *PHACTR1* gene variants, rs9349379 A/G, rs2026458 C/T and rs2876300 A/G, on carotid and coronary atherosclerosis, as well as their effect on *PHACTR1* mRNA level in carotid plaque tissue and peripheral blood mononuclear cells. However, there is a long-standing controversy about whether the rs9349379 variant is associated with CVD through a functional effect on *PHACTR1* or on the endothelin 1 gene, *EDN1*. Several mechanisms of action of *PHACTR1* on the cardiovascular system have been proposed in functional studies, considering that it interacts with two essential cellular proteins, protein phosphatase 1 and G-actin. This paper provides an overview of the up to date research conducted on the *PHACTR1* in CVD.

Key words: *PHACTR1*; cardiovascular diseases; atherosclerosis; GWAS; gene variant; haplotype

Uvod

Prema poslednjim podacima Svetske zdravstvene organizacije, u svetu godišnje od posledica kardiovaskularnih bolesti (KVB) umre blizu 18 miliona ljudi, a od toga su u 85% smrtnih ishoda uzročnici infarkt miokarda ili cerebrovaskularni insult. KVB su vodeći uzrok smrtnosti i u Srbiji gde su tokom 2021. godine bile uzročnik preko 40% smrtnih ishoda (<http://www.batut.org.rs/download/publikacije/AKS2021.pdf>).

U osnovi većine KVB nalazi se ateroskleroza, hronična, kompleksna, poligenska, inflamatorna bolest krvnih sudova. Razvoj ateroskleroze započinje u ranoj životnoj dobi i traje dugi niz godina. Ključni procesi u patogenezi ateroskleroze su: endotelna disfunkcija, nakupljanje oksidovanih lipida [1], inflamacija [2], transformacija makrofaga u penaste ćelije [3], remodelovanje vanćelijskog matriksa i formiranje aterosklerotskog plaka [4]. Ateroskleroza koronarnih arterija dovodi do zakrčenja arterija koje snabdevaju srce nutrijentima i kiseonikom i omogućavaju funkcionisanje srčanog mišića. Usled nedostatka kiseonika, kardiomiociti odumiru i dolazi do ishemijske povrede srca, odnosno infarkta miokarda (IM) (srčani udar). Nakon IM dolazi do procesa remodelovanja tkiva, koji je u prvoj fazi protektivan proces, ali ako se produži može dovesti do hroničnog narušavanja strukture i funkcije srca [5]. Ateroskleroza karotidnih arterija onemogućava dotok kiseonika i hranljivih materija u prednji deo moždanih hemisfera, optičke nerve i retinu, usled čega dolazi do odumiranja neurona i ishemijskog cerebrovaskularnog insulta (CVI) (moždani udar/šlog) [6]. Tradicionalni faktori rizika za razvoj ateroskleroze su starenje, pol, nivo lipida i šećera u krvi, krvni pritisak, pušenje, ishrana, gojaznost, kao i genetički faktori povezani sa njima [7]. Ipak, većina genskih varijanti za koje je utvrđeno da nose deo genetičkog rizika za KVB nalaze se u okviru gena čiji je tačan uticaj na KVB nepoznat. Jedan od gena za koji se ne zna tačan mehanizam dejstva, a koji je bio izrazito asociiran sa aterosklerozom koronarnih arterija i IM [8], je regulator protein fosfataze i aktina 1 (eng. *protein phosphatase and actin regulator 1*, PHACTR1).

Regulator protein fosfataze i aktina 1 (PHACTR1)

Protein PHACTR1

Regulator protein fosfataze i aktina 1 može da interaguje sa protein fosfatazom 1 i G-aktinom [9]. C-terminalni region, zadužen za vezivanje protein fosfataze 1, evolutivno je očuvan kod sva četiri člana ove familije aktin vezujućih regulatora protein fosfataze 1. PHACTR1 poseduje tri RPEL motiva, za koje se vezuje G-aktin, u C-terminalnom regionu i jedan u N-terminalnom regionu. Na oba kraja proteina nalaze se NLS (eng. *nuclear localisation signals*) sekvence [10]. Protein fosfataza 1 (eng. *protein phosphatase 1*, PP1) je enzim uključen u širok spektar fizioloških procesa. Ova serin/treonin fosfataza se sastoji od jedne katalitičke subjedinice (PP1c) i više subjedinica koje svojim vezivanjem za PP1c određuju mesto njene aktivnosti u ćeliji i/ili supstrat na koji će delovati. Postoji preko pedeset ovakvih subjedinica i većina njih poseduje karakterističan domen (RVxF) kojim vezuje PP1c [11]. PHACTR1, takođe ima sličan domen za vezivanje PP1c, LIRF, koji se preklapa sa trećim aktin vezujućim RPEL3 motivom, zbog čega i postoji kompeticija između G-aktina i PP1c [12]. U citoplazmi, kada je koncentracija slobodnog G-aktina velika, dolazi do vezivanja G-aktina za PHACTR1, a onemogućeno je vezivanje PP1c, kao i interakcija importina α - β sa NLS sekvencama i translokacija PHACTR1 u jedro. Nakon Rho-indukovane polimerizacije G-aktina u F-aktin PHACTR1 ulazi u jedro, gde je slobodan da veže PP1c i indukuje formiranje aberantnih aktomiozinskih struktura [10]. U jedru PHACTR1 deluje kao supstrat specifični aktivator protein fosfataze 1, a inhibira aktivnost PP1 prema njenom najčešćem supstratu, fosforilazi a [9]. Jedarni supstrati PHACTR1/PP1c holoenzima uglavnom su komponente citoskeleta i njihovi regulatori. Vezivanjem PHACTR1 C-terminalnog regiona za PP1c formira se novo specifično katali-

tičko mesto, usled rearanžmana hidrofobnog džepa PP1c [12]. Primarna struktura PHACTR1 poseduje osam mesta za fosforilaciju protein kinazom A i sedam za fosforilaciju protein kinazom C, lokalizovanih oko RPEL motiva. Fosforilacijom ovih mesta, potencijalno se na još jedan način menja interakcija PHACTR1 sa aktinom i vrši regulacija veze PP1c sa supstratom [9].

Gen *PHACTR1*

Gen *PHACTR1* ima preko petstosedamdesethiljada baznih parova i nalazi se na kratkom kraku hromozoma šest, na poziciji 6p24.1. Pokazano je da se sa gena *PHACTR1* može prepisati šest protein-kodirajućih transkripata [13]. Najduži transkript gena *PHACTR1* kodira protein od 580 ak. Njegova transkripcija počinje u egzonu 4 i dobijeni transkript ima 1743 bp. Kratki transkript gena *PHACTR1* je dugačak 435 bp i kodira protein od 144 ak. Početak transkripcije kratkog transkripta je u egzonu 14, koji ostali transkripti ne poseduju. Kratki transkript detektovan je samo u imunskim ćelijama, monocitima. Gen *PHACTR1* daje četiri transkripta srednje dužine: A+, A-, B+ i B-. Oba A transkripta polaze sa egzona 7, koji se ne prepisuje kod ostalih transkripata, dok B transkripti srednje dužine polaze sa egzona 8. Transkripti A+ i B+ poseduju dodatni egzon koji nije prepisan kod ostalih transkripata. Transkripti srednje dužine daleko su prisutniji, mogu se detektovati u makrofagima, endotelskim ćelijama (EĆ) i glatkim mišićnim ćelijama (GMĆ) i različitim tkivima. Svi transkripti gena *PHACTR1* sadrže C-terminalni domen za interakciju sa PP1c, koji je izrazito konzerviran region.

Protein PHACTR1 je najviše zastupljen u mozgu, a zatim slede pluća i testisi, prema bazama podataka, dok je iRNK *PHACTR1* najviše zastupljena u mozgu i krvi, a zatim u srcu i plućima [14]. Slična zapažanja proistekla su i iz pojedinačnih studija na animalnim modelima i humanim panelima tkivnih uzoraka. Najviši nivo transkripcije gena *PHACTR1*, kod miša, bio je otkriven u mozgu, plućima, aorti, bubrezima i srcu [15]. Transkripti *PHACTR1* bili su detektovani i u vaskularnom tkivu miša, u mišijim EĆ i GMĆ, kao i u aterosklerotskim lezijama [16]. Kod pacova, iRNK *PHACTR1* bila je uočena u najvećem obimu u mozgu, ali je bila prisutna i u srcu, plućima, testisima i bubrezima, dok je protein PHACTR1 bio detektovan samo u mozgu [9]. Relativni nivo transkripcije gena *PHACTR1*, u humanim tkivima, bio je visok u srcu, aorti i mozgu, a najviši u srcu nakon infarkta miokarda [17]. Prisustvo proteina PHACTR1, u arterijama zdravih ispitanika, bilo je detektovano u endotelskim i imunskim ćelijama, ali ne i u vaskularnim glatkim mišićnim ćelijama [18]. U arterijama obolelih od ateroskleroze, protein PHACTR1 bio je lokalizovan u aterosklerotskom plaku, ponajviše u makrofagima i penastim ćelijama, nešto manje u EĆ [18], i izuzetno slabo u GMĆ koronarnih arterija [13]. Do skoro se smatralo da se dugački transkript može detektovati isključivo u mozgu [13, 18], ali je nedavno u makrofagima iz periferne krvi detektovan protein PHACTR1 koji potiče sa dugačkog transkripta [19]. Kratki transkript javlja se samo u imunskim ćelijama, ali protein generisan sa kratkog transkripta do sada nije detektovan.

Studije asocijacije

U HapMap projektu je identifikovano i mapirano preko tri miliona genskih varijanti u humanom genomu [20], što je omogućilo razvoj novih metoda, a među njima i studija asocijacije na celokupnom genomu (eng. *Genome-Wide Association Studies*, GWAS) (GWA studije) koje analiziraju izuzetno veliki broj genskih varijanti tipa izmene jednog nukleotida (eng. *single nucleotide variant*) duž celog genoma [21]. Prve GWA studije primenjene su u kardiovaskularnim bolestima 2007. godine. Tada su tri nezavisne studije asociirale lokus 9p21 sa povećanim rizikom za nastanak koronarne bolesti (KB) i infarkta miokarda [22-24]. Do danas GWA studije su otkrile 163 nova lokusa u asocijaciji sa KB [25] i pokazale da najveći procenat genetičke varijabilnosti KB nose upravo česte nekodirajuće genske varijante (**Slika 1**), odnosno njihov kumula-

tivni efekat, jer u proseku svaka od ovih varijanti nosi malu genetičku varijabilnost, oko 8%. Zajedno sa nekoliko stotina varijanti pri čijem otkrivanju je prag lažno pozitivnih rezultata podignut na 5% (eng. false discovery rate, FDR), ovih 163 novih lokusa, su odgovorni za oko 40% genetičke varijabilnosti KB.

Gen *PHACTR1* pojavio se u sferi interesovanja istraživača koji proučavaju KVB 2009. godine kada je prvi put genska varijanta iz lokusa 6p24 povezana sa ranim infarktom miokarda. Kathiresan i sar. [8] su u velikoj GWA studiji, koja je u poslednjoj fazi obuhvatila dvadeset pet hiljada ispitanika, pokazali da je varijanta rs12526453 u genu *PHACTR1* dostigla predodređenu GWAS značajnost ($p < 5 \times 10^{-8}$) u asocijaciji sa ranim IM. Konzorcijum CARDIoGRAM je 2011. godine, okupio dvadeset dve hiljade ispitanika sa koronarnom bolešću i skoro tri puta više zdravih ispitanika evropskog porekla u najvećoj do tada GWA studiji iz oblasti kardiovaskularnih bolesti [26]. U ovoj studiji validirana je asocijacija lokusa 6p24 sa koronarnom bolesti preko varijante rs12526453, u genu *PHACTR1*. Paralelno, u GWA studiji C4D konzorcijuma na preko četrdeset hiljada ispitanika [27], varijanta rs9349379 u genu *PHACTR1*, je bila najjače asociirana genska varijanta sa KB, što ukazuje na to da je rs9349379 potencijalno bolji marker asocijacije lokusa 6p24 i gena *PHACTR1* sa KB. Iste godine, O'Donnel i sar. su pokazali asocijaciju varijanti rs9349379, rs2026458 i rs12526453, u genu *PHACTR1*, sa kalcifikacijom koronarnih arterija (KKA) na skoro deset hiljada učesnika u GWA studiji [28]. Varijante koje su pokazale značajnu povezanost sa KKA, validirane su i u GWA studiji sa preko trideset četiri hiljade ispitanika, od kojih je skoro sedam hiljada imalo IM [28]. Među njima se varijanta rs9349379 u genu *PHACTR1* izdvojila kao genska varijanta najjače asociirana sa IM. Pechlivanis i sar. potvrdili su asocijaciju rs9349379, rs2026458 i rs12526453 sa KKA i istakli varijantu rs9349379 kao vodeću [29]. Bevan i sar. su 2012. godine ispitivali asocijaciju cerebrovaskularnog insulta i genskih varijanti, prethodno povezanih, u GWA studijama, sa različitim fenotipovima KB. Varijanta rs12526453 u genu *PHACTR1* asociirana je sa CVI, na uzorku od deset hiljada ispitanika, od kojih je četiri hiljade imalo akutni događaj CVI [30]. Udruženi konzorcijumi CARDIoGRAMplusC4D, 2012. godine, dostigli su preko 190000 ispitanika, a u studiji je identifikovano petnaest novih lokusa potencijalno značajnih za nastanak i razvoj koronarne bolesti [31]. Dodatna ispitivanja u ovoj studiji ukazala su na to da *PHACTR1* lokus ne pokazuje značajnu asocijaciju ni sa jednim od puteva povezanih sa tradicionalnim faktorima rizika [31].

GWA studije su značajne jer mogu ukazati na nove pravce istraživanja, ali zahtevaju validaciju rezultata i funkcionalne studije pogotovo kada ukazuju na gene koji ranije nisu povezivani sa ispitivanim fenotipom i faktorima rizika. Nakon GWA studija razvijeni su različiti tipovi studija koje su ispitivale funkcionalnost novo-otkivenih varijanti. Za razliku od GWA studija koje su tražile asocijaciju jednog fenotipa među hiljadama varijanti, studije asocijacije genskih varijanti sa fenotipom (eng. *Phenome-Wide Association Studies*, PheWAS), polazile su od genske varijante i tražile asocijaciju među hiljadama dobro definisanih fenotipova [32]. PheWA studija potvrdila je asocijaciju genske varijante rs9349379 sa koronarnom bolešću i migrenom [33]. Zatim su usledile studije bazirane na drugom Mendelovom zakonu o slučajnom izboru (eng. *Mendelian Randomization (MR) Studies*) kojima je cilj bio da utvrde da li je asocijacija između biomarkera/genske varijante i fenotipa/bolesti uzročno-posledična [34]. Jedan od osnovnih preduslova za ispitivanje u MR studiji bio je da genska varijanta utiče samo na jedan fenotip, tj. da nije plejotropna. Samim tim većina varijanti iz GWA studija, uključujući i varijante u genu *PHACTR1*, nisu odgovarale uslovima MR studija. Takođe, studije asocijacije celokupnog egzoma (eng. *Exome-Wide Association Studies*, EWAS) [35], nisu imale značaja za *PHACTR1* lokus, imajući u vidu da nijedna genska varijanta iz ovog regiona, koja je do sada bila asociirana sa KVB, nije u protein-kodirajućim regionima [17].

Katalog GWA studija [36] je, u aprilu 2023. godine, pokazao da su 62 varijante u genu *PHACTR1* asociirane sa 156 humanih osobina ili stanja (bolesti) u skoro 134 GWA studija. Najveći broj asocijacija bio je sa

stanjima vezanim za kardiovaskularni sistem, a posebno za koronarnu bolest, a samo nekolicina varijanti povezana je sa više različitih stanja ili asocirana sa istim stanjem u više studija. Varijanta rs9349379 istakla se kao vodeća genska varijanta u *PHACTR1* lokusu (**Slika 2**) i asocirana je najčešće sa koronarnom bolešću [27, 31], pa zatim sa kalcifikacijom koronarnih arterija [28], sistolnim krvnim pritiskom [37], disekcijom cervikalnih arterija [38], i migrenom [39]. Varijanta rs12526453 prva je varijanta gena *PHACTR1* koja je asocirana sa kardiovaskularnim fenotipom, i to sa ranim IM [8], zatim je povezana sa koronarnom bolešću [26], kalcifikacijom koronarnih arterija [28] i cerebrovaskularnim insultom [30]. Genska varijanta rs2026458 asocirana je sa kalcifikacijom koronarnih arterija [28, 29], kao značajnim faktorom rizika za razvoj i progresiju ateroskleroze.

U srpskoj populaciji, analiziran je haplotipski efekat tri varijante gena *PHACTR1*, rs9349379 A/G, rs2026458 C/T i rs2876300 A/G, na aterosklerozi karotidnih i koronarnih arterija [40, 41]. Generalno, ispitivanje genskih varijanti u haplotipu daje veću snagu studiji, pruža direktni uvid u odnos ispitivanih varijanti na hromozomu i omogućava uspostavljanje asocijacije kompleksne bolesti sa multi-alelnim genskim markerom. Kod ispitanika sa aterosklerozom karotidnih arterija, Kuveljić i sar. su pokazali značajnu i nezavisnu asocijaciju haplotipa ACA, varijanti gena *PHACTR1*, sa prisustvom karotidnog plaka u odnosu na referentni haplotip GTA [40]. Ipak, kod ispitanika sa aterosklerozom koronarnih arterija, nije bilo značajne asocijacije između varijanti u genu *PHACTR1* i prvog IM ni pojedinačno ni u haplotipu [41]. Ovakav rezultat dobijen je i u GWA studiji CHARGE konzorcijuma, gde na znatno većem broju ispitanika nije pokazana asocijacija gena *PHACTR1* ni sa IM, ni sa KB [42]. Na početku ove prospektivne studije dvadeset četiri hiljade ispitanika bilo je bez KB i IM da bi nakon, u proseku, osam godina 10% ispitanika razvilo KB, a više od 6% doživelo IM. Ni u jednoj od ovih grupa ispitanika nije pokazana asocijacija sa genskom varijantom iz *PHACTR1* lokusa [42]. Kuveljić i sar. su se, zatim, osvrnuli na uticaj *PHACTR1* varijanti na proces remodelovanja leve komore srca tokom 6 meseci od IM, međutim nisu pokazali asocijaciju sa promenom ehokardiografskih parametara strukture i funkcije leve komore srca [41]. U studiji Kelloniemi i sar. varijanta rs12526453 gena *PHACTR1* nije imala statistički značajan uticaj na ehokardiografske parametre strukture i funkcije leve komore srca [43]. U istoj studiji Kuveljić i sar. su pokazali asocijaciju ređeg alela G varijante rs2876300 gena *PHACTR1* sa višesudovnom bolešću (VSB) srca [41], koja predstavlja teži oblik bolesti, jer je povezana sa većom smrtnošću u odnosu na jednosudovnu bolest [44]. Slična asocijacija pokazana je u libanskoj populaciji između varijanti u genu *PHACTR1* i broja krvnih sudova sa stenozom [45], gde je jačina asocijacije rasla sa brojem krvnih sudova koji su imali stenozu.

Pleiotropni efekat gena *PHACTR1* ogleda se u asocijaciji varijante rs9349379 sa više različitih fenotipova (**Slika 3**). Njen ređi alel G asociran je sa rizikom za razvoj KV fenotipova u čijoj osnovi je ateroskleroza, kao što su koronarna bolest, IM i KKA. Dok, je sa druge strane alel A povezan sa rizikom za fenotipove u čijoj etiologiji nije ateroskleroza, kao što su fibromuskularna displazija (FMD) [46], disekcija cervikalnih arterija [38], spontana disekcija koronarnih arterija [47] i migrena [39, 48]. FMD je neinflamatorna, neaterosklerotska bolest srednjih krvnih sudova, a često je neidentifikovan uzrok hipertenzije ili cerebrovaskularnog insulta. U studiji Kiando i sar. na uzorku od četrsto ispitanika sa FMD i oko dve i po hiljade zdravih ispitanika pokazana je asocijacija alela A varijante rs9349379 sa povećanim rizikom za FMD [46]. Migrena, aneurizma i disekcija arterija mogu biti kliničke manifestacije FMD i češće su kod obolelih od FMD, nego u opštoj populaciji. Pleiotropni efekat genske varijante rs9349379 najbolje je oslikan u meta-analizi u kojoj su upoređene GWA studije CARDIoGRAM i C4D konzorcijuma sa GWA studijom o migreni [49], gde je *PHACTR1* lokus pokazao najjaču asocijaciju sa oba fenotipa. Moguće je da genska varijanta rs9349379 ima biološki efekat koji rezultuje različitim posledicama u KV bolestima, kao što na primer, proces ateroskleroze vodi zadebljanju zida arterije i smanjenju

njene elastičnosti, što sa druge strane smanjuje predispoziciju za nastanak povreda u zidu arterije, koje su glavno obeležje disekcije arterije.

Transkripcija gena *PHACTR1*

Uticaj varijanti gena *PHACTR1* na njegovu transkripciju ispitivan je u nekoliko studija. U većini studija pokazano je da je vodeća varijanta rs9349379 eQTL (eng. *expression quantitative trait locus*) za gen *PHACTR1* [17]. Ipak, bila je dovoljna jedna studija koja to nije potvrdila [33], da se pokrene dugogodišnja polemika na temu da li je varijanta rs9349379 povezana sa KVB preko funkcionalnog uticaja na *PHACTR1* ili na gen za endotelin 1, *EDN1*.

Beaudoin i sar. [17] dokazali su, na uzorku od 25 koronarnih arterija, da varijanta rs9349379 značajno utiče na transkripciju gena *PHACTR1*. U eksperimentu na HUVEC nuklearnim ekstraktima su pokazali da ređi alel G narušava mesto vezivanja transkripcionog faktora MEF2A (eng. *myocyte enhancer factor 2A*), čime dovodi do smanjenja transkripcije gena *PHACTR1* [17]. Transkripcioni faktor MEF2A [50] reguliše rani razvoj kardiovaskularnog sistema kroz procese proliferacije ćelija, diferencijacije mišića i apoptoze. Takođe, prema njihovim rezultatima varijanta rs9349379, u koronarnim arterijama, nije cis-eQTL ni za jedan od protein-kodirajućih gena koji se nalaze na udaljenosti od 1 Mb oko varijante, uključujući gen *EDN1*, kao i još 7 gena: *GFOD1*, *HIVEP1*, *MCUR1*, *NOL7*, *RanBP9*, *SIRT5* i *TBC1D7*. Aguet i sar. su ispitali uticaj varijante rs9349379 na transkripciju gena *PHACTR1* u 44 tkiva iz baze podataka GTEx (eng. *Genotype-Tissue Expression Project* [51]) i pokazali da rs9349379 deluje kao tkivno-specifični eQTL za gen *PHACTR1* u aorti, tibijalnoj i koronarnoj arteriji [52]. U ispitivanim tkivima varijanta rs9349379 je pokazala i uticaj na transkripciju nekodirajuće RNK *RP1-257A7.5* i gena *TBC1D7* [52], ali ne i gena *EDN1*. Sličan rezultat dobili su i Kiando i sar. na kulturi ćelija humanih fibroblasta, gde su pokazali da češći alel A varijante rs9349379 povećava transkripciju gena *PHACTR1* [46]. U studiji u kojoj je proučavana uloga *PHACTR1* varijanti u aterosklerozi karotidnih arterija, Kuveljić i sar. su pokazali asocijaciju haplotipa ACG sa značajno povišenom transkripcijom gena *PHACTR1* u karotidnom plaku, u poređenju sa referentnim haplotipom GTA [40]. Isti haplotip, ACG, asociirali su sa povišenim nivoom transkripcije gena *PHACTR1* i u mononuklearnim ćelijama periferne krvi (MČPK) ispitanika sa aterosklerozom koronarnih arterija šest meseci nakon IM [41]. Haplotip ACG sastoji se od intronskih varijanti rs9349379 A/G, rs2026458 C/T i rs2876300 A/G gena *PHACTR1*, a prema podacima GTEx projekta [51], svaki od alela u haplotipu ACG pojedinačno dovodi do povećanja nivoa transkripcije gena *PHACTR1* u aorti i tibijalnoj arteriji. Prema bazama podataka varijante rs9349379 i rs2876300 nalaze se u okviru genskih pojačivača transkripcije (eng. *gene enhancer*, GH) i potencijalno imaju uticaj na regulaciju transkripcije, bilo preko interakcije sa hromatinom ili izmenom vezujućeg mesta transkripcionih faktora [53]. Pojačivač transkripcije, GH06J012893, u okviru kojeg se nalazi varijanta rs2876300 u mogućnosti je da veže dvadeset četiri transkripcionih faktora i da učestvuje u regulaciji transkripcije pet gena, uključujući gen *PHACTR1*. Genska varijanta rs9349379 nalazi se u okviru pojačivača transkripcije, GH06J012903, koji reguliše transkripciju šest gena [53]. U okviru ENCODE projekta je na uzorku od četiri tkiva aorte [54], pokazano da postoji acetilacija lizina 27 na histonu 3 (H3K27ac) u hromatinu na mestu varijante rs9349379, što je epigenetsko obeležje aktivnog pojačivača transkripcije. Od svih gena čiju transkripciju su u mogućnosti da regulišu dva pomenuta pojačivača transkripcije, jedino je *PHACTR1* protein-kodirajući gen, ostali geni kodiraju mikroRNK (miRNK) i dugačke nekodirajuće RNK (eng. *long non-coding RNA*, lncRNA). Imajući u vidu da su miRNK i lncRNK značajni regulatorni faktori, nije isključeno da bi ispitivane varijante mogle preko njih da utiču na kardiovaskularni sistem.

Opsežna analiza lokusa 6p24 koju su sprovedi Gupta i sar., takođe je izdvojila gensku varijantu rs9349379 kao vodeću u ovom lokusu [33], ali je njihova studija jedina koja je do sada pokazala da varijanta rs9349379

utiče na transkripciju gena *EDN1*, a ne utiče na transkripciju gena *PHACTR1*. Gen *EDN1* lociran je kao i *PHACTR1* na hromozomu 6p24.1, a udaljen je 600 Kb od varijante rs9349379. Poznato je da se različitim hromatinskim rearanžmanima udaljeni regioni mogu dovesti u blizak položaj, ipak prema sprovedenim istraživanjima Gupta i sar., u ovom slučaju je to izuzetno malo verovatno, te je predloženo da do kontakta može doći posredno preko regiona pojačivača transkripcije koji se nalazi na pola puta između varijante rs9349379 i gena *EDN1* [33]. Studija je urađena na indukovanim pluripotentnim matičnim ćelijama diferenciranim u vaskularne ćelije endotela i glatke mišićne ćelije pri čemu je *EDN1* eQTL efekat bio pedeset puta izraženiji u endotelskim ćelijama. U predloženom mehanizmu regulatornog uticaja varijante rs9349379 na gen *EDN1*, dotakli su se plejotropnog efekta na vaskularne bolesti sa kojima je lokus 6p24 asociran. Prema Gupta i sar., povećanje transkripcije gena *EDN1* preko ređeg alela G varijante rs9349379 vodilo je povećanju nivoa proteina EDN1. Vezivanje proteina EDN1 za receptor EDN1A na vaskularnim endotelnim ćelijama dovodi do vazokonstrikcije, proliferacije, produkcije vanćelijskog matriksa i fibroze, što su sve procesi koji doprinose progresiji ateroskleroze i povećavaju rizik za razvoj koronarne bolesti i infarkta miokarda, a paralelno smanjuju rizik od disekcije cervikalne arterije, fibromuskularne displazije i migrene. Sa druge strane, vezivanje EDN1 za receptor EDN1B dovodi do produkcije NO i prostaciklina i posledične vazodilatacije, diureze i natriureze, i tako posredno do smanjenja rizika od nastanka hipertenzije. Ipak, nakon što su Wang i Musunuru replicirali eksperiment Gupta i sar. i nisu dobili isti rezultat [55] postalo je jasno da će biti potrebno još istraživanja da bi se tačno utvrdila veza varijante rs9349379 sa KVB. Wang i Musunuru koristili su isti tip ćelija - humane vaskularne endotelne ćelije i istu metodu - CRISPR/Cas9, i njihovo istraživanje je još jedna potvrda da je varijanta rs9349379 eQTL za gen *PHACTR1*. Takođe, kod Kuveljić i sar., kao i u još nekoliko studija [17, 55], varijanta rs9349379 nije imala statistički značajan uticaj na transkripciju gena *EDN1*, u MČPK ispitanika sa IM, ni pojedinačno ni u haplotipu sa genskim varijantama rs2026458 i rs2876300 [41].

Funkcionalne studije

Nekoliko istraživačkih grupa ispitalo je moguće mehanizme delovanja *PHACTR1* u organizmu i proučavalo direktnu ulogu *PHACTR1* u kardiovaskularnom sistemu. Pošli su od utvrđenih podataka da je *PHACTR1* lokus asociran sa kardiovaskularnim bolestima i aterosklerozom koja leži u osnovi mnogih KVB, kao i činjenice da protein *PHACTR1* po svojoj strukturi može da interaguje sa dva izuzetno značajna ćelijska molekula, protein fosfatazom 1 i G-aktinom [9]. U većini studija kombinovana su istraživanja na animalnim modelima i u kulturama ćelija, ali i proveru uticaja *PHACTR1* varijanti na humanim uzorcima. Funkcionalne studije ukazale su na učešće *PHACTR1* u različitim procesima u organizmu, kako fiziološkim, tako i patološkim. Učešće gena i proteina *PHACTR1* u procesima kao što su endotelna disfunkcija, inflamacija, kalcifikacija, neovaskularizacija, organizacija citoskeleta i eferocitoza ukazuju na sistemsku povezanost sa procesom ateroskleroze i kardiovaskularnim sistemom. A na ćelijskom nivou, novije studije proširile su polje istraživanja uloge *PHACTR1* u aterosklerotskim procesima i na makrofage koji potiču od monocita, pomerajući fokus sa endotelskih ćelija i glatkih mišićnih ćelija.

Jarray i sar. istraživali su funkcionisanje endotela i proces angiogeneze, pri čemu su otkrili da vaskularni endotelni faktor rasta (eng. *vascular endothelial growth factor*, VEGF), potentni pro-angiogeni faktor, dovodi do povećane transkripcije gena *PHACTR1* u vaskularnim EĆ [56]. U eksperimentu u kome je smanjen nivo iRNK i proteina *PHACTR1* u EĆ, pomoću utišavajućeg konstrukta RNK *PHACTR1*, pokazali su da odsustvo *PHACTR1* dovodi do redukcije formiranja vaskularnih tubula, što je u osnovni procesa angiogeneze. Takođe, primetili su da je odsustvo *PHACTR1* iz EĆ indukovalo aktivaciju različitih pro-apoptotskih faktora, te su predložili da do obustavljanja formiranja tubula krvnih sudova dolazi putem apoptoze [56]. Ista grupa istra-

živača ukazala je na ulogu PHACTR1 u endotelnoj disfunkciji, a preko regulacije funkcije PP1, uključene u proces produkcije NO [57], glavnog vazodilatatora i medijatora fiziološke funkcije endotela. Pokazali su da je utišavanje transkripcije gena *PHACTR1* u EĆ dovelo do smanjenja fosforilišuće aktivnosti PP1 [58], što je prouzrokovalo nedostatak Ca^{2+} u ćeliji, jer je njegov unos preko CREB/ Ca^{2+} zavisnog puta bio obustavljen. A pošto je i fosforilacija CREB i eNOS, posredstvom AMPK [57], takođe bila obustavljena, došlo je do smanjene produkcije NO, što dovodi do endotelne disfunkcije. Jarray i sar. uočili su značajno povišen nivo različitih pro-aterogenih faktora u EĆ u kojima je utišana transkripcija gena *PHACTR1*, kao i poremećenu organizaciju aktinskih filamenata [57] (**Slika 4**).

Kelloniemi i sar. su indukovali IM kod pacova i uvideli da tada dolazi do smanjenja nivoa iRNK i proteina PHACTR1 [43]. Njihov nivo vraćao se na prethodno stanje nakon dve nedelje. Dalja istraživanja bazirana su na ispitivanju efekta povećanja nivoa iRNK i proteina PHACTR1 kod pacova, što je postignuto adenovirusnim konstruktima. Pokazali su da povišen nivo iRNK *PHACTR1* indukuje značajno povećanje vezivanja transkripcionog faktora SRF (eng. *serum response factor*) za DNK. Budući da SRF reguliše gensku ekspresiju proteina koji omogućavaju kontraktilnu funkciju srca, kao što su skeletni α -aktin, srčani α -aktin i teški lanac β -miozina, zaključili su da *PHACTR1* utiče na odnos aktinskih izoformi prisutnih u srčanom tkivu. Kelloniemi i sar. su ispitivali ehokardiografske parametre strukture i funkcije leve komore srca, i uočili da *PHACTR1* ne utiče na njih, ni kod zdravih, ni kod pacova kod kojih je indukovano IM. U studiju je bio uključen i manji broj humanih uzoraka, te je detektovan povišen nivo proteina PHACTR1, ali ne i iRNK, na četiri uzorka srčanog tkiva obolelih od kardiomiopatije u poređenju sa dva uzorka zdravog srčanog tkiva.

Aherrahrou i sar. istraživali su postojanje uzročno-posledične veze između kalcifikacije i nivoa iRNK i proteina PHACTR1 u kulturi GMĆ, poteklih od mišijih vaskularnih EĆ, a takođe i u kulturi GMĆ humane aorte [15]. Pokazali su da pod uticajem kalcifikacije raste nivo transkripcije *PHACTR1*, i u mišijim i u humanim GMĆ. Dodatno su utvrdili, u mišijim GMĆ, da je stepen kalcifikacije direktno proporcionalan nivou transkripcije *PHACTR1*.

Zhang i sar. su ispitivali uticaj oksidativnog stresa na model sistemu endotelnih ćelija humane koronarne arterije [59]. Oksidativni stres indukovano prisustvom oksidovanih lipida u EĆ dovodio je do značajno povišenog nivo iRNK i proteina PHACTR1. Primenom utišavanja transkripcije gena *PHACTR1* u EĆ, pokazali su da odsustvo PHACTR1 smanjuje regrutovanje monocita i ublažava oksidativni stres, tako što dovodi do smanjenja produkcije NO, ali putem smanjenja fosforilacije p47phox, subjedinice NADPH oksidaze (**Slika 4**). Takođe su uočili da PHACTR1, zahvaljujući svojim RPEL domenima, interaguje sa još jednim RPEL proteinom i tako učestvuje u MRTF-A (eng. *myocardin related transcription factor A*) posredovanoj translokaciji p65 u jedro, gde p65 indukuje transkripciju NF- κ B, potentnog proinflamatornog faktora [59]. Na taj način je pokazano da PHACTR1 ima važnu ulogu u indukovanju inflamacije izazvane oksidativnim stresom, odnosno prisustvom oksidovanih LDL u EĆ. Zhang i sar., su jedini do sada uporedili nivo transkripcije gena *PHACTR1* u zdravim karotidnim arterijama i karotidnim arterijama sa prisustvom plaka [59]. Iako na malom uzorku (3 vs. 3), pokazali su da je u obolelim karotidnim arterijama bio povišen nivo iRNK *PHACTR1*. Nivo proteina PHACTR1 takođe je bio povišen u plaku, a najviše je bio prisutan u endotelskim ćelijama [59].

Rubin i sar. su proučavali ulogu *PHACTR1* u razvoju disekcije cervikalnih arterija i fibromuskularne displazije na miševima kojima je *PHACTR1* bio utišan ili u EĆ ili u GMĆ [60]. Međutim, nisu uočili nikakve promene u vaskularnom sistemu kod ovih miševa u odnosu na kontrolnu grupu miševa, čak ni kada su dodatno indukovali hipertenziju ili ishemijsku povredu. Sličan rezultat dobili su Wood i sar. proučavajući miševe sa pro-aterogenom *ApoE^{-/-}* pozadinom. Ipak, u njihovoj studiji je pokazana asocijacija G alela varijante rs9349379 gena *PHACTR1* sa smanjenom elastičnosti uzlazne aorte, što je nezavisni faktor rizika za razvoj koronarne bolesti [61].

Istraživanja na makrofagima dala su novu perspektivu uloge *PHACTR1* u vaskularnom sistemu. Li i sar. su radili na modelu *PHACTR1*^{-/-} miševa (eng. *knockout mice*) i pokazali da odsustvo *PHACTR1* dovodi do progresije ateroskleroze [62]. Primetili su izmenu u fenotipu makrofaga, u korist makrofaga pro-inflamatornog tipa, M1, koji na svojoj površini prikazuju markere TNF- α , IL-6 i iNOS, u odnosu na anti-inflamatorne makrofage, M2, čiji su markeri Arg-1, IL-10 i CD206. Pretpostavka je bila da *PHACTR1* utiče na nivo transkripcije gena uključenih u proces inflamacije, odnosno na MAPK ili CREB signalne puteve koji su regulatori polarizacije makrofaga i njihove transformacije u penaste ćelije [62]. Li i sar. su, dodatno, na uzorku od devedeset ispitanika sa IM i trideset zdravih ispitanika, pokazali da je nivo iRNK *PHACTR1* bio povišen u cirkulišućim monocitima kod ispitanika sa IM u odnosu na ispitanike kontrolne grupe [62]. A takođe je kod ispitanika sa IM primećena izmena u fenotipu makrofaga u korist povećanja broja pro-inflamatornih makrofaga. Nivo iRNK *PHACTR1* u monocitima rastao je sa brojem obolelih koronarnih krvnih sudova, a bio je povišen i u monocitima ispitanika sa plakovima bogatim lipidima i prisutnom tankom fibroznom kapom, na osnovu čega su zaključili da se nivo iRNK *PHACTR1* u monocitima povećavao sa progresijom ateroskleroze [62].

Kasikara i sar. su pokazali da je nivo iRNK *PHACTR1* bio najviši u makrofagima anti-inflamatornog fenotipa i monocitima [19] u odnosu na ostale ćelije prisutne u plaku karotidne arterije. Pokazali su da je snižen nivo transkripcije gena *PHACTR1* u makrofagima, usled prisustva ređeg alela G, varijante rs9349379 gena *PHACTR1*, doveo do defekta u procesu eferocitoze. Do čega je došlo zbog loše organizacije aktinskih filamenata uključenih u fagocitozu ćelija zahvaćenih apoptozom [19], pošto je translokacija PP1 u jedro, posredstvom *PHACTR1*, bila smanjena, pojačavala se defosforilacija lakog lanca miozina, koji učestvuje u organizaciji citoskleta pri fagocitozi. Kasikara i sar., su u makrofagima detektovali proteine *PHACTR1* koji potiču i sa dugačkog transkripta, za koji se do sada smatralo da se može naći samo u mozgu [13, 18]. Takođe su pokazali da alel G dovodi do smanjenja nivoa dugačkog transkripta u makrofagima, a ne utiče na ostale transkripte [19].

Zaključak

U brojnim studijama *PHACTR1* je pokazao značajnu ulogu u kardiovaskularnom sistemu, ali precizan mehanizam njegovog uticaja na vaskularne bolesti, kao ni efekat varijanti gena *PHACTR1* nije sasvim poznat. Potrebno je još istraživanja da se otkrije jasna pozadina plejotropnog efekta gena *PHACTR1* i da se odgovori na pitanje sa kojim genom varijanta rs9349379 gena *PHACTR1* ima uzročno-posledičnu vezu.

Kardiovaskularne bolesti su najveći uzročnik smrtnosti u svetu. Procena rizika za nastanak fatalnih KV događaja na osnovu tradicionalnih faktora rizika (starenje, pol, porodična istorija KVB, krvni pritisak, dijabetes, lipidni i pušački status) uvedena je u kliničku praksu u poslednjih nekoliko decenija [63], ali i dalje nijedan genski marker nije uvršćen u standardnu kliničku praksu procene rizika. Mnoga znanja koja su proistekla iz genetičkih istraživanja upotrebljena su u razvoju terapije za KVB, ali njihov potpuni potencijal nije iskorišćen u svrhu dijagnostike i prevencije. Od 2015. godine izvedeno je više studija [64, 65], koje su upoređivale procenu rizika za nastanak i razvoj koronarne bolesti na osnovu uobičajenih faktora rizika i na osnovu stepena genetičkog rizika, parametra određenog prema broju genskih varijanti asociranih sa KB [25]. Pokazalo se da je stratifikacija ispitanika prema stepenu genetičkog rizika jednaka, ako ne i efikasnija od stratifikacije na osnovu konvencionalnih metoda procene rizika za KB. Međutim, većina studija je vršena na ispitanicima evropskog porekla, kao i na ispitanicima sa već potvrđenom KB, tako da su za kliničku primenu potrebna dodatna nezavisna istraživanja. Ipak, prednosti procene stepena genetičkog rizika su brojne, uključujući da je nezavisan od starosti i uobičajenih faktora rizika, zatim, da je u korelaciji sa subkliničkom aterosklerozom, a da je njegovo određivanje lako dostupno i relativno jeftino [25]. Danas se u kliničkoj praksi

terapija uvodi tek kao sekundarna prevencija nakon akutnog događaja, a u budućnosti najviše koristi od procene stepena genetičkog rizika imaju osobe sa procenjenim visokim stepenom genetičkog rizika koje će zato biti uključene u sistem primarne terapijske prevencije.

Zahvalnica

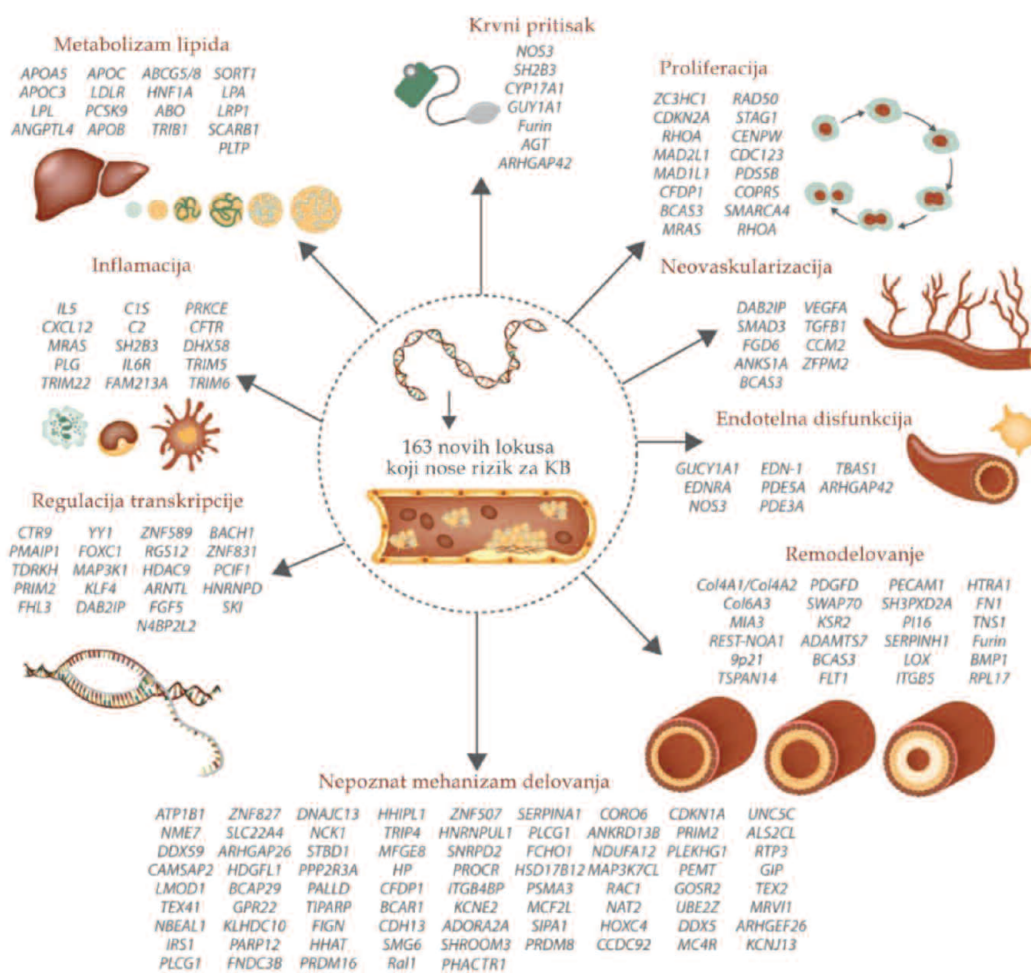
Rad je finansiran sa projekta Ministarstva nauke, tehnološkog razvoja i inovacija Republike Srbije; broj ugovora: 451-03-47/2023-01/200017

Literatura:

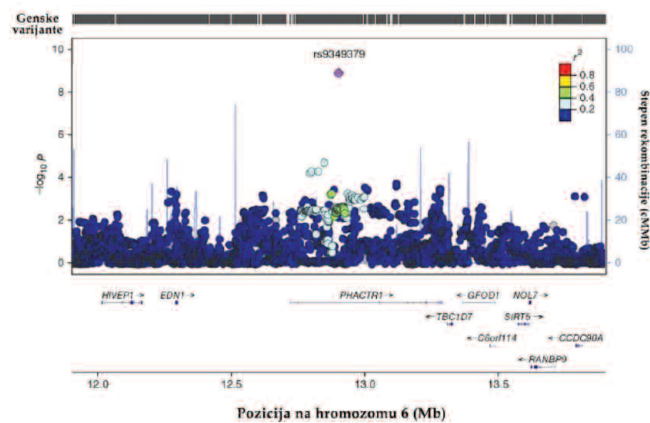
1. Badimon L, Padró T, Vilahur G. Atherosclerosis, platelets and thrombosis in acute ischaemic heart disease. *Eur Heart J Acute Cardiovasc Care*. 2012;1(1):60-74.
2. Ross R. Atherosclerosis—an inflammatory disease. *The New England journal of medicine*. 1999;340(2):115-26.
3. Libby P, Buring JE, Badimon L, Hansson GK, Deanfield J, Bittencourt MS, et al. Atherosclerosis. *Nat Rev Dis Primers*. 2019;5(1):019-0106.
4. Bentzon JF, Otsuka F, Virmani R, Falk E. Mechanisms of plaque formation and rupture. *Circulation research*. 2014;114(12):1852-66.
5. Frangogiannis NG. Pathophysiology of Myocardial Infarction. *Compr Physiol*. 2015;5(4):1841-75.
6. Andersen KK, Olsen TS, Dehlendorff C, Kammersgaard LP. Hemorrhagic and ischemic strokes compared: stroke severity, mortality, and risk factors. *Stroke*. 2009;40(6):2068-72.
7. Mendis S. The contribution of the Framingham Heart Study to the prevention of cardiovascular disease: a global perspective. *Prog Cardiovasc Dis*. 2010;53(1):10-4.
8. Kathiresan S, Voight BF, Purcell S, Musunuru K, Ardisson D, Mannucci PM, et al. Genome-wide association of early-onset myocardial infarction with single nucleotide polymorphisms and copy number variants. *Nature genetics*. 2009;41(3):334-41. Epub 2009/02/10.
9. Allen PB, Greenfield AT, Svenningsson P, Haspeslagh DC, Greengard P. Phactrs 1-4: A family of protein phosphatase 1 and actin regulatory proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004;101(18):7187-92. Epub 2004/04/27.
10. Wiezlak M, Diring J, Abella J, Mouilleron S, Way M, McDonald NQ, et al. G-actin regulates the shuttling and PP1 binding of the RPEL protein Phactr1 to control actomyosin assembly. *Journal of cell science*. 2012;125(Pt 23):5860-72. Epub 2012/09/15.
11. Cohen PT. Protein phosphatase 1—targeted in many directions. *Journal of cell science*. 2002;115(Pt 2):241-56. Epub 2002/02/13.
12. Fedoryshchak RO, Přečová M, Butler AM, Lee R, O'Reilly N, Flynn HR, et al. Molecular basis for substrate specificity of the Phactr1/PP1 phosphatase holoenzyme. *eLife*. 2020;9. Epub 2020/09/26.
13. Codina-Fauteux VA, Beaudoin M, Lalonde S, Lo KS, Lettre G. PHACTR1 splicing isoforms and eQTLs in atherosclerosis-relevant human cells. *BMC medical genetics*. 2018;19(1):97. Epub 2018/06/10.
14. Uhlén M, Fagerberg L, Hallström BM, Lindskog C, Oksvold P, Mardinoglu A, et al. Tissue-based map of the human proteome. *Science*. 2015;347(6220):1260419.
15. Aherrahrou R, Aherrahrou Z, Schunkert H, Erdmann J. Coronary artery disease associated gene Phactr1 modulates severity of vascular calcification in vitro. *Biochemical and biophysical research communications*. 2017;491(2):396-402. Epub 2017/07/20.
16. Erbilgin A, Civelek M, Romanoski CE, Pan C, Hagopian R, Berliner JA, et al. Identification of CAD candidate genes in GWAS loci and their expression in vascular cells. *Journal of lipid research*. 2013;54(7):1894-905. Epub 2013/05/15.
17. Beaudoin M, Gupta RM, Won HH, Lo KS, Do R, Henderson CA, et al. Myocardial Infarction-Associated SNP at 6p24 Interferes With MEF2 Binding and Associates With PHACTR1 Expression Levels in Human Coronary Arteries. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2015;35(6):1472-9. Epub 2015/04/04.
18. Reschen ME, Lin D, Chalisey A, Soilleux EJ, O'Callaghan CA. Genetic and environmental risk factors for atherosclerosis regulate transcription of phosphatase and actin regulating gene PHACTR1. *Atherosclerosis*. 2016;250:95-105. Epub 2016/05/18.
19. Kasikara C, Schilperoort M, Gerlach BD, Xue C, Wang X, Zheng Z, et al. Deficiency of macrophage PHACTR1 impairs efferocytosis and promotes atherosclerotic plaque necrosis. *J Clin Invest*. 2021;25(145275).
20. Frazer KA, Ballinger DG, Cox DR, Hinds DA, Stuve LL, Gibbs RA, et al. A second generation human haplotype map of over 3.1 million SNPs. *Nature*. 2007;449(7164):851-61.

21. Lin J, Musunuru K. From Genotype to Phenotype: A Primer on the Functional Follow-up of Genome-Wide Association Studies in Cardiovascular Disease. *Circulation Genomic and precision medicine*. 2018;11(2):30.
22. Samani NJ, Erdmann J, Hall AS, Hengstenberg C, Mangino M, Mayer B, et al. Genomewide association analysis of coronary artery disease. *The New England journal of medicine*. 2007;357(5):443-53.
23. Helgadottir A, Thorleifsson G, Manolescu A, Gretarsdottir S, Blondal T, Jonasdottir A, et al. A common variant on chromosome 9p21 affects the risk of myocardial infarction. *Science*. 2007;316(5830):1491-3.
24. McPherson R, Pertsemlidis A, Kavaslar N, Stewart A, Roberts R, Cox DR, et al. A common allele on chromosome 9 associated with coronary heart disease. *Science*. 2007;316(5830):1488-91.
25. Roberts R, Campillo A, Schmitt M. Prediction and management of CAD risk based on genetic stratification. *Trends Cardiovasc Med*. 2020;30(6):328-34.
26. Schunkert H, König IR, Kathiresan S, Reilly MP, Assimes TL, Holm H, et al. Large-scale association analysis identifies 13 new susceptibility loci for coronary artery disease. *Nature genetics*. 2011;43(4):333-8. Epub 2011/03/08.
27. A genome-wide association study in Europeans and South Asians identifies five new loci for coronary artery disease. *Nature genetics*. 2011;43(4):339-44.
28. O'Donnell CJ, Kavousi M, Smith AV, Kardia SL, Feitosa MF, Hwang SJ, et al. Genome-wide association study for coronary artery calcification with follow-up in myocardial infarction. *Circulation*. 2011;124(25):2855-64. Epub 2011/12/07.
29. Pechlivanis S, Muhleisen TW, Mohlenkamp S, Schädendorf D, Erbel R, Jöckel KH, et al. Risk loci for coronary artery calcification replicated at 9p21 and 6q24 in the Heinz Nixdorf Recall Study. *BMC medical genetics*. 2013;14:23. Epub 2013/02/12.
30. Bevan S, Traylor M, Adib-Samii P, Malik R, Paul NL, Jackson C, et al. Genetic heritability of ischemic stroke and the contribution of previously reported candidate gene and genomewide associations. *Stroke*. 2012;43(12):3161-7. Epub 2012/10/09.
31. Deloukas P, Kanoni S, Willenborg C, Farrall M, Assimes TL, Thompson JR, et al. Large-scale association analysis identifies new risk loci for coronary artery disease. *Nature genetics*. 2013;45(1):25-33. Epub 2012/12/04.
32. Bush WS, Oetjens MT, Crawford DC. Unravelling the human genome-phenome relationship using phenome-wide association studies. *Nat Rev Genet*. 2016;17(3):129-45.
33. Gupta RM, Hadaya J, Trehan A, Zekavat SM, Roselli C, Klarin D, et al. A Genetic Variant Associated with Five Vascular Diseases Is a Distal Regulator of Endothelin-1 Gene Expression. *Cell*. 2017;170(3):522-33 e15. Epub 2017/07/29.
34. Jansen H, Lieb W, Schunkert H. Mendelian Randomization for the Identification of Causal Pathways in Atherosclerotic Vascular Disease. *Cardiovasc Drugs Ther*. 2016;30(1):41-9.
35. Do R, Stitzel NO, Won HH, Jørgensen AB, Duga S, Angelica Merlini P, et al. Exome sequencing identifies rare LDLR and APOA5 alleles conferring risk for myocardial infarction. *Nature*. 2015;518(7537):102-6.
36. Buniello A, MacArthur JAL, Cerezo M, Harris LW, Hayhurst J, Malangone C, et al. The NHGRI-EBI GWAS Catalog of published genome-wide association studies, targeted arrays and summary statistics 2019. *Nucleic acids research*. 2019;47(D1):D1005-D12.
37. Surendran P, Drenos F, Young R, Warren H, Cook JP, Manning AK, et al. Trans-ancestry meta-analyses identify rare and common variants associated with blood pressure and hypertension. *Nature genetics*. 2016;48(10):1151-61. Epub 2016/09/13.
38. Debette S, Kamatani Y, Metso TM, Kloss M, Chauhan G, Engelter ST, et al. Common variation in PHACTR1 is associated with susceptibility to cervical artery dissection. *Nature genetics*. 2015;47(1):78-83. Epub 2014/11/25.
39. Anttila V, Winsvold BS, Gormley P, Kurth T, Bettella F, McMahon G, et al. Genome-wide meta-analysis identifies new susceptibility loci for migraine. *Nature genetics*. 2013;45(8):912-7. Epub 2013/06/26.
40. Kuveljic J, Djuric T, Stankovic A, Koncar I, Alavantic D, Zivkovic M. PHACTR1 haplotypes are associated with carotid plaque presence and affect PHACTR1 mRNA expression in carotid plaque tissue. *Gene*. 2019;710:273-8. Epub 2019/06/15.
41. Kuveljic J, Djuric T, Stankovic G, Dekleva M, Stankovic A, Alavantic D, et al. Association of PHACTR1 intronic variants with the first myocardial infarction and their effect on PHACTR1 mRNA expression in PBMCs. *Gene*. 2021;775(145428):16.
42. Dehghan A, Bis JC, White CC, Smith AV, Morrison AC, Cupples LA, et al. Genome-Wide Association Study for Incident Myocardial Infarction and Coronary Heart Disease in Prospective Cohort Studies: The CHARGE Consortium. *PloS one*. 2016;11(3):e0144997. Epub 2016/03/08.
43. Kelloniemi A, Szabo Z, Serpi R, Napankangas J, Ohukainen P, Tenhunen O, et al. The Early-Onset Myocardial Infarction Associated PHACTR1 Gene Regulates Skeletal and Cardiac Alpha-Actin Gene Expression. *PloS one*. 2015;10(6):e0130502. Epub 2015/06/23.
44. Cayla G, Lattuca B. Long-Term Outcomes on Multivessel Disease STEMI Patients: Which Is the Culprit Lesion?: *J Am Coll Cardiol*. 2019 Dec 24;74(25):3095-3098. doi: 10.1016/j.jacc.2019.10.037.

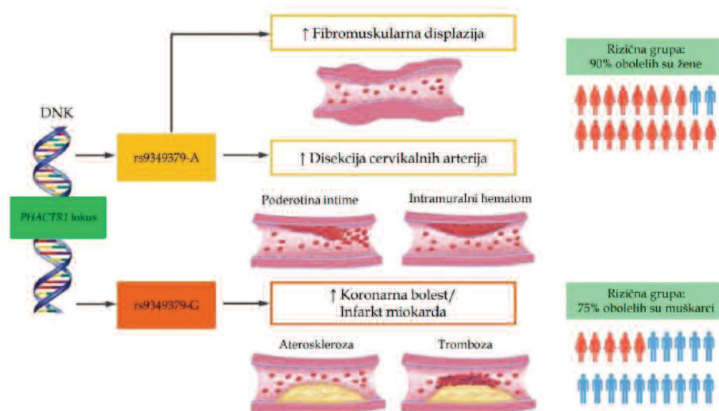
45. Hager J, Kamatani Y, Cazier JB, Youhanna S, Ghassibe-Sabbagh M, Platt DE, et al. Genome-wide association study in a Lebanese cohort confirms PHACTR1 as a major determinant of coronary artery stenosis. *PloS one*. 2012;7(6):e38663. Epub 2012/06/30.
46. Kiando SR, Tucker NR, Castro-Vega LJ, Katz A, D'Escamard V, Treard C, et al. PHACTR1 Is a Genetic Susceptibility Locus for Fibromuscular Dysplasia Supporting Its Complex Genetic Pattern of Inheritance. *PLoS genetics*. 2016;12(10):e1006367. Epub 2016/10/30.
47. Adlam D, Olson TM, Combaret N, Kovacic JC, Iismaa SE, Al-Hussaini A, et al. Association of the PHACTR1/EDN1 Genetic Locus With Spontaneous Coronary Artery Dissection. *Journal of the American College of Cardiology*. 2019;73(1):58-66.
48. Freilinger T, Anttila V, de Vries B, Malik R, Kallela M, Terwindt GM, et al. Genome-wide association analysis identifies susceptibility loci for migraine without aura. *Nature genetics*. 2012;44(7):777-82.
49. Winsvold BS, Bettella F, Witoelar A, Anttila V, Gormley P, Kurth T, et al. Shared genetic risk between migraine and coronary artery disease: A genome-wide analysis of common variants. *PloS one*. 2017;12(9):e0185663. Epub 2017/09/29.
50. Jiang Y, Liu HB. Myocyte Enhancer Factor-2A Gene Mutation and Coronary Artery Disease. *Chin Med J*. 2015;128(19):2688-91.
51. The Genotype-Tissue Expression (GTEx) project. *Nature genetics*. 2013;45(6):580-5.
52. Aguet F, Brown AA, Castel SE, Davis JR, Mohammadi P, Segrè AV, et al. Local genetic effects on gene expression across 44 human tissues. *bioRxiv*. 2016:074450.
53. Fishilevich S, Nudel R, Rappaport N, Hadar R, Plaschkes I, Iny Stein T, et al. GeneHancer: genome-wide integration of enhancers and target genes in GeneCards. *Database : the journal of biological databases and curation*. 2017;2017:bax028.
54. An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. *Nature*. 2012;489(7414):57-74. Epub 2012/09/08.
55. Wang X, Musunuru K. Confirmation of Causal rs9349379- PHACTR1 Expression Quantitative Trait Locus in Human-Induced Pluripotent Stem Cell Endothelial Cells. *Circulation Genomic and precision medicine*. 2018;11(10):e002327. Epub 2018/10/26.
56. Jarray R, Allain B, Borriello L, Biard D, Loukaci A, Larghero J, et al. Depletion of the novel protein PHACTR-1 from human endothelial cells abolishes tube formation and induces cell death receptor apoptosis. *Biochimie*. 2011;93(10):1668-75. Epub 2011/07/30.
57. Jarray R, Pavoni S, Borriello L, Allain B, Lopez N, Bianco S, et al. Disruption of phactr-1 pathway triggers pro-inflammatory and pro-atherogenic factors: New insights in atherosclerosis development. *Biochimie*. 2015;118:151-61. Epub 2015/09/13.
58. Allain B, Jarray R, Borriello L, Leforban B, Dufour S, Liu WQ, et al. Neuropilin-1 regulates a new VEGF-induced gene, Phactr-1, which controls tubulogenesis and modulates lamellipodial dynamics in human endothelial cells. *Cellular signalling*. 2012;24(1):214-23. Epub 2011/09/24.
59. Zhang Z, Jiang F, Zeng L, Wang X, Tu S. PHACTR1 regulates oxidative stress and inflammation to coronary artery endothelial cells via interaction with NF-kappaB/p65. *Atherosclerosis*. 2018;278:180-9. Epub 2018/10/08.
60. Rubin S, Bougaran P, Martin S, Abelanet A, Delobel V, Pernot M, et al. PHACTR-1 (Phosphatase and Actin Regulator 1) Deficiency in Either Endothelial or Smooth Muscle Cells Does Not Predispose Mice to Nonatherosclerotic Arteriopathies in 3 Transgenic Mice. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2022;42(5):597-609.
61. Wood A, Antonopoulos A, Chuaiphichai S, Kyriakou T, Diaz R, Al Hussaini A, et al. PHACTR1 modulates vascular compliance but not endothelial function: a translational study. *Cardiovascular research*. 2023;119(2):599-610.
62. Li T, Ding L, Wang Y, Yang O, Wang S, Kong J. Genetic deficiency of Phactr1 promotes atherosclerosis development via facilitating M1 macrophage polarization and foam cell formation. *Clin Sci*. 2020;134(17):2353-68.
63. Goff DC, Jr., Lloyd-Jones DM, Bennett G, Coady S, D'Agostino RB, Gibbons R, et al. 2013 ACC/AHA guideline on the assessment of cardiovascular risk: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *Circulation*. 2014;129(25 Suppl 2):12.
64. Mega JL, Stitzel NO, Smith JG, Chasman DI, Caulfield M, Devlin JJ, et al. Genetic risk, coronary heart disease events, and the clinical benefit of statin therapy: an analysis of primary and secondary prevention trials. *Lancet (London, England)*. 2015;385(9984):2264-71.
65. Natarajan P, Young R, Stitzel NO, Padmanabhan S, Baber U, Mehran R, et al. Polygenic Risk Score Identifies Subgroup With Higher Burden of Atherosclerosis and Greater Relative Benefit From Statin Therapy in the Primary Prevention Setting. *Circulation*. 2017;135(22):2091-101.
66. Erdmann J, Kessler T, Munoz Venegas L, Schunkert H. A decade of genome-wide association studies for coronary artery disease: the challenges ahead. *Cardiovascular research*. 2018;114(9):1241-57.



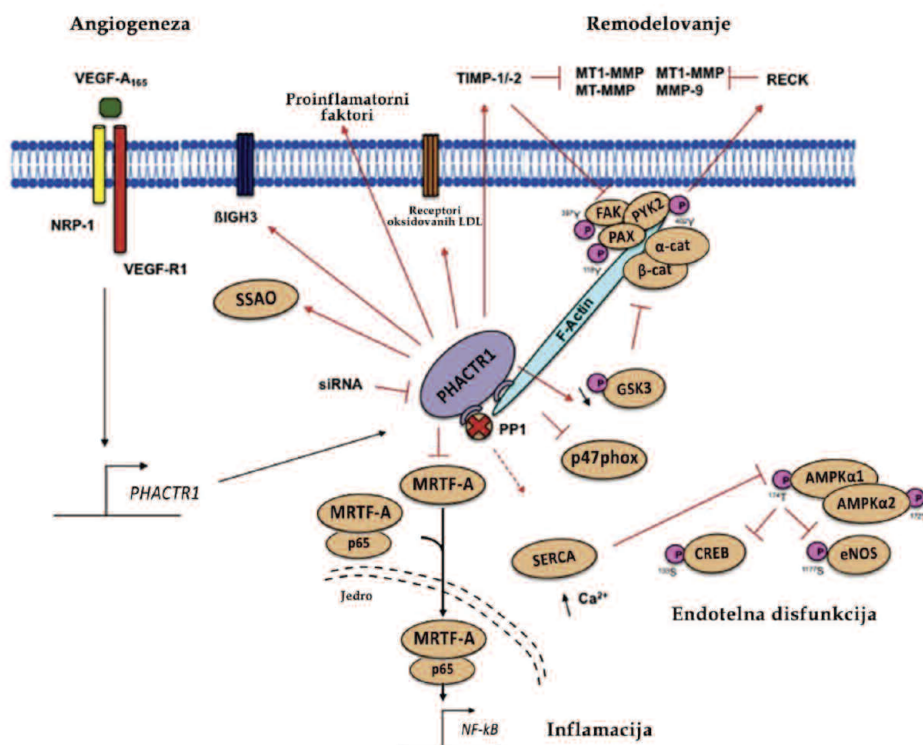
Slika 1. Novi lokusi povezani sa KB u GWA studijama. Slika je modifikovana iz Erdmann i sar, *Cardiovasc Res*, 2018. [66].



Slika 2. Pozicija varijante rs9349379 gena *PHACTR1* u odnosu na okolne varijante i gene na hromozomu 6. Slika je modificovana iz Debette i sar, *Nat Genet*, 2015. [38].



Slika 3. Plejotropni efekat varijante rs9349379 gena *PHACTR1*. Slika je modificovana iz Adlam i sar, *J Am Coll Cardiol*, 2019. [47].



Slika 4. PHACTR1 u endotelskim ćelijama učestvuje u procesima ključnim za nastanak i razvoj ateroskleroze. Slika je modifikovana iz Jarray i sar, Biochimie, 2015. [57], i Zhang i sar, Atherosclerosis, 2018. [59].

Uloga ciljanih (epi)genetičkih modifikacija u potencijalnoj terapiji dijabetesa

Marija Đorđević, Svetlana Dinić, Mirjana Mihailović, Aleksandra Uskoković, Nevena Grdović, Jelena Arambašić Jovanović, Melita Vidaković

Odeljenje za molekularnu biologiju, Institut za biološka istraživanja "Siniša Stanković",

Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerzitet u Beogradu

Kontakt: marija.sinadinovic@ibiss.bg.ac.rs

Apstrakt

U osnovi dijabetesa se nalazi smanjen broj beta ćelija endokrinog pankreasa, njihovo poremećeno funkcionisanje ili gubitak identiteta u procesu dediferencijacije. Jedna od aktuelnih strategija za potencijalnu primenu u terapiji dijabetesa je i direktno ćelijsko reprogramiranje kojim bi se nadomestio nedostatak funkcionalnih beta ćelija i insulina u organizmu. Ovaj pravac u istraživanjima podrazumeva transdiferencijaciju somatskih ćelija poreklom iz različitih organa u ćelije koje proizvode insulin kroz modulaciju ekspresije transkripcionih faktora koji su ključni za održavanje ćelijskog identiteta. U ovom poglavlju biće predstavljena aktuelna istraživanja koja podrazumevaju ćelijsko reprogramiranje uz pomoć novih sintetičkih alata koji imaju ulogu da dirigovano uvode izmene u (epi)genom sa posebnim osvrtom na CRISPR/Cas9 sistem i njegove modifikacije. Alfa ćelije endokrinog pankreasa predstavljaju atraktivan izvor ćelija za potencijalnu terapiju dijabetesa zato što dele zajedničko poreklo sa beta ćelijama, imaju visok nivo plastičnosti kao i zbog bliske pozicioniranosti koja obezbeđuje prirodno okruženje pogodno za njihovo preživljavanje. Jedna od nedavnih studija je podrazumevala upotrebu EpiCRISPR sistema za ciljano uvođenje metilacije u okviru promotora gena *Arx* u alfa ćelijama pankreasa miša u cilju njihove transdiferencijacije. Uvedene izmene na nivou epigenoma su dovele do pokretanja ekspresije insulina u alfa ćelijama pankreasa miša i inicijacije procesa njihove transdiferencijacije u ćelije koje proizvode insulin.

Ključne reči: editovanje epigenoma; dijabetes; CRISPR/Cas9; alfa ćelije pankreasa; transdiferencijacija; insulin

The role of targeted (epi)genetic modifications in potential diabetes therapy

Marija Đorđević, Svetlana Dinić, Mirjana Mihailović, Aleksandra Uskoković, Nevena Grdović, Jelena Arambašić Jovanović, Melita Vidaković

Department of Molecular Biology University of Belgrade,

Institute for Biological Research "Siniša Stanković" National Institute of the Republic of Serbia

Correspondence: marija.sinadinovic@ibiss.bg.ac.rs

Abstract

Diabetes is caused by a reduced number of beta cell mass, impaired functioning, or loss of beta cell identity through the dedifferentiation process. Direct cellular reprogramming is one of the current strategies in the potential diabetes therapy, which would replace the lack of functional beta cells and regulate insulin levels. This research approach involves the transdifferentiation of somatic cells from several organs into insulin-producing cells by modulating the expression pattern of transcription factors responsible for maintaining cellular identity. This chapter will present current research involving cellular reprogramming using the new synthetic tools that have ability to introduce targeted (epi)genetic modifications. Special attention will be paid to the CRISPR/Cas9 system and its modifications. Pancreatic alpha cells represent an attractive cell source for potential diabetes therapy because they share a common origin with beta cells, have a high level of plasticity, and provide a natural environment suitable for cell survival because of their close placement. One of the recent studies involved the use of the EpiCRISPR system for targeted DNA methylation within the Arx gene promoter in murine pancreatic alpha cells. The introduced changes at the epigenetic level led to the initiation of insulin expression in the alpha cells of the mouse pancreas and the initiation of their transdifferentiation process into insulin-producing cells.

Key words: epigenome editing; diabetes; CRISPR/Cas9; pancreatic alpha cells, transdifferentiation, insulin

Šećerna bolest ili dijabetes predstavlja grupu metaboličkih poremećaja koji dovode do hronične hiperglikemije tj. povišene koncentracije glukoze u krvi usled poremećene biološke aktivnosti hormona insulina, njegove neadekvatne sekrecije ili zbog postojanja oba poremećaja. Beta ćelije pankreasa predstavljaju senzore glukoze, proizvode i oslobađaju hormon insulin koji reguliše brojne fiziološke procese, a njegova ključna uloga je u održavanju koncentracije glukoze u krvi. U osnovi patogeneze dijabetesa se nalazi poremećeno funkcionisanje beta ćelija, gubitak njihovog identiteta i prisustvo polihormonalnih ćelija, kao i povećano umiranje, s obzirom da sposobnost deobe beta ćelija opada sa godinama [1]. U odnosu na uzrok nastanka bolesti dijabetes se klasifikuje na nekoliko tipova, ali bez obzira na tip dijabetesa kod obolelih dolazi do hronične hiperglikemije i istih hroničnih komplikacija koje su posledica apsolutno ili relativno narušene funkcionalnosti beta ćelija, njihove poremećene proliferacije ili autoimunske reakcije koja na kraju dovodi do smanjenja mase beta ćelija [2].

Pristupi u terapiji dijabetesa

Pored farmakološkog pristupa u terapiji dijabetesa gde spada upotreba insulina i lekova koji deluju na povećanje senzitivnosti ćelija na insulin, stimulaciju insulinske sekrecije i poboljšanje kontrole glikemije, aktuelan je i ćelijski pristup u terapiji. Naime, egzogeno dodavanje insulina nije u potpunosti efikasno u regulaciji svakodnevnih naleta visokog nivoa glukoze u krvi, što dugoročno gledano dovodi do niza komplikacija u okviru drugih organa, kao što su bolesti bubrega i kožne infekcije [3, 4]. Kako bi se povećao broj ćelija koje su osetljive na glukozu i koje odgovaraju oslobađanjem adekvatne količine insulina važno je delovati lokalno na nivou organizma. Ćelijski pristup u terapiji ima za cilj zamenu oštećenih ili obnavljanje ukupne mase beta ćelija i podrazumeva transplantaciju pankreasa i Langerhansovih ostrvaca poreklom od donora. Ovaj pristup je efikasan, ali se susreće sa brojnim preprekama kao što su ograničen broj donora i pridruženi sporedni efekti imunosupresivnih lekova što onemogućava široku primenu ovog vida terapije. Broj obolelih od dijabetesa u svetu je u konstantnom porastu pa je pronalaženje alternativnih terapijskih pristupa važan pravac u istraživanjima. Velika pažnja je usmerena ka očuvanju preostalih i sprečavanju daljeg gubitka funkcionalnih beta ćelija, ka stimulaciji replikacije i rasta novih beta ćelija poreklom od progenitorskih ćelija [5, 6]. Težnja za pronalaskom alternativnih izvora beta ćelija dovela je do velikog broja pokušaja diferencijacije embrionalnih i indukovanih pluripotentnih stem ćelija, kao i reprogramiranja terminalno diferenciranih tipova ćelija prisutnih u organizmu [6, 7]. Embrionalne i indukovane pluripotentne matične ćelije poseduju veliki potencijal da se diferenciraju u druge tipove ćelija, između ostalih i u beta ćelije pankreasa, međutim njihovo korišćenje u ćelijskoj terapiji još uvek nailazi na ograničenja kao što je mogućnost napada od strane autoimunskog sistema ili njihova tumorogena priroda [8]. Proces ćelijske transdiferencijacije podrazumeva direktan prelazak iz jednog u drugi terminalno diferencirani tip ćelija, isključujući pluripotentno i intermedijerno stanje. Sposobnost ćelija da adaptiraju svoj fenotip kao odgovor na promene iz spoljašnje sredine bez promena u genetičkom materijalu definiše se kao ćelijska plastičnost. Zahvaljujući tome, mogućnost da se utiče na reprogramiranje ćelijskog identiteta daje veliki prostor za modelovanje bolesti i potencijal za prevođenje u terapijske svrhe [9]. Veliki broj funkcionalnih tipova ćelija poput kardiomiocita, neurona, hepatocita i hematopoetskih ćelija do sada je dobijen od fibroblasta ili drugih tipova somatskih ćelija u *in vitro* uslovima [10]. Takođe su uspešno realizovani različiti pokušaji transdiferencijacije pankreatičnih i drugih tipova somatskih ćelija koje nisu poreklom iz pankreasa u ćelije koje zadobijaju sposobnost da reaguju na glukozu, proizvode i oslobađaju insulin, tzv. ćelije koje liče na beta ćelije pankreasa [11, 12]. Ćelije jetre, epitelne ćelije žučne kese, fibroblasti kože, ćelije antralnog dela želuca i keratinociti su neki od najčešće korišćenih tipova ćelija koji nisu poreklom iz pankreasa u pokušajima transdiferencijacije u ćelije koje proizvode insulin (Slika 1.) [13-18]. Acinarne i duktalne ćelije koje ulaze u sastav egzokrinog dela pankreasa

su uspešno transdiferencirane u prisustvu više transkripcionih faktora koji su specifični za beta ćelije kao što su NGN3, MAFA i PAX6 (Slika 2.) [19, 20].

Različiti nivoi regulacije genske ekspresije su tačke na kojima može da se deluje kako bi se pojačala, smanjila ili potpuno isključila ekspresija gena za transkripcione faktore koji su pre svega odgovorni za održavanje ćelijskog identiteta. Kako bi se unapredio ćelijski pristup u terapiji dijabetesa u cilju modulacije ekspresije ključnih transkripcionih faktora neophodno je detaljno proučiti njihovu ulogu u pravilnom funkcionisanju beta ćelija, ispitati interakcije i mehanizme koji regulišu njihovu ekspresiju.

Rezultati istraživanja koji su pokazali postojanje veze između epigenetičkih modifikacija i razvoja dijabetesa doveli su do razvoja tzv. „epilekova“ koji imaju sposobnost da menjaju epigenetička obeležja gde spadaju inhibitori histonskih deacetilaza (kao što je vorinostat) ili demetilujući agensi (predstavnik je 5-Aza-2'-dezoksicitidin koji inhibira enzime DNK metiltransferaze) [21, 22]. Problem sa tretmanom mnogih kompleksnih bolesti, među kojima je i dijabetes, različitim „epilekovima“ je što oni deluju neselektivno na epigenetička obeležja za koja su razvijeni i dovode do neželjenih sporednih efekata. Neki od njih imaju lošu stabilnost i kratak polужivot [23, 24]. Sa druge strane, novi sintetički epigenetički alati dizajnirani su tako da dirigovano i precizno menjaju epigenetička obeležja na specifičnim mestima, s ciljem da dovedu do promene u ekspresiji samo jednog ili više gena. Zahvaljujući reverzibilnoj prirodi epigenetičkih modifikacija ciljano editovanje epigenoma pruža ogroman potencijal u različitim oblastima, od osnovnih istraživanja do biomedicine i primenjene biotehnologije, te bi moglo da se posmatra kao alternativa u odnosu na „epilekove“ [9]. Napredak u efikasnoj isporuci genetičkog materijala u ćelije pomoću plazmida, adeno-asociranih virusa (AAV), modifikovanih molekula RNK i nanočestica obezbeđuje efikasniji, jednostavniji i sigurniji put za pokretanje procesa transdiferencijacije ciljanih ćelija [12, 25, 26].

Različite ćelije jednog organizma ispoljavaju specifične karakteristike i održavaju stabilan obrazac genske ekspresije. Nastanak diferenciranih ćelija adultnog organizma se posmatra kao razvojni proces nediferenciranih u terminalno diferencirane ćelije koje formiraju tkiva ili organe [27]. U stabilnim uslovima, ćelije adultnog organizma održavaju diferencirano stanje pri čemu jedinstveni tip ćelija često može da usvoji neke karakteristike drugog tipa ćelija zahvaljujući promenama u genskoj ekspresiji koje nastaju kao posledica odgovora na promene iz okruženja [28, 29]. Ključnu ulogu u interpretaciji genoma koja podrazumeva aktivaciju ili represiju dela genoma imaju epigenetički mehanizmi koji utiču na dostupnost genomskih regiona. Proučavanjem mehanizama koji se nalaze u osnovi promena u genskoj ekspresiji, a koje nisu nastale zbog izmena u sekvenci molekula DNK, bavi se epigenetika. Waddington je još 1942. godine prvi put upotrebio termin „epigenetika“ kako bi označio uticaj okruženja na genom u toku razvoja u cilju formiranja ćelijskog fenotipa [30]. Skup epigenetičkih obeležja koja uključuju metilaciju molekula DNK, dostupnost hromatina, posttranslacione modifikacije histonskih proteina (kao što su acetilacija, fosforilacija, ubikvitinacija, sumoilacija histona, itd.) i nekodirajuće RNK definišu identitet ćelija višecelijskog organizma, ali i dopuštaju ćelijama promene u genskoj ekspresiji i posledično promene u fenotipu. Ove promene mogu da se jave kao odgovor na promene iz okruženja kao što su stvaranje ćelijskog diverziteta u toku razvoja ili prilagođavanje ćelija na promene u dostupnosti hranljivih materija ili izloženost stresnim stimulusima [31].

Metilacija molekula DNK predstavlja naslednu, kovalentnu epigenetičku modifikaciju koja je najviše izučavana i podrazumeva prenos metil grupe sa S-adenozilmetionina na citozin na poziciji C5 pri čemu nastaje 5-metilcitozin. Metilacija molekula DNK nije nasumično rasuta po genomu, već se najčešće nalazi na citozinu u okviru CpG dinukleotida koji su grupisani u tzv. CpG ostrvca kod sisara [32]. Hipermetilovana CpG ostrvca koja su lokalizovana u promotorskom regionu blizu početka mesta transkripcije gena predstavljaju marker transkripciono neaktivnih gena, što definiše direktnu vezu između epigenetičkih modifikacija i gen-

ske ekspresije [33]. Metilacija molekula DNK obezbeđuje stabilno nasleđivanje obrasca genske ekspresije, pri čemu se metilovani geni drže reprimirani i zaključani. Takođe, metilacija ima veoma važnu ulogu u genomskom imprintingu, inaktivaciji X hromozoma i tumorogenezi [34]. Enzimi DNK metiltransferaze (engl. *DNA methyltransferase*) (DNMT1, DNMT3A, i DNMT3B) imaju ulogu u uvođenju i prenošenju obrasca metilacije molekula DNK. Ovi enzimi imaju dve različite regulatorne funkcije, od kojih DNMT1 DNK metiltransferaza ima ulogu u održavanju obrasca već uspostavljene metilacije u toku replikacije. Obrazac metilacije DNK molekula se uspostavlja pomoću metiltransferaza koje vrše *de novo* metilaciju, a to su DNMT3A i DNMT3B, i mogu da interaguju sa DNMT3L koji nema metiltransferaznu aktivnost, ali stimuliše *de novo* metiltransferaze [35].

Epigenetičko editovanje

Epigenetičko editovanje se bazira na upotrebi DNK vezujućeg domena koji pruža mogućnost preciznog baznog sparivanja sa sekvencom od interesa i ne dovodi do izmena u primarnoj sekvenci molekula DNK. Specifičnim pozicioniranjem elemenata koji imaju ulogu da modifikuju epigenetičke markere neslektivno delovanje je svedeno na minimum, što redukuje sporedne neželjene efekte [36–38]. Domenu koji se vezuje za molekul DNK može da bude pripojen i tzv. efektorski domen poreklom od enzima koji imaju ulogu da pišu ili brišu epigenetička obeležja na molekulu DNK ili na histonskim repovima. Efektorski domen može i da regrutuje druge enzime koji uvode ili uklanjaju specifična epigenetička obeležja. Za pozicioniranje kompleksa za editovanje epigenoma na molekulu DNK koriste se proteini sa cinkanim prstićima (engl. *Zinc finger nuclease*, ZFN), efektori slični aktivatoru transkripcije (engl. *Transcription-activator-like effector nucleases*, TALEN) i Cas9 proteini. ZFN i TALEN su modularni proteini koji se vezuju za molekul DNK i moraju da se dizajniraju zasebno za svaki regon koji se targetuje. TALE-TET1 sistem je uspešno korišćen za demetilaciju ICR2 regiona (engl. *imprinted control region 2*), u cilju smanjenja ekspresije p57, inhibitora ćelijskog ciklusa i povećanja replikacije pankreatičnih beta ćelija [39]. Grupisani (klasterovani) kratki palindromski ponovci na jednakim rastojanjima (engl. *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*, CRISPR) su prisutni kod mnogih bakterija i većine arhea i imaju ulogu u stečenom imunskom sistemu [40, 41]. Asocirane endonukleaze (engl. *CRISPR associated*, Cas) formiraju komplekse (CRISPR/Cas) zajedno sa pojedinačnim molekulima CRISPR-RNK (crRNK) koji se na osnovu komplementarnosti sparuju sa stranim molekulima DNK [42, 43]. Primena ovog sistema koji je inicijalno razvijen za editovanje genoma dovela je do velikog napretka u razvoju sistema za epigenetičko editovanje zahvaljujući fleksibilnosti i modularnoj prirodi sistema [44]. Prednost CRISPR/Cas9 sistema koja ga čini privlačnim za potencijalne terapijske pristupe se ogleda u mogućnosti istovremenog ciljanja više regiona u genomu uz pomoć više različitih RNK vodilja (gRNK) bez ikakvih izmena na proteinu Cas9 [45, 46]. Naime, Cas9 ima dva endonukleazna domena koji se aktiviraju prilikom formiranja kompleksa sa molekulom DNK, ostavljajući dvolančani prekid. Male insercije i delecije u ciljanom regionu koje nastaju kao rezultat popravke uvedenih dvolančanih prekida dovode do mutacija i poremećene funkcionalnosti genskog produkta [47]. Nakon gašenja endonukleazne aktivnosti, dCas9 (engl. *deactivated/dead Cas9*, dCas9) protein može da ima ulogu platforme kojoj će se dodati drugi efektorski domeni s ciljem da menjaju metilacioni status ciljanog lokusa, uvode posttranslacione modifikacije histona ili da dovode do različitih modifikacija istovremeno utičući na arhitekturu hromatina [9, 44]. Efektorski domeni koji služe kao aktivatori genske ekspresije su VP64, VP160 [48], TET1 [49], tripartitini transkripcioni aktivator VPR (sastavljen je od VP64, P65 i Rta) [50], kao i katalitička subjedinica acetiltransferaze P300 koja katalizuje acetilaciju lizina 27 histona H3 [51]. Kao represori se koriste domeni DNMT3A, DNMT3A-DNMT3L, KRAB (engl. *Krüppel associated box*), LSD1 (engl. *lysine specific demethylase 1*) enzima.

Upotreba CRISPR/Cas9 sistema za dobijanje ćelija koje proizvode insulin

Alati za editovanje (epi)genoma su pojednostavili i ubrzali razvoj metoda koje omogućavaju direktnu promenu terminalno diferenciranih ćelija u druge tipove ćelija zaobilazanjem intermedijernog stanja i mogli bi u velikoj meri da doprinesu masovnoj proizvodnji ćelija za terapiju dijabetesa [10, 52]. Istraživanja koja se zasnivaju na upotrebi različitih CRISPR/Cas9 sistema uključuju različite tipove ćelija delujući na gene koji su povezani sa dijabetesom. CRISPR/Cas9 sistem za ciljanu aktivaciju gena (engl. *target gene activation*, TGA) je korišćen za transdiferencijaciju mišijih ćelija jetre u ćelije koje proizvode insulin u *in vivo* uslovima. TGA sistem ne deluje direktno na molekul DNK, već ciljano aktivira gene indirektnim putem tako što regrutuje transkripcionu mašineriju ili modulatore koji menjaju epigenetičke oznake. Ovaj sistem je ispitivan na adultnim životinjama koje eksprimiraju Cas9 (*knockin* životinje za Cas9), kojima je kroz repnu venu injeciran AAV vektor sa informacijom za gRNK i aptamer koji ima ulogu da regrutuje kompleks za aktivaciju transkripcije ciljanog gena [53]. Ovaj sistem je doveo do uspešnog pokretanja ekspresije transkripcionog faktora PDX1 u ćelijama jetre, nakon čega je zabeležena njihova transdiferencijacija u ćelije koje proizvode insulin. Kod miševa kojima je dijabetes tipa 1 (DT1) izazvan pomoću streptozotocina došlo je do povećanja nivoa insulina u serumu i poboljšanja hiperglikemijskog statusa. Ovakav TGA sistem je, pored model sistema za DT1, korišćen za tretman muskularne distrofije i akutne bolesti bubrega [53]. Istraživači su razvili način kako da efikasno upotrebe CRISPR/Cas9 za popravku mutacije u genu za protein volframin u humanim indukovanim pluripotentnim matičnim ćelijama i da ih zatim transdiferenciraju u funkcionalne beta ćelije pomoću šestostepenog protokola za diferencijaciju ciljanjem različitih razvojnih i signalnih puteva. U ovom istraživanju korišćene su indukovane pluripotentne ćelije poreklom od fibroblasta izolovanih iz pacijenata sa Volframovim sindromom koji predstavlja redak autozomalno recesivni poremećaj uzrokovan mutacijom u genu *WFS1*. Pojava prvih simptoma dijabetesa se razvija u ranom detinjstvu, zajedno sa oštećenjem optičkog nerva i neurodegeneracijom. Nakon transplantacije genetički korigovanih i diferenciranih beta ćelija u dijabetične miševe dolazi do normalizacije nivoa glukoze u krvi, u toku šestomesečnog perioda posmatranja. Naime, korekcija gena *WFS1* značajno doprinosi povećanju stepena diferencijacije i funkcionisanja beta ćelija u kojima je pokazan niži nivo stresa i apoptotskih markera u odnosu na ćelije u kojima mutacija nije korigovana i koje nakon transplantacije nisu dovele do postizanja kontrole glikemije [54]. Nedavno je pokazano da alati koji se zasnivaju na CRISPR sistemu mogu da se koriste za multipleksno epigenetičko editovanje kako bi se pokrenula ekspresija gena specifičnih za beta ćelije u imortalizovanim humanim embrionalnim ćelijama bubrega (HEK293 ćelijska linija) i humanim indukovanim pluripotentnim ćelijama. Ova studija je pokazala princip usmeravanja ćelijske diferencijacije pomoću istovremenog korišćenja nekoliko različitih CRISPR/dCas9 sistema i to CRISPR/dCas9-VP160, CRISPR/dCas9-TET1 i CRISPR/dCas9-P300 kako bi se aktivirali geni za PDX1, NEUROG3, PAX4 i insulin. CRISPR/dCas9-P300 se pokazao kao najefikasniji u aktivaciji ekspresije svih ciljanih gena, dok kombinacija sva tri testirana sistema nije dala sinergistički efekat [55]. Takođe, CRISPR/dCas9-P300 je delovao najefikasnije kada je bio u kombinaciji sa samo jednom gRNK, čiji je efekat pak zavisio od pozicije na promotoru. Kombinacija 2-3 najefikasnije gRNK nije dala nikakvo poboljšanje u aktivaciji, što je u suprotnosti u odnosu na rezultate koji su dobijeni ispitivanjem sistema za utišavanje genske ekspresije [46].

U februaru 2022. godine je prvi put primenjena VCTX210 alogena terapija matičnim ćelijama koja je dizajnirana da nadomesti gubitak beta ćelija pankreasa u dijabetesu. CyT49 humane pluripotentne matične ćelije su modifikovane uz pomoć CRISPR/Cas9 sistema tako da izbegnu prepoznavanje i napad od strane autoimunskog sistema pacijenata, što bi moglo da omogući eliminaciju imunosupresivne terapije pri transplantaciji. Naime, ćelijskoj liniji CyT49 nedostaje gen *B2M* dok eksprimira CD274 koji je poznat kao progra-

mirani ligand smrti (PD-L1) koji štiti ćelije od napada T ćelija [56]. Ovaj pristup u ćelijskoj terapiji je u fazi 1 kliničkog ispitivanja, i do sada je potvrđeno da je kod prvog pacijenta koji je primio terapiju zabeležena proizvodnja insulina 90 dana od tretmana kao i smanjena upotreba egzogenog insulina za 91% [57, 58].

Transdiferencijacija alfa ćelija pankreasa

Kao glavni i najatraktivniji alternativni izvor ćelija za transdiferencijaciju u beta ćelije izdvojile su se alfa ćelije endokrinog pankreasa. Pored toga što se njihovim direktnim reprogramiranjem prevazilazi pluripotentno stanje i rizik od maligniteta, prednost koju poseduju alfa ćelije u odnosu na druge tipove ćelija je zajedničko poreklo sa beta ćelijama, visok nivo plastičnosti, bliska pozicioniranost u Langerhansovom ostrvcu i bogata prokrvljenost što obezbeđuje prirodno okruženje pogodno za njihovo preživljavanje i normalno funkcionisanje [52, 59]. Njihovom transdiferencijacijom bi se potencijalno obnovila masa beta ćelija, dok bi se istovremeno smanjio broj alfa ćelija i popravio narušeni balans između insulina i glukagona koji se javlja u dijabetesu [25, 60]. Alfa ćelije imaju sposobnost da se spontano transdiferenciraju u ćelije koje proizvode insulin nekoliko meseci nakon skoro potpunog gubitka beta ćelija kod miševa koji su tretirani toksinom difterije [61]. Veliki potencijal alfa ćelija da se indukovano transdiferenciraju u beta ćelije pokazuju različiti eksperimentalni pristupi koji ističu važnu ulogu transkripcionih faktora specifičnih za beta ćelije kao što su Pax4, PDX1, MafA ili Nkx6-1 [12, 62].

O povezanosti metilacije molekula DNK sa određivanjem ćelijskog identiteta govori i podatak da u odsustvu Dnmt1 i Arx-a iz alfa ćelija pankreasa miša dolazi do njihove transdiferencijacije u beta ćelije [63]. Ulogu Arx-a u određivanju identiteta alfa ćelija endokrinog pankreasa učvrstilo je istraživanje koje je pokazalo da je Arx u beta ćelijama pankreasa metilovan i utišan, dok je u alfa ćelijama i beta ćelijama kojima nedostaje *Dnmt1* hipometilovan i aktivan [64]. Rezultati ovog istraživanja inicirali su alternativni put za transdiferencijaciju alfa ćelija pankreasa. Naime, nakon samo jedne transfekcije i ciljanog utišavanja ekspresije isključivo gena *Arx* koji je krucijalan za održavanje identiteta alfa ćelija dolazi do pokretanja procesa njihove transdiferencijacije i tranzijentne ekspresije, sinteze i oslobađanja insulina iz ovih ćelija [65]. Nakon optimizacije procesa nukleofekcije u cilju efikasnije isporuke sistema za epigenetičko editovanje u alfa ćelijama pankreasa miša (α TC1-6 ćelijska linija) [26], upoređivan je nivo ekspresije gena *Arx* nakon primene tri različita konstrukta za gensku represiju. Korišćeni su dCas9-Dnmt3a3L, dCas9-KRAB i dCas9-Dnmt3a3L-KRAB u kombinaciji sa četiri gRNK dizajnirane da obuhvate promotorski region gena *Arx* [65]. Konstrukat dCas9-Dnmt3a-Dnmt3L uvodi metilaciju na oko 1000 bp udaljenih od ciljne sekvence, pri čemu su pikovi metilacije na 25 bp uzvodno od i 40 bp nizvodno od pozicije PAM sekvence, dok mesto vezivanja obezbeđeno komplementarnim sparivanjem ciljanog DNK molekula i gRNK u dužini od 20 bp ostaje fizički zaštićeno i ne-metilovano [36]. Domen KRAB deluje kao snažan represor transkripcije. On nema enzimatiku funkciju, ali regrutuje proteine utišavače koji modifikuju histone (histonske metiltransferaze, deacetilaze i kompleks za remodelovanje nukleozoma) i DNMT3A/3B, uspostavljajući heterohromatin [46, 66]. Rezultati ciljanog bisulfitnog sekvenciranja su pokazali da je konstrukat dCas9-Dnmt3a3L-KRAB (EpiCRISPR) bio najefikasniji u uvođenju metilacije. EpiCRISPR konstrukat predstavlja fuzioni protein koji sadrži katalitički domen mišijeg Dnmt3a, C-terminalni domen Dnmt3L i KRAB domen koji su kuplovani sa katalitički neaktivnim dCas9. Uvedena metilacija je za posledicu imala 45% niži nivo ekspresije iRNK za *Arx* do 7. dana od nukleofekcije, a nakon 12 dana se ekspresija podigla na početni nivo. Iako iRNK za *Cas9* nije detektovana u ovom periodu, uvedena metilacija je ostala bliža nivou detektovanom u beta ćelijskoj liniji nego inicijalnom nivou u alfa ćelijama. U 1% tranzijentno transfekovanih (reprogramiranih) alfa ćelija insulin je detektovan na nivou iRNK i proteina unutar i nakon oslobađanja iz ćelija do 15. dana nakon transfekcije. Iako nisu detektovane pro-

mene u nivou iRNK za glukagon, ove ćelije ga u manjoj meri sekretuju u odnosu na lažno transfekovane ćelije. Rezultati analize transkripcionog profila epigenetički modificovanih alfa ćelija pokazuju da je on sličniji profilu kontrolnih alfa nego beta ćelija iako je došlo do pokretanja ekspresije *Slc2a2* kao i *Pax4* i *MafA* na nivou iRNK (Slika 3). Dobijeni rezultati ukazuju na postojanje mehanizama koji održavaju identitet alfa ćelija i odupiru se promenama na nivou epigenoma. Takođe, zaključeno je i da se metilacija *Arx*-a može posmatrati kao neophodan signal za pokretanje ekspresije *Ins2* u alfa ćelijama [65]. Eksperimentalno je pokazano da editovanje epigenoma uz pomoć DNMT3A-dCas9 i KRAB-dCas9 dovodi do prolazne metilacije molekula DNK i trimetilacije histona H3 na lizin 9 i da ove modifikacije potpuno nestaju 24 dana nakon tretmana. Ustanovljeno je da su za maksimalnu represiju gena neophodne različite kombinacije histonskih modifikacija i metilacije molekula DNK odnosno fino podešavanje alata za editovanje u zavisnosti od lokusa i tipa ćelija [67].

Krajnji cilj ćelijskog reprogramiranja nije "perfektna" beta ćelija, koja u potpunosti odgovara zreloj beta ćeliji endokrinog pankreasa kako bi ostvarila terapijski potencijal. Nju pre svega treba da karakteriše odsustvo rizika od tumorigeneze ili hipoglikemijskih efekata kao i izdržljivost, da oslobađa dovoljno insulina i da reaguje na stimulaciju glukozom [52].

ZAKLJUČAK:

Inspirano prirodnom pojavom spontane promene identiteta terminalno diferenciranih tipova ćelija usled promena iz okruženja kao i zahvaljujući razvoju alata za editovanje (epi)genoma javio se novi pravac u razvoju potencijalnih tretmana dijabetesa. Saznanja koja su dobijena iz rezultata brojnih uspešno realizovanih pokušaja ćelijske transdiferencijacije iskorišćena su za razjašnjavanje osnova mehanizama ovog procesa, dok su sa druge strane otvorena i mnoga pitanja koja se tiču sposobnosti zadržavanja novonastalog stanja odn. tendencije ka vraćanju u pređašnje stanje. Postojanje mogućnosti uticanja na reprogramiranje ćelijskog identiteta pruža veliki značaj za modelovanje mnogih kompleksnih bolesti kao i potencijal za prevođenje u terapijske svrhe. Rezultat svih uloženi istraživačkih napora su klinička ispitivanja koja uključuju CRISPR terapiju za različite bolesti, uključujući i dijabetes i koja su uglavnom u prvoj fazi ispitivanja.

ZAHVALNICA:

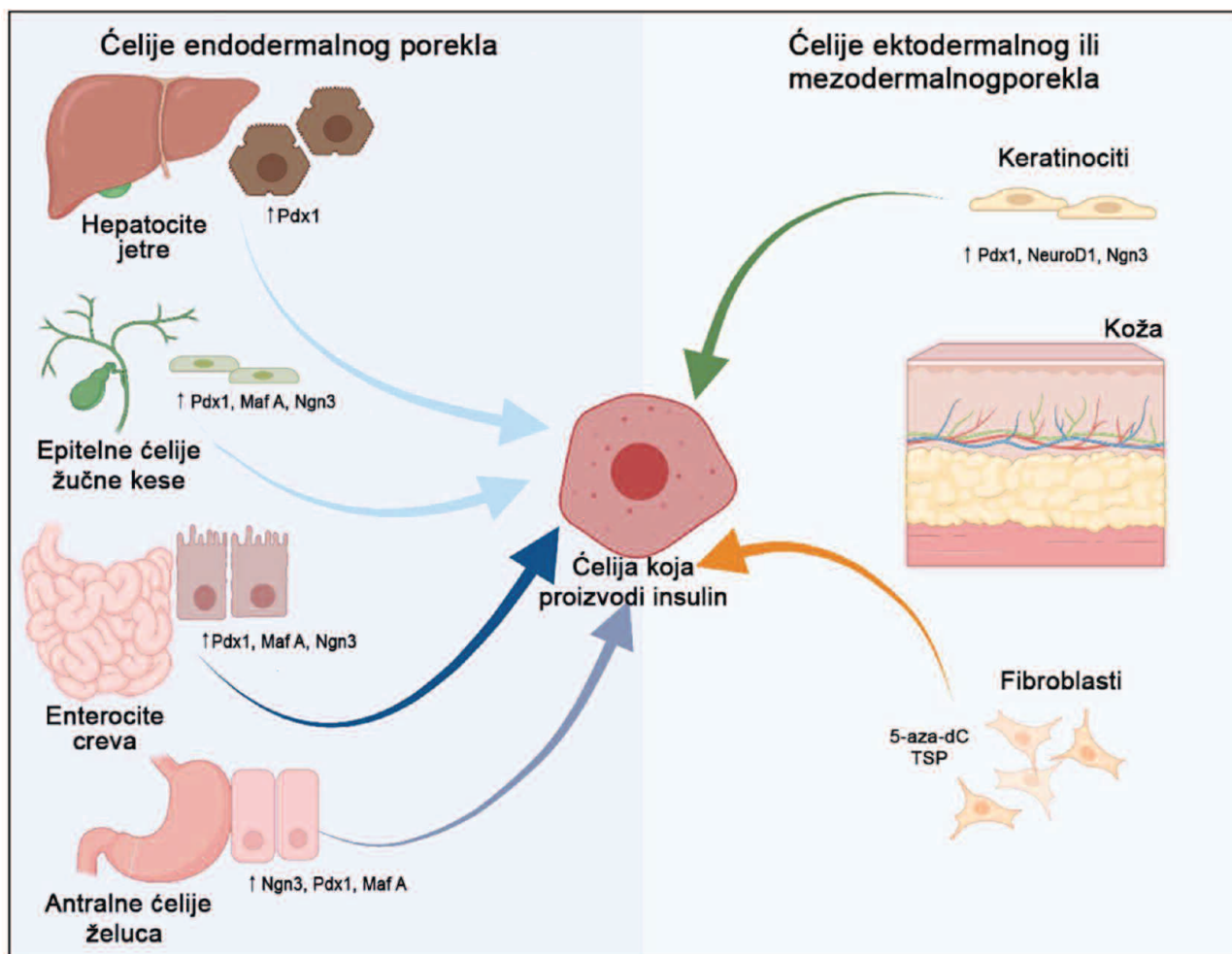
Izrada ovog rada je omogućena zahvaljujući projektu Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije, broj ugovora: 451-03-47/2023-01/ 200007 i Evropskoj federaciji za istraživanja u dijabetesu (engl. *European Foundation for the Study of Diabetes* EFSD), Evropskim istraživačkim programom u ćelijskoj plastičnosti koja se nalazi u osnovi patofiziologije dijabetesa tipa 2. Autori se zahvaljuju dr Tomašu P. Jurkovskom sa Univerziteta u Kardifu na njegovoj stručnoj pomoći i prijateljstvu, kao i na plazmidima za gensku represiju.

LITERATURA:

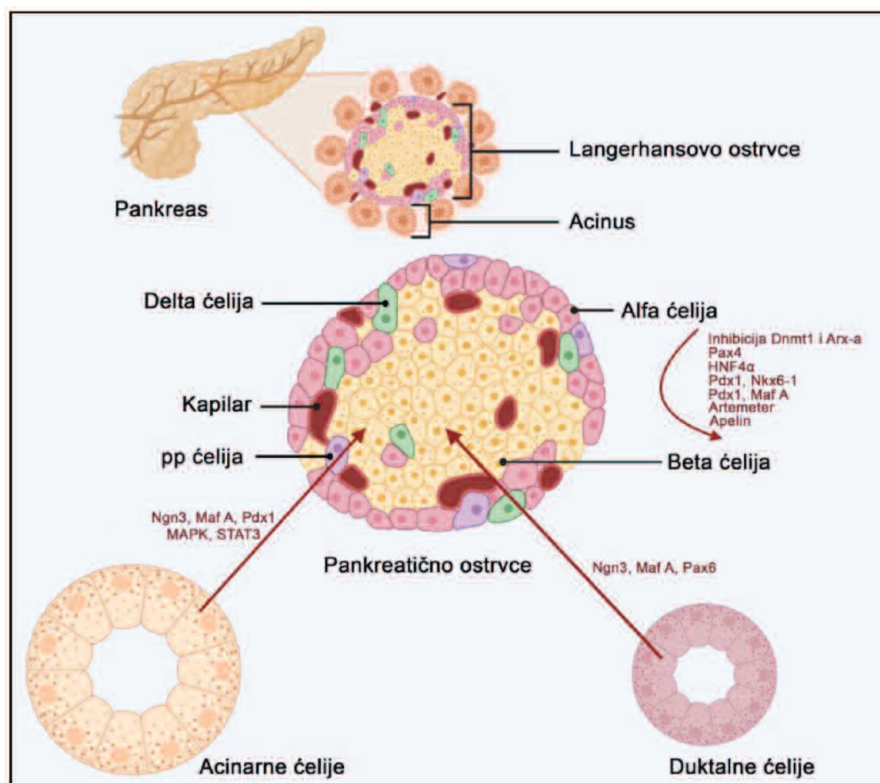
1. Tschen SI, Dhawan S, Gurlo T, Gurlo T, Bhushan A. Age-dependent decline in beta-cell proliferation restricts the capacity of beta-cell regeneration in mice. *Diabetes* 2009;58 (6): 1312–1320.
2. Donath MY, Halban PA. Decreased beta-cell mass in diabetes: significance, mechanisms and therapeutic implications. *Diabetologia* 2004;47 (3): 581-9.
3. Cornell S. Continual evolution of type 2 diabetes: an update on pathophysiology and emerging treatment options. *Ther Clin Risk Manag* 2015;11: 621-32.
4. Michels AW, Redondo MJ, Atkinson MA. The pathogenesis, natural history, and treatment of type 1 diabetes: time (thankfully) does not stand still. *Lancet Diabetes Endocrinol* 2022;10 (2): 90-2.
5. Ackermann AM, Gannon M. Molecular regulation of pancreatic beta-cell mass development, maintenance, and expansion. *J Mol Endocrinol* 2007;38 (1-2): 193-206.
6. Basile G, Qadir MMF, Mauvais-Jarvis F, Vetere A, Shoba V, Modell AE, et al. Emerging diabetes therapies: Bringing back the β -cells. *Molecular Metabolism* 2022;60: 101477.
7. Khurana I, Al-Hasani K, Maxwell S, K.N Harikrishan, Okabe J, Cooper ME, et al. DNA methylation status correlates with adult β -cell regeneration capacity. *NPJ Regenerative Medicine* 2021;6 (1): 7.
8. Ghoneim MA, Refaie AF, Elbassiouny BL, Gabr MM, Zakaria MM. From Mesenchymal Stromal/Stem Cells to Insulin-Producing Cells: Progress and Challenges. *Stem Cell Rev Rep* 2020;16 (6): 1156-72.
9. Goell JH, Hilton IB. CRISPR/Cas-Based Epigenome Editing: Advances, Applications, and Clinical Utility. *Trends in Biotechnology* 2021;39 (7): 678-91.
10. Kalra RS, Dhanjal JK, Das M, Singh B, Naithani R. Cell Transdifferentiation and Reprogramming in Disease Modeling: Insights into the Neuronal and Cardiac Disease Models and Current Translational Strategies. *Cells* 2021;10 (10): 2558.
11. Borowiak M, Melton DA. How to make beta cells? *Curr Opin Cell Biol* 2009;21 (6): 727-32.
12. Kalo E, Read S, Ahlenstiel G. Reprogramming-Evolving Path to Functional Surrogate β -Cells. *Cells* 2022;11 (18): 2183.
13. Ariyachet C, Tovaglieri A, Xiang G, Lu J, Shah MS, Richmond CA, et al. Reprogrammed Stomach Tissue as a Renewable Source of Functional β Cells for Blood Glucose Regulation. *Cell stem cell* 2016;18 (3): 410-21.
14. Mauda-Havakuk M, Litichever N, Chernichovski E, Nakar O, Winkler E, Mazkereth R, et al. Ectopic PDX-1 expression directly reprograms human keratinocytes along pancreatic insulin-producing cells fate. *PLOS ONE* 2011;6 (10): 18.
15. Salman IS, Al-Shammari AM, Haba MK. Direct Reprogramming of Mice Skin Fibroblasts into Insulin-Producing Cells In Vitro. *Cell Reprogram* 2022;24 (5): 271-82.
16. Ferber S, Halkin A, Cohen H, Ber I, Einav Y, Goldberg I, et al. Pancreatic and duodenal homeobox gene 1 induces expression of insulin genes in liver and ameliorates streptozotocin-induced hyperglycemia. *Nature medicine* 2020;6 (5), 568–572.
17. Hickey RD, Galivo F, Schug J, Brehm MA, Haft A, Wang Y, et al. Generation of islet-like cells from mouse gall bladder by direct ex vivo reprogramming. *Stem cell research* 2013;11 (1), 503–515.
18. Fontcuberta-PiSunyer M, García-Alamán A, Prades È, Téllez N, Alves-Figueiredo H, Ramos-Rodríguez M, et al. Direct reprogramming of human fibroblasts into insulin-producing cells using transcription factors. *Communications Biology* 2023;6 (1): 256.
19. Li W, Nakanishi M, Zumsteg A, Shear M, Wright C, Melton DA, et al. In vivo reprogramming of pancreatic acinar cells to three islet endocrine subtypes. *eLife* 2014;3: e01846.
20. Lee J, Sugiyama T, Liu Y, Wang J, Gu X, Lei J, et al. Expansion and conversion of human pancreatic ductal cells into insulin-secreting endocrine cells. *eLife* 2013;2: e00940.
21. Kim HJ, Bae SC. Histone deacetylase inhibitors: molecular mechanisms of action and clinical trials as anti-cancer drugs. *American journal of translational research* 2011;3 (2): 166-79.
22. Esposito S, Toni G, Tascini G, Santi E, Berioli MG, Principi N. Environmental Factors Associated With Type 1 Diabetes. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2019;10: 592.
23. Heerboth S, Lapinska K, Snyder N, Leary M, Rollinson S, Sarkar S. Use of epigenetic drugs in disease: an overview. *Genet Epigenet* 2014;6: 9-19.
24. Pfister SX, Ashworth A. Marked for death: targeting epigenetic changes in cancer. *Nature reviews. Drug discovery* 2017;16 (4): 241–263.
25. van der Meulen T, Huising MO. Role of transcription factors in the transdifferentiation of pancreatic islet cells. *J Mol Endocrinol* 2015;54 (2): R103-17.

26. Đorđević M, Paunović V, Jovanović Tucović M, Tolić A, Rajić J, Dinić S, et al. Nucleofection as an Efficient Method for Alpha TC1-6 Cell Line Transfection. *Applied Sciences* 2022;12 (15): 7938.
27. Wang H, Yang Y, Liu J, Qian L. Direct cell reprogramming: approaches, mechanisms and progress. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2021;22 (6): 410-24.
28. Mills JC, Stanger BZ, Sander M. Nomenclature for cellular plasticity: are the terms as plastic as the cells themselves? *The EMBO Journal* 2019;38 (19): e103148.
29. Goldberg AD, Allis CD, Bernstein E. Epigenetics: A Landscape Takes Shape. *Cell* 2007;128 (4): 635-8.
30. Waddington CH. Canalization of development and genetic assimilation of acquired characters. *Nature* 1959;183 (4676): 1654-1655.
31. Parveen N, Dhawan S. DNA Methylation Patterning and the Regulation of Beta Cell Homeostasis. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2021;12: 651258.
32. Moore LD, Le T, Fan G. DNA Methylation and Its Basic Function. *Neuropsychopharmacology*. 2013;38 (1): 23-38.
33. Golson ML, Kaestner KH. Epigenetics in formation, function, and failure of the endocrine pancreas. *Molecular Metabolism* 2017;6 (9): 1066-76.
34. Smith ZD, Meissner A. DNA methylation: roles in mammalian development. *Nature Reviews Genetics* 2013;14 (3): 204-20.
35. Miranda TB, Jones PA. DNA methylation: The nuts and bolts of repression. *Journal of Cellular Physiology* 2007;213 (2): 384-90.
36. Stepper P, Kungulovski G, Jurkowska RZ, Chandra T, Krueger F, Reinhardt R, et al. Efficient targeted DNA methylation with chimeric dCas9-Dnmt3a-Dnmt3L methyltransferase. *Nucleic Acids Res* 2017;45 (4): 1703-13.
37. Falahi F, van Kruchten M, Martinet N, Hospers G, Rots MG. Current and upcoming approaches to exploit the reversibility of epigenetic mutations in breast cancer. *Breast Cancer Research* 2014;16 (4): 412.
38. de Groote ML, Verschure PJ, Rots MG. Epigenetic Editing: targeted rewriting of epigenetic marks to modulate expression of selected target genes. *Nucleic acids research* 2012;40 (21): 10596-613.
39. Ou K, Yu M, Moss NG, Wang YJ, Wang AW, Nguyen SC, et al. Targeted demethylation at the CDKN1C/p57 locus induces human β cell replication. *The Journal of Clinical Investigation* 2019;129 (1): 209-14.
40. Doudna JA, Charpentier E. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science* 2014;346 (6213): 1258096.
41. Hsu PD, Lander ES, Zhang F. Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell* 2014;157 (6): 1262-78.
42. Barrangou R and Marraffini RB. CRISPR-Cas systems: Prokaryotes upgrade to adaptive immunity. *Molecular cell* 2014;54 (2): 234-244.
43. Wiedenheft B, Sternberg SH, Doudna JA. RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea. *Nature* 2012;482 (7385): 331-8.
44. Thakore PI, Black JB, Hilton IB, Gersbach CA. Editing the epigenome: technologies for programmable transcription and epigenetic modulation. *Nat Methods* 2016;13 (2): 127-37.
45. Li H, Yang Y, Hong W, Huang M, Wu M, Zhao X. Applications of genome editing technology in the targeted therapy of human diseases: mechanisms, advances and prospects. *Signal Transduction and Targeted Therapy* 2020;5 (1): 1.
46. Amabile A, Migliara A, Capasso P, Biffi M, Cittaro D, Naldini L, et al. Inheritable Silencing of Endogenous Genes by Hit-and-Run Targeted Epigenetic Editing. *Cell* 2016;167 (1): 219-32.
47. Capecchi MR. Altering the genome by homologous recombination. *Science* 1989;244 (4910): 1288-92.
48. Cheng AW, Wang H, Yang H, Shi L, Katz Y, Theunissen TW, et al. Multiplexed activation of endogenous genes by CRISPR-on, an RNA-guided transcriptional activator system. *Cell Res* 2013;23 (10): 1163-71.
49. Choudhury SR, Cui Y, Lubecka K, Stefanska B, Irudayaraj J. CRISPR-dCas9 mediated TET1 targeting for selective DNA demethylation at BRCA1 promoter. *Oncotarget* 2016;7 (29): 46545-56.
50. Chavez A, Scheiman J, Vora S, Pruitt BW, Tuttle M, P R Iyer E, et al. Highly efficient Cas9-mediated transcriptional programming. *Nature Methods* 2015;12 (4): 326-8.
51. Hilton IB, D'Ippolito AM, Vockley CM, Thakore PI, Crawford GE, Reddy TE, et al. Epigenome editing by a CRISPR-Cas9-based acetyltransferase activates genes from promoters and enhancers. *Nature Biotechnology* 2015;33 (5): 510-7.
52. Colarusso JL, Zhou Q. Direct Reprogramming of Different Cell Lineages into Pancreatic β -Like Cells. *Cellular Reprogramming* 2022;24 (5): 252-8.
53. Liao H-K, Hatanaka F, Araoka T, Reddy P, Wu M-Z, Sui Y, et al. In Vivo Target Gene Activation via CRISPR/Cas9-Mediated Trans-epigenetic Modulation. *Cell* 2017;171 (7): 1495-507.e15.

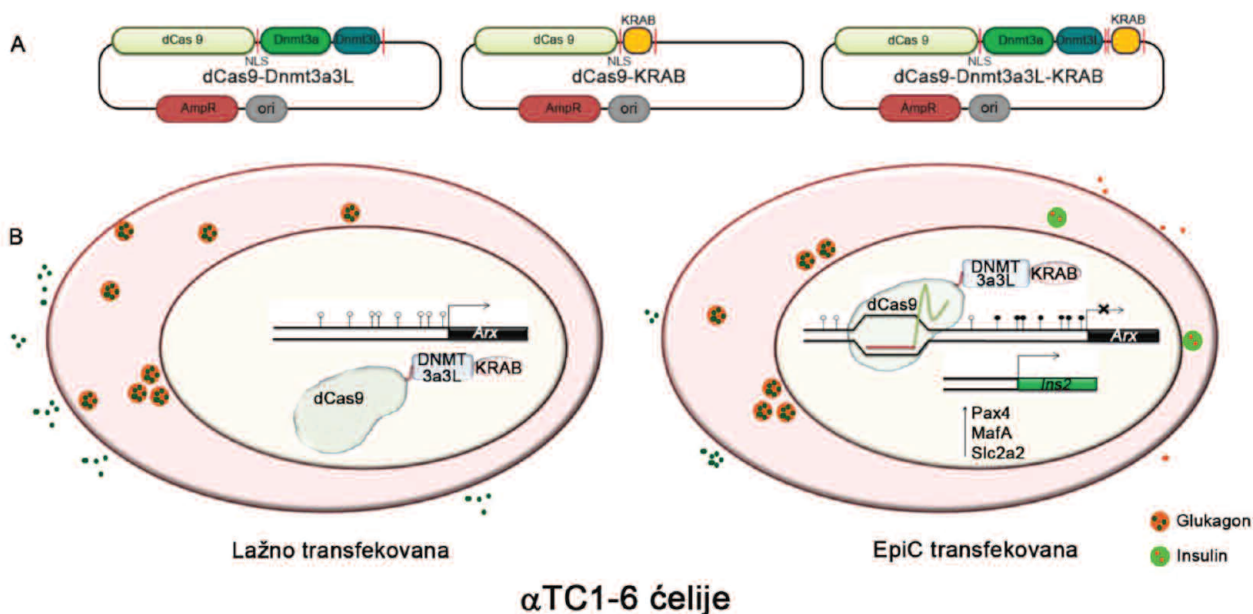
54. Maxwell KG, Augsornworawat P, Velazco-Cruz L, Kim MH, Asada R, Hoglebe NJ, et al. Gene-edited human stem cell-derived β cells from a patient with monogenic diabetes reverse preexisting diabetes in mice. *Sci Transl Med* 2020;12 (540): eaax9106.
55. Alejandra GC, Lucia C, Ho HS, Luis G, Juan RP, Federico P-B. Activation of pancreatic β -cell genes by multiplex epigenetic CRISPR-editing. *BioRxiv* 2020:2020.07.24.214544.
56. Ilic D, Ogilvie C. Pluripotent Stem Cells in Clinical Setting-New Developments and Overview of Current Status. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 2022;40 (9): 791-801.
57. Philippidis A. First Patient Dosed with VCTX210, a Cell Therapy for Type 1 Diabetes. *Genetic Engineering & Biotechnology News* 2022;42 (5): 10-1.
58. Yang L, Hu ZM, Jiang FX, Wang W. Stem cell therapy for insulin-dependent diabetes: Are we still on the road? *World journal of stem cells* 2022;14 (7): 503-12.
59. Saleh M, Gittes GK, Prasad K. Alpha-to-beta cell trans-differentiation for treatment of diabetes. *Biochemical Society Transactions* 2021;49 (6): 2539-48.
60. Unger RH, Cherrington AD. Glucagonocentric restructuring of diabetes: a pathophysiologic and therapeutic makeover. *J Clin Invest* 2012;122 (1): 4-12.
61. Thorel F, Népoté V, Avril I, Kohno K, Desgraz R, Chera S, et al. Conversion of adult pancreatic α -cells to β -cells after extreme β -cell loss. *Nature* 2010;464 (7292): 1149-54.
62. Guo P, Zhang T, Lu A, Shiota C, Huard M, Whitney KE, et al. Specific reprogramming of alpha cells to insulin-producing cells by short glucagon promoter-driven Pdx1 and MafA. *Molecular Therapy - Methods & Clinical Development* 2023;28: 355-65.
63. Chakravarthy H, Gu X, Enge M, Dai X, Wang Y, Damond N, et al. Converting adult pancreatic islet α cells into β cells by targeting both Dnmt1 and Arx. *Cell metabolism* 2017;25 (3): 622-34.
64. Dhawan S, Georgia S, Tschen SI, Fan G, Bhushan A. Pancreatic β cell identity is maintained by DNA methylation-mediated repression of Arx. *Dev Cell* 2011;20 (4): 419-29.
65. Đorđević M, Stepper P, Feuerstein-Akgoz C, Gerhauser C, Paunović V, Tolić A, et al. EpiCRISPR targeted methylation of Arx gene initiates transient switch of mouse pancreatic alpha to insulin-producing cells. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2023;14: 1134478.
66. Groner AC, Meylan S, Ciuffi A, Zangger N, Ambrosini G, Dénervaud N, et al. KRAB-zinc finger proteins and KAP1 can mediate long-range transcriptional repression through heterochromatin spreading. *PLoS Genet* 2010;6 (3): 1000869.
67. O'Geen H, Bates SL, Carter SS, Nisson KA, Halmaj J, Fink KD, et al. Ezh2-dCas9 and KRAB-dCas9 enable engineering of epigenetic memory in a context-dependent manner. *Epigenetics & Chromatin* 2019;12 (1): 26.



Slika 1. Somatske ćelije kao izvor ćelija za transdiferencijaciju u ćelije koje proizvode insulin. Ćelije endodermalnog porekla su hepatocite, epitelne ćelije žučne kese, ćelije intestinalnih kripti i antralne ćelije želuca; ćelije ektoermalnog porekla su keratinociti, a fibroblasti su mezodermalnog porekla. Pored tipa ćelija dat je spisak transkripcionih faktora ili tretmana koji su primenjeni u cilju transdiferencijacije. (Preuzeto i modifikovano od Kalo i sar., 2022) [12].



Slika 2. Shematski prikaz Langerhansovog ostrvca i pokušaja transdiferencijacije pankreatičnih ćelija u ćelije koje proizvode insulin. Pored crvenih strelica su pobrojani transkripcijski faktori i njihove kombinacije ili hemijski agensi koji su korišćeni u eksperimentima za indukciju ćelijske transdiferencijacije (Preuzeto i modifikovano od Kalo i sar., 2022) [12].



Slika 3. Metilacija promotora *Arx*-a dovodi do pokretanja ekspresije *Ins2* u alfa ćelijama (α TC1-6 ćelijska linija). A) Shematski prikaz konstrukata koji su korišćeni za dirigovanu represiju *Arx* gena. B) „Lažno“ transfekovanim alfa ćelijama nedostaju četiri gRNA uz pomoć kojih se dCas9-Dnmt3a3L-KRAB konstrukat veže za promotor *Arx* gena. U EpiC transfekovanim ćelijama (ćelije transfekovane kombinacijom plazmida koji nose dCas9-Dnmt3a3L-KRAB fuzioni konstrukat, reporterski konstrukat i 4 gRNA za *Arx*) se nakon smanjene ekspresije *Arx*-a beleži pokretanje ekspresije insulina na nivou iRNA i proteina, kao i pokretanje ekspresije *Pax4*, *MafA* i *Slc2a2* koji su karakteristični za beta ćelije pankreasa (Preuzeto i prilagođeno od Đorđević i sar., 2023) [65].

Uticaj delecije gena *Mif* na razvoj gojaznosti i steatoze jetre kod miševa na režimu ishrane obogaćene fruktozom

Ljupka Gligorovska i Ana Djordjevic

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

Kontakt: ljupkag@ibiss.bg.ac.rs

Apstrakt

Hronična inflamacija niskog intenziteta ima važnu ulogu u patogenezi metaboličkih poremećaja, kao što su gojaznost i dislipidemija, koji su često izazvani ishranom obogaćenom fruktozom i predstavljaju faktore rizika za razvoj steatoze jetre i dijabetesa tipa 2. Faktor inhibicije migracije makrofaga (MIF) je plejotropni citokin koji pored uloge u regulaciji imunskog odgovora može da reguliše metaboličke procese i oslobađanje insulina iz pankreasa, međutim njegova uloga u metaboličkoj inflamaciji nije još uvek dovoljno razjašnjena. Dodatno, pokazano je da se miševi sa deletiranim genom za *Mif* odlikuju izmenjenom osetljivošću na insulin i glukozu. Stoga, fokus ovog rada je bio usmeren ka boljem razumevanju molekularnih mehanizama metaboličkih efekata MIF-a, kao i ka rasvetljavanju kontroverzne uloge ovog citokina u razvoju poremećaja lipidnog metabolizma u jetri i visceralnom masnom tkivu miševa na režimu ishrane obogaćene fruktozom.

Ključne reči: faktor inhibicije migracije makrofaga, fruktoza, visceralno masno tkivo, jetra, glukokortikoidni hormoni, lipidni metabolizam, insulinska rezistencija.

The effects of deletion of the *Mif* gene on the development of obesity and hepatic steatosis in mice on fructose enriched diet

Ljupka Gligorovska and Ana Djordjevic

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

Correspondence: ljupkag@ibiss.bg.ac.rs

Abstract

Chronic low-grade inflammation plays an important role in the development of metabolic disorders such as obesity and dyslipidemia, which are often induced by a fructose-enriched diet and are risk factors for the development of hepatic steatosis and type 2 diabetes. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) is a pleiotropic cytokine that, in addition to its role in regulating the immune response, can regulate metabolic processes and the release of insulin from the pancreas; however, its role in metabolic inflammation is not well understood. In addition, mice with a deleted *Mif* gene were found to have altered sensitivity to insulin and glucose. Therefore, the focus of this work was to better understand the molecular mechanisms of the metabolic effects of MIF and to elucidate the controversial role of this cytokine in the development of dyslipidemia in the liver and visceral adipose tissue of mice on fructose-enriched diet.

Key words: macrophage migration inhibitory factor, fructose, visceral adipose tissue, liver, glucocorticoid hormones, lipid metabolism, insulin resistance.

UVOD

Fruktoza ili voćni šećer je monosaharid koji se nalazi u medu, voću i povrću, i u ovom obliku predstavlja deo zdrave, uravnotežene ishrane. Međutim, glavni izvor fruktoze u današnjoj ishrani su zaslađivači koji se koriste u industriji pića i hrane. Fruktoza se u njima nalazi u obliku saharoze, koja sadrži 50% fruktoze i 50% glukoze, i visokofruktoznog kukuruznog sirupa, koji sadrži između 42% i 55% fruktoze (1). Ovi zaslađivači predstavljaju dodate šećere koji hrani daju teksturu, slatkoću i ukus, ali takođe doprinose i izgledu, očuvanju i energetskom sadržaju hrane. Proizvodi kojima se ovi šećeri najčešće dodaju su bezalkoholni napici, sokovi i pekarski proizvodi (2).

Globalne promene u ishrani ljudi poslednjih decenija doprinele su povećanoj konzumaciji fruktoze širom sveta, posebno u razvijenim zemljama. Zabrinutost zbog prekomerne upotrebe zaslađivača u ishrani potiče od zapažanja da je povećanje potrošnje dodatog šećera povezano sa povećanom učestalošću metaboličkih poremećaja, kao što su insulinska rezistencija, gojaznost i nealkoholna masna bolest jetre (eng. *non-alcoholic fatty liver disease*, NAFLD) (3). Osim toga, pokazalo se da je konzumacija šećera u tečnom obliku štetnija po ljudsko zdravlje od konzumiranja u čvrstom obliku, jer unos tečnih šećera, odnosno fruktoze u zaslađenim pićima, ne dovodi do kompenzovanog smanjenja unosa hrane rezultujući pozitivnim energetskim balansom (4). Takođe, tečnu hranu nije potrebno žvakati i drugačije utiče na osećaj sitosti, što dovodi do smanjenja odgovora pankreasa i oslobađanja insulina. Međutim, čini se da štetni efekti velike konzumacije zaslađenih napitaka nisu samo stvar kalorija, već mogu zavisiti i od vrste šećera koji se konzumira. Istraživanja koja su upoređivala efekte konzumiranja napitaka zaslađenih glukozom i fruktozom su pokazala da glukoza dovodi do većeg povećanja postprandijalnih nivoa insulina i glukoze u krvi, u poređenju sa fruktozom (5,6). Pored toga, primećeno je i smanjenje koncentracija hormona leptina u krvi, kao i proizvodnje grelina. Grelina, glukoza, leptin i insulin predstavljaju glavne regulatore unosa hrane i telesne mase delujući putem centralnog nervnog sistema. Pošto konzumacija fruktoze dovodi do inhibicije ovih signala ili smanjenja njihove koncentracije, hronična ishrana obogaćena fruktozom dovodi do povećanja unosa energije i razvoja leptinske i insulinske rezistencije, visceralne gojaznosti i dislipidemije (2).

Gojaznost je kompleksna bolest koja ugrožava opšte zdravlje ljudi usled povezanosti sa nastankom mnogobrojnih metaboličkih poremećaja, uključujući dislipidemiju, dijabetes tipa 2 (T2D), NAFLD, kardiovaskularne bolesti i rak (7). Gojaznost je multifaktorska bolest na čiji nastanak utiču genetički i epigenetički faktori, hormonski status, životna sredina, kvalitet hrane, socio-ekonomski status i brojni drugi faktori. Brojne studije su pokazale da je gojaznost „stečena“ bolest koja zavisi od navika i faktora životnog stila, kao što su hroničan prekomerni unos hrane i niska stopa fizičke aktivnosti, uprkos genetičkoj i epigenetičkoj osnovi (8). Iako je gojaznost predmet brojnih istraživanja poslednjih godina, osnovni molekularni mehanizmi još uvek nisu u potpunosti razjašnjeni i postoji potreba da se identifikuju klinički biomarkeri ranog razvoja gojaznosti, kao i da se razviju uspešnji metodološki pristupi za njeno lečenje.

Svetska zdravstvena organizacija definiše gojaznost kao prekomernu akumulaciju masnih naslaga usled povećanog unosa energije u odnosu na potrošnju energije do stepena koji može da ugrozi zdravlje (9). Na ćelijskom nivou, višak energije se nakuplja u vidu triglicerida, što može da rezultira povećanjem zapremine masnih ćelija (hipertrofija) i/ili povećanjem broja masnih ćelija usled formiranja novih ćelija procesom adi-

pogenezu (hiperplazija) (10).

VISCERALNA GOJAZNOST

Ćelije masnog tkiva (adipociti) se akumuliraju u različitim delovima tela i formiraju depoe masnog tkiva na čiju distribuciju utiču faktori poput starosti, pola, genotipa, hormonskog statusa, ishrane, fizičke aktivnosti i lekova (11). U zavisnosti od strukture, kod ljudi razlikujemo belo i mrko masno tkivo. U adipocitima belog masnog tkiva nalazi se jedna, centralno postavljena, masna kap koja potiskuje citoplazmu i jedro ka periferiji, dok se adipociti mrkog masnog tkiva odlikuju mnogobrojnim masnim kapljicama i većim brojem mitohondrija (12). U zavisnosti od lokalizacije, belo masno tkivo je podeljeno na subkutano i visceralno masno tkivo koja imaju različita metabolička svojstva (10). Pored uloge u skladištenju energije, subkutano i visceralno masno tkivo su metabolički aktivni organi koji proizvode i luče različite faktore, kao što su lipidi, egzozomi, citokini i peptidni hormoni poput adiponektina i leptina (13). Iako i subkutano i visceralno masno tkivo imaju ulogu u razvoju gojznosti, visceralno masno tkivo je posebno značajno zbog povezanosti sa nekoliko metaboličkih poremećaja, uključujući dislipidemiju, insulinsku rezistenciju i T2D (11). Visceralnu gojznost karakteriše akumulacija masnih naslaga oko organa unutar abdomena zbog čega se često označava i kao centralna gojznost. Kod pacijenata sa visceralnom gojznošću najčešće se sreće dislipidemija koja se karakteriše hipertrigliceridemijom i niskim nivoom lipoproteina visoke gustine u krvi, što može doprineti akumulaciji masnih naslaga u krvnim sudovima i razvoju kardiovaskularnih oboljenja (14). Takođe, brojne studije su pokazale da visceralna gojznost doprinosi razvoju insulinske rezistencije i T2D, nezavisno od koncentracije glukoze i insulina u krvi, indeksa telesne mase i porodične istorije (15). Pored toga, pacijenti sa ovim oblikom gojznosti imaju povećanu koncentraciju postprandijalnih slobodnih masnih kiselina i veći rizik od razvoja NAFLD-a insulinske rezistencije jetre zahvaljujući direktnoj izloženosti jetre oslobađajućim faktorima iz visceralnog masnog tkiva putem portalne vene (10). Faktori poput polnih hormona, hormona rasta, hiperkalorijske ishrane i lokalne sinteza glukokortikoidnih hormona u visceralnom masnom tkivu mogu biti odgovorni za njegovu povećanu akumulaciju (14).

NEALKOHOLNA MASNA BOLEST JETRE

Jetra predstavlja centralni organ za održavanje energetske homeostaze kao mesto gde se odvija metabolizam osnovnih energetskih supstrata, masnih kiselina i glukoze, kao i hranljivih materija, koje se apsorbiraju iz hrane i ulaze u jetru preko portalne vene. Jetra igra ključnu ulogu u održavanju nivoa glukoze u krvi regulacijom ravnoteže između procesa glukoneogeneze (sinteza glukoze iz laktata, glicerola i glukogenih aminokiselina), glikogeneze (skladištenje glukoze u vidu glikogena) i glikogenolize (razgradnja glikogena do glukoze) (16). Jetra igra ulogu i u održavanju homeostaze lipida, pri čemu je i ovaj proces regulisan delovanjem glukokortikoida i insulina, koji deluju sinergistički i stimulišu lipogenezu (17).

Kao što je već pomenuto, gojznost se razvija kao rezultat pozitivnog hroničnog energetskog balansa pri čemu dolazi do poremećaja metabolizma glukoze i lipida u različitim organima, posebno u masnom tkivu i jetri. U takvim uslovima, visceralno masno tkivo gubi sposobnost dalje akumulacije lipida, što dovodi do povećanog priliva i nakupljanja lipida u jetri (steatoza jetre) i razvoja NAFLD (18). Poreklo deponovanih lipida u jetri je složeno i istraživanja su pokazala da najveći deo triglicerida potiče od priliva slobodnih masnih kiselina iz masnog tkiva putem portalne cirkulacije, deo lipida se sintetiše u jetri tokom procesa *de novo* lipogeneze, dok je najmanji deo lipida poreklom od hrane (19). NAFLD predstavlja spektar bolesti u rasponu od hepatocelularne steatoze sa benignom prognozom, preko nealkoholnog steatohepatitisa (eng. *non-alcoholic steatohepatitis*, NASH-om), koji se karakteriše pojavom inflamacije i nekroze. Strukturno, steatoza

jetre se manifestuje kao akumulacija makrovezikularnih masnih kapljica u preko 5% hepatocita. S druge strane, jetra pacijenata sa NASH om se odlikuje prisustvom steatoze sa balonirajućom degeneracijom hepatocita, inflamacijom i fibrozom (20). Inflamacija podrazumeva aktivaciju Kupferovih ćelija (makrofaga), nekrozu i povećan nivo adipocitokina i pro-inflamatornih citokina, poput interleukina-1 β (IL-1 β), IL-6 i tumorskog faktora nekroze (TNF) (21). Na taj način nastalo pro-inflamatorno stanje utiče na pojavu insulinske rezistencije u jetri i zajedno sa hiperinsulinemijom može menjati sadržaj lipida u jetri dovodeći do stimulacije procesa lipogeneze i smanjenja β oksidacije masnih kiselina.

Brojna istraživanja su pokazala da ishrana obogaćena fruktozom može da dovede do poremećaja homeostaze lipida, izazivajući povećanje nivoa triglicerida u krvi, akumulaciju lipida u masnom tkivu i povećanu ektopičnu akumulaciju lipida u jetri (22). Konzumacija velikih količina fruktoze dovodi do povećanja sinteze lipogenih prekursora u jetri, ključnih transkripcionih regulatora i svih enzima uključenih u proces *de novo* lipogeneze. Povećan sadržaj intrahepatičnih lipida podstiče povećanu proizvodnju i oslobađanje lipoproteina veoma male gustine (eng. *very low density lipoprotein*, VLDL), što može da dovede do razvoja sistemske insulinske rezistencije, NAFLD-a i metaboličkog sindroma (23).

Lipidni metabolizam u masnom tkivu i jetri

Pored svoje izolacione i mehaničke funkcije, masno tkivo igra važnu ulogu u održavanju energetske homeostaze organizma regulišući procese unosa hrane i potrošnje energije. Tokom perioda smanjene potrošnje energije i/ili povećanog unosa hrane, višak energije se skladišti u masnom tkivu u vidu triglicerida. Međutim, kada se smanji unos hrane i poveća potrošnja energije, aktivira se proces lipolize u kome se trigliceridi razlažu na glicerol i slobodne masne kiseline koje ulaze u krvotok i bivaju korišćene od strane većine organa kao energetski supstrat (24). Glavni enzimi za razgradnju deponovanih lipida su adipozna lipaza triglicerida (eng. *adipose triglyceride lipase*, ATGL) i lipaza osetljiva na dejstvo hormona (eng. *hormone sensitive lipase* HSL) (25). Sa druge strane, *de novo* lipogeneza predstavlja proces sinteze masnih kiselina iz acetil-koenzima A (acetil-CoA), koje se zatim skladište u vidu triglicerida u masnim kapljicama, ili se koriste za ugradnju u strukturne lipide, naknadnu oksidaciju ili posttranslacione modifikacije (26). Nakon obroka bogatog ugljenim hidratima dolazi do aktivacije ključnih enzima lipogeneze, acetil-CoA karboksilaze (eng. *acetyl-CoA carboxylases*, ACC) i sintaza masnih kiselina (eng. *fatty acid synthase*, FAS) (24). Ekspresija ovih enzima u masnom tkivu je kontrolisana brojnim regulatorima transkripcije, od kojih je najvažniji protein koji se vezuje za element regulisan sterolom 1c (eng. *sterol regulatory element binding protein*, SREBP1c) (27). Ovaj transkripcioni regulator je identifikovan kao važan regulator homeostaze masnih kiselina i holesterola, ali i kao regulator aktivnosti receptora aktiviranog peroksizomalnim proliferatorom γ (eng. *peroxisome proliferator-activated receptor γ* , PPAR γ), koji igra važnu ulogu u procesu diferencijacije adipocita tokom adipogeneze (28).

Iako belo masno tkivo funkcioniše kao primarni rezervoar za akumulaciju triglicerida, jetra je takođe u stanju da skladišti značajne količine lipida prilikom poremećaja energetske homeostaze. Mehanizmi koji dovode do povećane akumulacije masnih kiselina i triglicerida u jetri uključuju (29):

- Povećanje koncentracije triglicerida iz creva koji ulaze u jetru kao hilomikronske čestice;
- Povećanje priliva masnih kiselina u jetru dobijenih lipolizom u masnom tkivu;
- Povećanje sinteza triglicerida u jetri iz masnih kiselina nastalih tokom *de novo* lipogeneze;
- Inhibiciju β -oksidacije masnih kiselina u mitohondrijama ćelija jetre;
- Smanjenje izvoza lipida iz jetre u formi VLDL-a.

Metabolizam lipida je strogo regulisan kombinovanim delovanjem regulatora transkripcije, unutar-ćelijskih signalnih puteva, jedarnih receptora i hormona. Enzimi koji su uključeni za proces *de novo* lipogeneze su regulisani na nivou transkripcije od strane SREBP1c, proteina koji reaguje na ugljene hidrate (eng. *carbohydrate responsive element binding protein*, ChREBP) i receptora jetre X (eng. *liver X receptor α/β* , LXRA/ β) (26). Nakon obroka bogatog šećerima, dolazi do povećanja specifičnih metabolita glukoze, koji menjaju funkciju i lokalizaciju ovih transkripcionih faktora (30). SREBP1c i LXRA/ β su transkripcioni faktori koji regulišu ekspresiju brojnih gena lipogeneze među kojima su ACC, FAS i SCD1 (31). Insulin stimuliše aktivnost SREBP1c, dok je ekspresija LXRA/ β i ChREBP stimulisana od strane glukoze, što ukazuje na značajnu ulogu insulina i glukoze u regulaciji *de novo* lipogeneze u jetri (32).

Ekspresija gena uključenih u mitohondrijalnu oksidaciju masnih kiselina je u velikoj meri regulisana aktivnošću transkripcionog regulatora PPAR α , koji stimuliše formiranje ketonskih tela i deluje kao sensor za lipide (33). Poremećaji homeostaze lipida u jetri mogu da dovedu do razvoja lipotoksičnosti, inflamacije i nealkoholne masne bolesti jetre.

Glavni hormoni koji regulišu metabolizam lipida su kateholamini, hormon rasta, glukagon, insulin i glukokortikoidi. Hronična patološka stanja, poput dijabetesa, gojaznosti, NAFLD i kardiovaskularnih bolesti, menjaju koncentracije ovih hormona i posledično dovode do promene sadržaja lipida u tkivima. Glukokortikoidni hormoni (kortizol kod ljudi, kortikosteron kod glodara) su uključeni u regulaciju brojnih fizioloških procesa, kao što su imunski odgovor, metabolizam, rast i razvoj, i igraju izuzetno važnu ulogu u normalnom funkcionisanju kardiovaskularnog i centralnog nervnog sistema (34). Važnu ulogu u delovanju ovih hormona imaju enzimi pre-receptorskog metabolizma: 11 β -hidroksisteroid dehidrogenaza-1 (eng. *11 β hydro-xyteroid dehydrogenase-1*, 11 β HSD-1) i heksozo-6-fosfat dehidrogenaza (eng. *hexose-6-phosphate dehydrogenase*, H6PDH), koji prevode glukokortikoide iz neaktivne u aktivnu formu. Glavni posrednik u delovanju ovih hormona je glukokortikoidni receptor (GR) - transkripcioni regulator koji u masnom tkivu direktno reguliše gene lipolize i/ili lipogeneze, dok u jetri deluje kao modulator lipidnog profila (25). Metabolički efekti glukokortikoida se ogledaju u tome što svojim dejstvom mogu uzrokovati pojavu dislipidemije, hiperglikemije, periferne i sistemske insulinske rezistencije. U normalnim uslovima, insulin se sekretuje nakon unosa hrane i stimuliše unos glukoze u tkiva, pri čemu inhibira proces glukoneogeneze. Glukokortikoidi mogu da deluju i antagonistički i sinergistički u odnosu na insulin, u zavisnosti od vrste tkiva, unosa hrane i interakcije sa kateholaminima koji se luče prilikom stresa (35). Kada je masno tkivo u pitanju, efekti glukokortikoidnih hormona se razlikuju u zavisnosti od depoa masnog tkiva. U subkutanom masnom tkivu, glukokortikoidni hormoni stimulišu lipolizu, dok u visceralnom masnom tkivu aktiviraju diferencijaciju i hipertrofiju adipocita (17). Hronično povišena koncentracija glukokortikoidnih hormona takođe je povezana sa pojavom masne jetre i razvojem steatoze. Glukokortikoidi deluju sinergistički sa insulinom i dovode do povećane akumulacije lipida u jetri aktivirajući ključne lipogene enzime (ACC i FAS) i stimulišući sintezu i sekreciju VLDL-a iz jetre (17). Pored toga, glukokortikoidi dodatno doprinose unutar ćelijskoj akumulaciji lipida inhibirajući transkripcionu aktivnost PPAR α , što dovodi do smanjenja β -oksidacije masnih kiselina u mitohondrijama (36).

METABOLIČKA INFLAMACIJA

Hronična inflamacija niskog intenziteta, označena još i kao metabolička inflamacija ili „metainflamacija“, ima važnu ulogu u patogenezi metaboličkih poremećaja, kao što su gojaznost, dislipidemija, insulinska rezistencija, T2D i može dovesti do razvoja metaboličkog sindroma. Ovakav tip inflamacije može biti izazvan narušenom metaboličkom ravnotežom usled prekomernog unosa hrane i javlja se u tkivima uključenim u proces održavanja energetske homeostaze, poput masnog tkiva, mišića i jetre (37).

Kao što je već pomenuto, gojaznost predstavlja akumulaciju lipida u masnom tkivu i može da dovede do mehaničkog i oksidativnog stresa, hipoksije i smrti ćelija masnog tkiva (10). Usled ekspanzije masnog tkiva dolazi do aktivacije imunskog odgovora i infiltracije monocita i drugih imunskih ćelija (18). U visceralnom masnom tkivu ljudi i miševa, glavna populacija leukocita su makrofagi, čija se brojnost može povećati dejstvom lipopolisaharida, holesterola i slobodnih masnih kiselina (38). Makrofagi koji se nalaze u masnom tkivu mogu se klasifikovati u dve glavne populacije: M1, klasično aktivirani makrofagi sa pro-inflamatornim svojstvima, i M2, alternativno aktivirani makrofagi sa anti-inflamatornim svojstvima (39). U masnom tkivu mršavih ljudi i miševa, preovladavaju M2 makrofagi koji luče anti-inflamatorne citokine, što dovodi do inhibicije inflamacije masnog tkiva i održavanja insulinske osetljivosti u adipocitima (40). Nasuprot tome, tokom gojaznosti dolazi do deregulacije i inflamacije masnog tkiva usled nekrotičnih abnormalnosti adipocita, što dovodi do infiltracije imunskih ćelija, povećanja broja M1 makrofaga i formiranja „strukture nalik kruni“ (18). Nakon aktivacije, M1-polarizovani makrofagi indukuju sintezu pro-inflamatornih citokina, kao što su IL-1 β , IL-6, IL-8 i TNF, koji doprinose razvoju inflamacije i insulinske rezistencije (40). Glavnu ulogu u M1 polarizaciji makrofaga ima plejotropni citokin, faktor inhibicije migracije makrofaga (eng. *macrophage migration inhibitory factor*, MIF), koji reguliše inflamaciju i imunski odgovor. Iako je poznato da MIF deluje kao glavni regulator brojnih pro-inflamatornih citokina, njegova uloga u metaboličkoj inflamaciji nije u potpunosti razjašnjena (41,42).

FAKTOR INHIBICIJE MIGRACIJE MAKROFAGA

MIF je prvi put opisan u drugoj polovini prošlog veka, kao produkt T-ćelija koji inhibira migraciju makrofaga (43). U narednim godinama brojne studije su ukazale na to da MIF poboljšava funkciju makrofaga i monocita, međutim, biološka funkcija ovog citokita je bila nepoznata sve do 1989. godine kada je, zahvaljujući razvoju molekularno bioloških metoda, kloniran ljudski MIF (44). Dalja istraživanja su ukazala na potencijalnu ulogu MIF-a kao medijatora između endokrinog, imunskog i nervnog sistema. Sa druge strane, trodimenzionalna struktura pacovskog i humanog MIF-a dobijena rendgenskom kristalografijom ovog proteina je ukazala na njegovu potencijalnu enzimsku aktivnost (45,46). Takođe, proizvodnja bioaktivnog rekombinantnog MIF-a, kao i neutrališućih antitela, pružila je nova saznanja o aktivnosti ovog proteina i njegovim karakteristikama, dok je razvoj mišjeg modela kod kojeg je deletiran gen *Mif* (*Mif*^{-/-}, MIF knock-out) dodatno doprineo ispitivanju uloge proteina MIF (47).

Gen *MIF* je konstitutivno eksprimiran u mnogim tkivima poput kože, pluća, urinarnog i gastrointestinalnog trakta, u raznim endokrinim žlezdama i imunskim ćelijama (48). Brojni endotoksini i inflamatorni citokini stimulišu ekspresiju gena za MIF i oslobađanje ovog pro-inflamatornog citokina iz ćelije dovodeći do aktivacije imunskog odgovora (48). Takođe, MIF ostvaruje svoju pro-inflamatornu ulogu delujući na glukokortikoide koji su poznati po svojoj anti-inflamatornoj funkciji. Male koncentracije glukokortikoida stimulišu oslobađanje MIF-a iz makrofaga i T limfocita, koji deluje antagonistički u odnosu na glukokortikoidne hormone i tako modulišu odgovore urođenog i adaptivnog imunskog sistema (49,50). Pored svoje primarne uloge u regulisanju imunskog sistema, novije studije sugerišu da MIF igra ulogu i u energetsom metabolizmu. MIF se eksprimira u metabolički aktivnim tkivima, masnom tkivu i jetri, gde je njegova ekspresija regulisana dejstvom glukoze i insulina (51). Pored toga, MIF je lokalizovan sa insulinom u sekretornim granulama β -ćelija pankreasa i modulira oslobađanje insulina (52). Sve veći broj istraživanja ukazuje na to da MIF kontroliše inflamatorne i metaboličke procese u razvoju gojaznosti i srodnih bolesti, uključujući insulinsku rezistenciju, NAFLD i T2D. Pokazano je da je MIF važan posrednik u razvoju gojaznosti s obzirom da je nekoliko kliničkih studija pokazalo da je koncentracija MIF proteina u plazmi povećana kod gojaznih

osoba u poređenju sa mršavim osobama, dok sa mršavljenjem dolazi do smanjenja njegove koncentracije (53). Pored toga, pokazano je da ekspresija iRNK za MIF pozitivno koreliše sa BMI i koncentracijom slobodnih masnih kiselina u plazmi kod gojaznih ljudi i u životinjskim modelima gojaznosti (54,55). Takođe, mnoge studije podržavaju ulogu MIF-a u insulinskoj rezistenciji i povezuju povećanje koncentracije MIF-a u cirkulaciji sa T2D (56).

Pored toga što dovodi do razvoja insulinske rezistencije i T2D kod gojaznosti, smatra se da metabolička inflamacija može dovesti i do razvoja NAFLD-a, u čemu MIF igra važnu ulogu (41). MIF ima štetne efekte na akumulaciju lipida u jetri nakon dijeta sa visokim sadržajem masti delujući na ekspresiju gena lipogeneze (57,58). Kod hemijski izazvane fibroze jetre, MIF ima zaštitne efekte delujući na smanjenje fibroze. Sa druge strane, rezultati kliničke studije sa pacijentima sa NAFLD-om pokazuju suprotno, ukazujući na to da je povećanje ekspresije MIF-a u jetri u direktnoj vezi sa povećanjem rizika od fibroze. Ovo neslaganje se može objasniti razlikama u etiologiji bolesti u hemijski izazvanoj povredi jetre, koja se koristi u eksperimentalnim modelima bolesti, u poređenju sa metabolički izazvanom povredom jetre karakterističnom za razvoj NAFLD-a kod ljudi (41). Prethodne studije na životinjama i ljudima sugerišu da je MIF potencijalna terapijska meta kod metaboličkih bolesti. Da bi se u potpunosti razjasnio doprinos MIF-a nastanku bolesti povezanih sa gojaznošću, potrebno je istražiti tkivno-specifične efekte MIF-a, kao i komunikacije između organa posredovane MIF-om u cirkulaciji. Pored toga, buduće studije koje bi se bavile ispitivanjem složene interakcije između metaboličke i inflamatorne ravnoteže trebalo bi da poboljšaju naše razumevanje razvoja bolesti povezanih sa gojaznošću i razjasne ulogu MIF-a u ovim procesima.

FIZIOLOŠKE POSLEDICE DELECije GENA *MIF*

Detaljno proučavanje funkcija MIF-a postalo je moguće 1999. godine zahvaljujući razvoju molekularno-bioloških metoda kada je napravljen mišji model u kojem je deletiran gen *Mif* (*Mif*^{-/-}) (47). Iako su *Mif*^{-/-} životinje bile zdrave, uočene su određene razlike u poređenju sa njihovim parnjacima C57BL/6J „divljeg tipa” (eng. *wild type*, wt), koje se tiču razvoja gojaznosti, poremećaja inflamatornog statusa i signalnog puta insulina u tkivima. Kada je u pitanju uloga MIF-a u regulaciji homeostaze lipida i ugljenih hidrata u fiziološkim uslovima, studije su pokazale da su *Mif*^{-/-} miševi od rođenja do 4. meseca starosti imali nižu telesnu masu u poređenju sa wt miševima. Međutim, u kasnijim mesecima, *Mif*^{-/-} miševi su brže dobijali na masi, što je rezultiralo većom telesnom masom u dobi od 12 meseci (59). Niža telesna masa kod mladih miševa bila je povezana sa većom potrošnjom energije, a veća telesna masa kod starijih miševa je u relaciji sa većim unosom hrane i povećanjem mase masnog tkiva. Za razliku od ovih rezultata, *Verschuren* i saradnici su objavili da je odsustvo *Mif* gena kod miševa sa deletiranim LDL receptorom (*Ldlr*^{-/-}) imalo efekte na inflamaciju i infiltraciju makrofaga, ali ne i na gojaznost i lipidni status miševa o čemu svedoče nepromenjene koncentracije slobodnih masnih kiselina, triglicerida i holesterola u krvi kod *Mif*^{-/-} miševa, u poređenju sa wt životinjama (42). Moguće objašnjenje za različite rezultate u vezi sa gojaznošću u ove dve studije moglo bi biti to što su *Verschuren* i saradnici u svojoj studiji koristili MIF i LDL životinje sa dvostrukim nokautom.

Kada je signalni put insulina u pitanju, nekoliko studija sa genetički modifikovanim modelima miša kojima nedostaje *Mif* gen imalo je za cilj da otkrije ulogu MIF-a u nepatološkoj homeostazi glukoze, kao i u stanju gojaznosti i/ili insulinske rezistencije. *Serre Beinier* i saradnici su pokazali da odsustvo MIF-a sa starenjem uzrokuje povećanje koncentracije insulina u krvi i poremećenu toleranciju na glukozu, ali ne i pojavu insulinske rezistencije (59). Ovi rezultati su u skladu sa nalazima *Nikolić* et al. da je signalizacija insulina u jetri i masnom tkivu poremećena kod *Mif*^{-/-} miševa, što se odrazilo na njihov odgovor na intraperitonealni test tolerancije na glukozu, u kojem su *Mif*^{-/-} miševi pokazali sličan insulinski odgovor kao wt životinje, ali su

imali poremećen klirens glukoze (60,61). Dodatno, brojne studije su pokazale da nedostatak MIF-a dovodi do poremećaja, kako sistemske, tako i hipokampalne insulinske osetljivosti, dok je insulinska signalizacija u prefrontalnom korteksu bila nepromenjena (62,63). Sa druge strane, postoje studije koje su pokazale da delecija gena *Mif* dovodi do poboljšanja insulinske osetljivosti i tolerancije na glukozu, kao i da *Mif*^{-/-} miševi imaju smanjenu sistemska inflamaciju i ne razvijaju insulinsku rezistenciju (42,64).

Pored brojnih literaturnih podataka o tome da MIF reguliše različite metaboličke procese, sami mehanizmi metaboličkih efekata MIF-a nisu dovoljno razjašnjeni. Glukokortikoidni receptor se izdvaja kao jedan od mogućih posrednika u ovim procesima, s obzirom da je poznato da se *MIF*^{-/-} miševi odlikuju povećanom koncentracijom glukokortikoida u cirkulaciji i povećanom aktivacijom glukokortikoidnog receptora u limfnim čvorovima, dok je njegova ekspresija smanjena u pankreasnim ostrvcima, masnom tkivu i jetri (60,65). Imajući u vidu navedene podatke, postavljen je cilj naše studije da se utvrdi da li MIF utiče na lipidni metabolizam u visceralnom masnom tkivu i jetri preko glukokortikoidnih hormona kod *MIF*^{-/-} životinja u normalnim uslovima, kao i u uslovima energetskog opterećenja izazvanog ishranom obogaćenom 20% rastvorom fruktoze.

Delecija gena Mif i ishrana obogaćena fruktozom dovode do razvoja sistemske insulinske rezistencije ne menjajući lipidni status u krvi

Rezultati naše studije su pokazali da je režim ishrane obogaćene fruktozom, u trajanju od 9 nedelja, doveo do povećanja energetskog unosa, ali nije uticao na ukupnu telesnu masu. Međutim, kombinacija nedostatka gena *Mif* i ishrane obogaćene fruktozom uzrokovala je povećanje mase visceralnog masnog tkiva i razvoj visceralne gojaznosti usled hipertrofije adipocita (66). Ovi nalazi su u skladu sa rezultatima studije *Serre-Beinier* i saradnika, koji su pokazali da kod *MIF*^{-/-} miševa starosti 4 meseca dolazi do povećanog unosa hrane, povećanja telesne mase i razvoja visceralne gojaznosti u odnosu na wt miševе (59). Kao što je već pomenuto, fruktoza je lipogeni šećer koji stimuliše *de novo* lipogenezu i povećava akumulaciju triglicerida u masnom tkivu i jetri dovodeći do pojave dislipidemije, visceralne gojaznosti i insulinske rezistencije. Iako su brojna istraživanja zabeležila povećanje koncentracije cirkulišućih triglicerida nakon ishrane obogaćene fruktozom (67,68), u našoj studiji nije došlo do promene nivoa triglicerida i slobodnih masnih kiselina u cirkulaciji *MIF*^{-/-} miševa nakon ishrane obogaćene fruktozom.

Prethodna istraživanja ukazuju na to da belo masno tkivo kod gojaznih osoba oslobađa MIF, koji je uključen u metaboličke i inflamatorne procese koji dovode do razvoja T2D (41,65). Pokazano je da MIF utiče na glukozni metabolizam na više načina: povećava oslobađanje insulina iz pankreasa (52), modifikuje glikolizu u masnom tkivu i skeletnim mišićima i utiče na insulinsku rezistenciju adipocita posredovanu signalnim putem TNF-a (48). Međutim, literaturni podaci o ulozi MIF-a u regulaciji glukozne homeostaze su različiti. U našoj studiji, kod svih *MIF*^{-/-} miševa, bez obzira na režim ishrane, primećena je sistemska insulinska rezistencija koja se odlikovala pojavom hiperglikemije, hiperinsulinemije i promenjenom tolerancijom na glukozu i insulin (66). Sa druge strane, u studiji *Verschuren* i saradnika (42) nije došlo do razvoja visceralne gojaznosti i zabeležena je smanjena koncentracija insulina i glukoze natašte, kao i poboljšana tolerancija na glukozu i insulin kod *Ldlr*^{-/-} miševa sa deletiranim genom *Mif*. Do sličnih nalaza su došli i *Finucane* i saradnici (57), koji su pokazali da nije došlo do razvoja insulinske rezistencije nakon ishrane sa visokim sadržajem masti kod gojaznih *MIF*^{-/-} miševa. Nasuprot ovim nalazima, *Serre-Beinier* i saradnici (59) prijavili su da delecija gena *Mif* dovodi do hiperinsulinemije i poremećaja tolerancije na glukozu kod odraslih miševa, u odnosu na wt miševе. Dodatno, *Nikolić* i saradnici (60) su pokazali da odsustvo MIF-a uzrokuje povećanje koncentracije glukoze u krvi i smanjenje tolerancije na glukozu. Isti autori su pokazali da se insulinska rezistencija

razvija kod MIF^{-/-} životinja, ali tek nakon uvođenja ishrane sa visokim sadržajem masti (69). Ovi kontradiktorni rezultati istraživanja ukazuju na složenu ulogu MIF-a u glukoznom metabolizmu i održavanju energetske homeostaze, kao i na zavisnost ove regulacije od starosti životinja i njihove ishrane.

Uticaj delecije gena Mif i glukokortikoidnih hormona na razvoj visceralne gojaznosti nakon ishrane obogaćene fruktozom

Kao što je ranije pomenuto, glukokortikoidni hormoni imaju dvojaku ulogu u metabolizmu lipida masnog tkiva, jer mogu stimulirati i proces lipogeneze i proces lipolize u zavisnosti od hormonalnih i/ili nutritivnih uslova (25). Iako postoje dokazi da povećane koncentracije glukokortikoida dovode do poremećene tolerancije na glukozu i imunosupresije kod miševa sa deletiranim *Mif* genom (60), njihovi efekti na lipidni metabolizam u visceralnom masnom tkivu su još uvek nepoznati. Naši rezultati su pokazali da povećanje koncentracije kortikosterona u visceralnom masnom tkivu kod MIF^{-/-} životinja hranjenih fruktozom, koje je bilo praćeno povećanjem nivoa enzima prereceptorskog metabolizma glukokortikoida (nivoi proteina 11 β HSD-1 i H6PDH su bili povišeni), kao i povećanjem nivoa proteina GR (66). Za razliku od ovih rezultata, Nikolić i saradnici su prijavili nižu koncentraciju proteina GR u masnom tkivu i povećanu koncentraciju kortikosterona u plazmi (60), dok je u drugom istraživanju pokazano da je nivo kortikosterona u plazmi bio nepromenjen kod MIF^{-/-} miševa (70).

Sa ciljem da se utvrdi da li MIF ostvaruje svoj uticaj na lipidni metabolizam pod energetske opterećenjem, pristupilo se histološkoj analizi tkiva. Ustanovljeno je da kombinacija ishrane obogaćene fruktozom i nedostatka gena *Mif* povećava prečnik i površinu adipocita, što dovodi do promene morfologije adipocita i hipertrofije masnog tkiva samo kod MIF^{-/-} miševa hranjenih fruktozom (66). Kao što je već rečeno, povećanje mase masnog tkiva je složen proces koji pored hipertrofije podrazumeva i hiperplaziju tokom koje dolazi do proliferacije preadipocita, njihove diferencijaciju u zrele adipocite i indukcije ključnih gena uključenih u metabolizam lipida (71). Primenom RT-qPCR metode, u ovoj studiji, zabeleženo je povećanje nivoa iRNK za *Fas* i *Acc* u visceralnom masnom tkivu MIF^{-/-} životinja na ishrani obogaćenoj fruktozom. Enzimi FAS i ACC su direktno transkripciono regulisani od strane SREBP1c, čiju aktivnost regulišu glukokortikoidi i insulin (72). U skladu sa tim, metodom Western blot-a je pokazano da je nivo proteina SREBP1c značajno povećan u visceralnom masnom tkivu MIF^{-/-} miševa na ishrani obogaćenoj fruktozom (66). Pored SREBP1c proteina, i drugi transkripcioni regulator adipogeneze, PPAR γ , bio je značajno povećan u visceralnom masnom tkivu samo kod MIF^{-/-} miševa hranjenih fruktozom (66). Pored aktivnosti u lipogenezi, značajan lipolitički efekat glukokortikoida je takođe zabeležen u različitim *in vitro* i *in vivo* studijama. Međutim, u našoj studiji nije primećena aktivacija lipolitičkih procesa kod MIF^{-/-} miševa na ishrani obogaćenoj fruktozom, o čemu nam govori nepromenjena ekspresija lipolitičkog gena *Hsl*, koji je pozitivno regulisan delovanjem glukokortikoida (66).

Uticaj delecije gena Mif i glukokortikoidnih hormona na aktivaciju lipogeneze i inhibiciju β -oksidacije u jetri nakon ishrane obogaćene fruktozom

Ranija istraživanja su pokazala da ishrana sa visokim sadržajem fruktoze utiče na lipidni metabolizam u jetri kroz razvoj hronične inflamacije niskog intenziteta (73), dok inflamatorni medijator MIF doprinosi nastanku i razvoju steatoze jetre i NASH-a (41). Iz tog razloga je jedan od ciljeva našeg istraživanja bio da se ispita osnovna uloga plejotropnog citokina MIF-a u poremećajima lipidnog metabolizma u jetri i ektopičnoj akumulaciji lipida izazvanoj ishranom obogaćenom fruktozom. Studija koju su uradili *Donnelli* i saradnici pokazala je da najveća količina triglicerida u jetri kod pacijenata sa NAFLD-om potiče od priliva masnih

kiselina iz masnog tkiva, a u manjoj meri iz hranljivih materija i *de novo* lipogeneze (19). Povećano unošenje cirkulišućih lipida u jetru, posebno lipoproteina i slobodnih masnih kiselina, povezano je sa povećanjem koncentracije membranskih proteina koji su uključeni u transport lipida (74). Ova hipoteza je takođe potvrđena u našoj studiji, u kojoj je koncentracija proteina CD36 (translokaza masnih kiselina) bila povećana kod MIF^{-/-} miševa hranjenih fruktozom, dok su koncentracije triglicerida i slobodnih masnih kiselina ostale nepromenjene u krvi svih životinja (75). Kako je CD36 zadužen za transport masnih kiselina iz krvotoka u jetru, može se zaključiti da je neizmenjena koncentracija slobodnih masnih kiselina u plazmi posledica njihovog pojačanog priliva u jetru posredstvom proteina CD36.

Transkripcioni faktori, SREBP1c, ChREBP i LXRA/β, predstavljaju važne regulatore *de novo* lipogeneze u jetri. Insulin ostvaruje svoje efekte na ekspresiju lipogenih gena *Acc* i *Fas* menjajući aktivnost SREBP1c regulatora, dok glukoza deluje na ove enzime aktivirajući ChREBP (32). Ova dva transkripciona regulatora sinergistički deluju na ekspresiju enzima uključenih u *de novo* lipogenezu kao odgovor na hiperglikemiju i hiperinsulinemiju (76). Rezultati naše studije su potvrdili da je ishrana obogaćena fruktozom dovela do aktivacije lipogeneze u jetri, usled povećanja nivoa proteina SREBP1c, ChREBP i LXRA/β, kao i povećanja ekspresije enzima FAS kod miševa na fruktoznoj ishrani u poređenju sa wt životinjama (75). Dodatno, metodom Western blot-a je pokazan povećan sadržaj proteina ACC kod MIF^{-/-} životinja na fruktoznoj ishrani. Ovi rezultati su u skladu sa studijom drugih autora koja je pokazala da je ekspresija *Acc* i *Fas* gena u jetri povećana kod MIF^{-/-} miševa na ishrani bogatoj mastima (58). Aktivacija *de novo* lipogeneze nakon ishrane obogaćene fruktozom takođe može biti i rezultat smanjene β-oksidacije masnih kiselina regulisane transkripcionim regulatorom PPARα. Ovaj protein predstavlja senzor za lipide u jetri i reaguje na povećani priliv masnih kiselina aktivirajući transkripciju gena koji kodiraju sisteme mitohondrijalne oksidacije (77). Acil-CoA, masne kiseline i nekoliko strukturno različitih sintetičkih jedinjenja (proliferatori peroksizoma), regulišu i nivo proteina CPT1, glavnog enzima β-oksidacije (77). Rezultati naših istraživanja su pokazali da je nivo proteina PPARα smanjen kod svih životinja u poređenju sa wt miševima, dok je nivo proteina CPT1 smanjen kod MIF^{-/-} miševa hranjenih fruktozom, što je uzrokovalo prelazak sa oksidativnog puta na put sinteze triglicerida (75).

Prekomerna konzumacija fruktoze u ishrani može dovesti do pojave lipotoksičnosti i prelaska jetre iz stanja steatoze u NASH, usled povećane podložnosti jetre povredama posredovanim oksidativnim stresom, disfunkcijom mitohondrija i pro-inflamatornim citokinima, poput TNF, IL-1β i IL-6 (78). Uočeni efekti ishrane sa visokim sadržajem fruktoze na metabolizam lipida u jetri bili su dodatno pogoršani nedostatkom gena *Mif*. Histološka analiza jetre MIF^{-/-} miševa hranjenih fruktozom otkrila je mikrovezikularne promene i prisustvo inflamatornih reakcija (povećanje Kupferovih ćelija, regenerativne promene, fokalnu nekrozu), koje su bile praćene povećanom ekspresijom gena *Il-1β* i *Il-6*, što ukazuje na zaštitnu ulogu MIF-a u nastanku steatoze jetre i steatohepatitisa (75). Važno je napomenuti da prilikom pro-inflamatorne stimulacije ili stanja stresa, glukokortikoidni hormoni dovode do povećanja sinteze MIF-a u makrofagima, čije pro-inflamatorno dejstvo prevazilazi anti-inflamatorno delovanje glukokortikoida (49). U skladu sa tim, u našoj studiji, kod MIF^{-/-} miševa na fruktoznoj ishrani primećen je pojačan prereceptorski metabolizam glukokortikoida (povećan nivo proteina 11βHSD-1), povećan nivo GR-a u jedru i smanjen nivo ovog transkripcionog regulatora u citoplazmi, što ukazuje na aktiviranje signalnog puta glukokortikoida (79). Pored toga, kod životinjskih modela sa povećanom koncentracijom glukokortikoida prethodno su pokazani brojni poremećaji jetre, od steatoze do NASH-a, dok su ispitivanja kod ljudi zabeležila povećanje koncentracije insulina i glukoze koji stimulišu aktivnost SREBP1c i ChREBP dovodeći do povećanja ekspresije *Fas* i *Acc* (17). Poznato je i da glukokortikoidi inhibiraju β-oksidaciju smanjujući aktivnost PPARα, što uzrokuje lipotoksičnost i taloženje lipida u jetri (80), ali i da imaju sposobnost da stimulišu lipolizu u masnom tkivu i povećavaju nivo

proteina CD36, što sve zajedno dovodi do povećanog unosa slobodnih masnih kiselina u jetru (81). Naši rezultati su potvrdili da aktivacija GR-a u jetri može dovesti do povećane akumulacije lipida posredovane fruktoznom ishranom kod MIF^{-/-} miševa, na taj način što podstiče aktivaciju SREBP1c i ChREBP, ali i olakšano preuzimanje slobodnih masnih kiselina iz krvotoka od strane transportera CD36.

*Komunikacija između visceralnog masnog tkiva i jetre
u regulisanju lipidnog metabolizma kod MIF^{-/-} životinja nakon ishrane obogaćene fruktozom*

Masno tkivo i jetra su glavni metabolički organi zaduženi za skladištenje i korišćenje energije. Iako belo masno tkivo predstavlja glavni rezervoar za skladištenje triglicerida, jetra takođe ima sposobnost akumulacije lipida kada je prisutan višak energije ili u uslovima poremećaja metabolizma masnih kiselina. Pored svoje uloge u akumulaciji triglicerida, masno tkivo je takođe i endokrini organ uključen u regulaciju sistemske metaboličke homeostaze. Faktori kao što su leptin, adiponektin i masne kiseline iz jetre i masnog tkiva imaju pleiotropno dejstvo na regulaciju metabolizma lipida i glukoze i tako deluju kao važni posrednici u komunikaciji između ova dva metabolički aktivna organa (82).

Rezultati naših istraživanja ukazuju na pojavu visceralne gojaznosti kod MIF^{-/-} životinja uzrokovane povećanjem ekspresije gena lipogeneze i aktivnosti transkripcionih regulatora adipogeneze u uslovima energetske opterećenja fruktozom. Pored toga, sistemska insulinska rezistencija je primećena kod svih MIF^{-/-} miševa bez obzira na ishranu (66). U stanju sistemske insulinske rezistencije, u jetri su povećana sva tri glavna izvora sinteze triglicerida: slobodne masne kiseline iz masnog tkiva, masne kiseline koje su poreklom iz cirkulišućih hilomikrona i masne kiseline koje su sintetisane *de novo* lipogenezom (31). Iako nivoi cirkulišućih slobodnih masnih kiselina i triglicerida (važnih medijatora u komunikaciji između masnog tkiva i jetre) nisu bili promenjeni, zabeleženo povećanje nivoa proteina CD36 može ukazati na povećan unos cirkulišućih lipida u jetri. Još jedan važan posrednik u komunikaciji između visceralnog masnog tkiva i jetre je leptin (83), a stanje hiperleptinemije predstavlja jednu od karakteristika NAFLD-a i NASH-a, jer je pokazano da povećane koncentracije leptina u krvi pozitivno korelišu sa stepenom steatoze jetre, koncentracijom cirkulišuće glukoze i insulina i prisustvom inflamacije (84). Nalazi ovih istraživanja su u skladu sa rezultatima naše studije, koji su pokazali povećanu koncentraciju leptina u cirkulaciji kod MIF^{-/-} miševa, kod kojih je zabeleženo povećanje lipogeneze i smanjenje β -oksidacija masnih kiselina u jetri, kao i povećanje koncentracije glukoze i insulina. Ovi rezultati ukazuju na to da ishrana obogaćena fruktozom kod MIF^{-/-} životinja aktivira adipogenezu i lipogenezu visceralnog masnog tkiva i akumulaciju lipida u jetri, što ukazuje na postojanje veze između poremećaja lipidnog metabolizma u masnom tkivu, nastanka steatoze jetre i posledičnog razvoja sistemske insulinske rezistencije (Slika 1).

ZAKLJUČAK

Rezultati ove studije su pokazali da ishrana obogaćena fruktozom dovodi do poremećaja sistemske insulinske osetljivosti i metabolizma lipida, što predstavlja osnov za razvoj gojaznosti i T2D, dok citokin MIF ima zaštitnu ulogu u razvoju visceralne gojaznosti, steatoze jetre i steatohepatitisa. S obzirom da kod MIF^{-/-} životinja hranjenih fruktozom dolazi do aktivacije GR-a i poremećaja u metabolizmu glukoze i lipida, može se zaključiti da su štetni efekti delecije gena *Mif* najverovatnije posredovani upravo ovim mehanizmom, što je u skladu sa polaznom hipotezom da MIF ostvaruje uticaj na lipidni metabolizam u visceralnom masnom tkivu i jetri posredstvom glukokortikoidnih hormona.

ZAHVALNICA

Izrada ovog rada je omogućena zahvaljujući projektu Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije - broj ugovora 451-03-47/2023-01/200007.

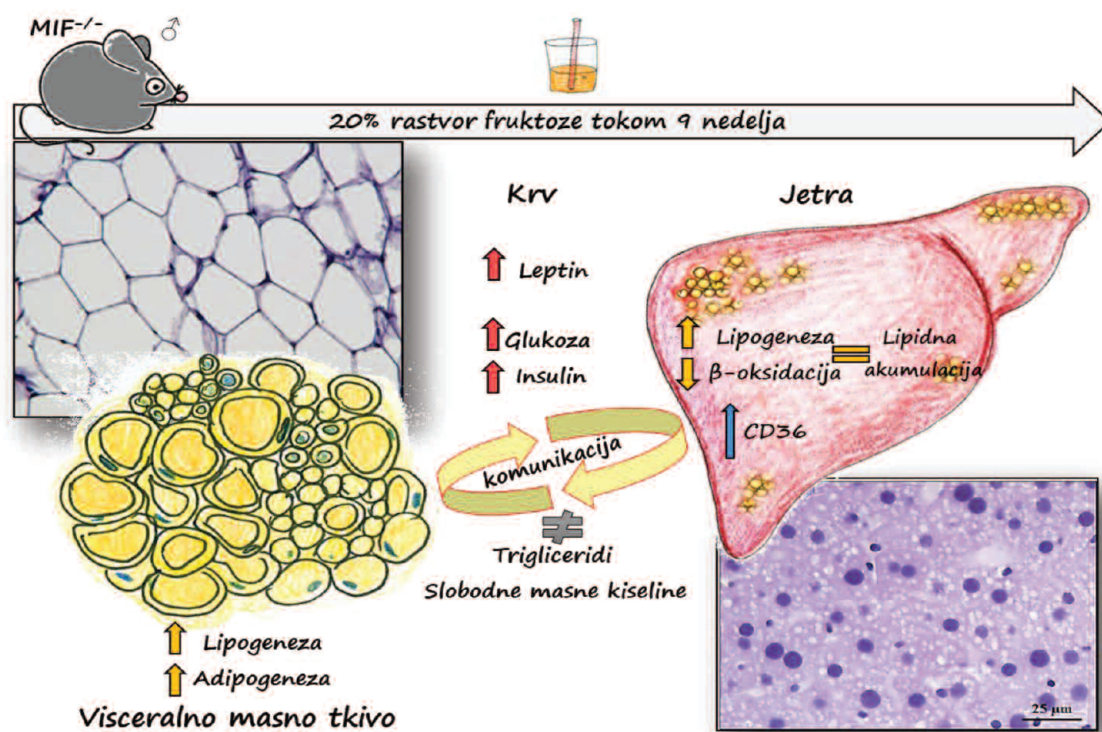
Literatura

1. Sangüesa G, Roglans N, Laguna JC, Alegret M. Liquid fructose and liver insulin signaling: Molecular mechanisms controlling hepatic steatosis. In: *Molecular Nutrition: Carbohydrates*. Elsevier; 2019. p. 149–72.
2. Keim NL, Havel PJ. Fructose: Absorption and Metabolism. *Encycl Hum Nutr*. 2013 Jan 1;361–5.
3. Dekker MJ, Su Q, Baker C, Rutledge AC, Adeli K. Fructose: A highly lipogenic nutrient implicated in insulin resistance, hepatic steatosis, and the metabolic syndrome. Vol. 299, *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*. 2010.
4. DiMeglio DP, Mattes RD. Liquid versus solid carbohydrate: effects on food intake and body weight. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2000;794–800.
5. Schaefer EJ, Gleason JA, Dansinger ML. Dietary Fructose and Glucose Differentially Affect Lipid and Glucose Homeostasis. *J Nutr*. 2009 Jun 1;12575-12625.
6. Stanhope KL, Schwarz JM, Keim NL, Griffen SC, Bremer AA, Graham JL, et al. Consuming fructose-sweetened, not glucose-sweetened, beverages increases visceral adiposity and lipids and decreases insulin sensitivity in overweight/obese humans. *J Clin Invest*. 2009 May 1;1322–34.
7. Engin A. The Definition and Prevalence of Obesity and Metabolic Syndrome. *Adv Exp Med Biol*. 2017;1–17.
8. Safaei M, Sundararajan EA, Driss M, Boulila W, Shapi'i A. A systematic literature review on obesity: Understanding the causes & consequences of obesity and reviewing various machine learning approaches used to predict obesity. *Comput Biol Med*. 2021 Sep 1;104754.
9. Obesity and overweight [Internet]. 2021.
10. Choe SS, Huh JY, Hwang IJ, Kim JI, Kim JB. Adipose tissue remodeling: Its role in energy metabolism and metabolic disorders. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2016 Apr 13;30.
11. Shuster A, Patlas M, Pinthus JH, Mourtzakis M. The clinical importance of visceral adiposity: a critical review of methods for visceral adipose tissue analysis. *Br J Radiol*. 2012 Jan;1.
12. Esteve Ràfols M. Adipose tissue: Cell heterogeneity and functional diversity. *Endocrinol y Nutr (English Ed)*. 2014 Feb 1;100–12.
13. Richard AJ, White U, Elks CM, Stephens JM. Adipose Tissue: Physiology to Metabolic Dysfunction. *Endotext*. 2020 Apr 4;
14. Tchernof A, Després JP. Pathophysiology of human visceral obesity: An update. *Physiol Rev*. 2013 Jan 1;359–404.
15. Boyko EJ, Fujimoto WY, Leonetti DL, Newell-Morris L. Visceral adiposity and risk of type 2 diabetes: a prospective study among Japanese Americans. *Diabetes Care*. 2000;465–71.
16. Han HS, Kang G, Kim JS, Choi BH, Koo SH. Regulation of glucose metabolism from a liver-centric perspective. *Exp Mol Med* 2016 483. 2016 Mar 11;e218–e218.
17. Rahimi L, Rajpal A, Ismail-Beigi F. Glucocorticoid-induced fatty liver disease [Internet]. Vol. 13, *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy*. Dove Medical Press Ltd.; 2020. p. 1133–45.
18. Longo M, Zatterale F, Naderi J, Parrillo L, Formisano P, Raciti GA, et al. Adipose Tissue Dysfunction as Determinant of Obesity-Associated Metabolic Complications. *Int J Mol Sci*. 2019 May 1;
19. Donnelly KL, Smith CI, Schwarzenberg SJ, Jessurun J, Boldt MD, Parks EJ. Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Invest*. 2005;1343–51.
20. Parthasarathy G, Revelo X, Malhi H. Pathogenesis of Nonalcoholic Steatohepatitis: An Overview. *Hepatol Commun*. 2020 Apr 1;478–92.
21. Cusi K. Role of obesity and lipotoxicity in the development of nonalcoholic steatohepatitis: Pathophysiology and clinical implications. Vol. 142, *Gastroenterology*. W.B. Saunders; 2012. p. 711-725.e6.
22. Lê KA, Ith M, Kreis R, Faeh D, Bortolotti M, Tran C, et al. Fructose overconsumption causes dyslipidemia and ectopic lipid deposition in healthy subjects with and without a family history of type 2 diabetes. *Am J Clin Nutr*. 2009 Jan 6;1760–5.
23. Keim NL, Stanhope KL, Havel PJ. Fructose and High-Fructose Corn Syrup. *Encycl Food Heal*. 2016 Jan 1;119–24.

24. Luo L, Liu M. Adipose tissue in control of metabolism. *J Endocrinol*. 2016 Dec 1;R77–99.
25. Peckett AJ, Wright DC, Riddell MC. The effects of glucocorticoids on adipose tissue lipid metabolism. *Metabolism*. 2011 Nov;1500–10.
26. Wallace M, Metallo CM. Tracing insights into de novo lipogenesis in liver and adipose tissues. *Semin Cell Dev Biol*. 2020 Dec 1;65–71.
27. Song Z, Xiaoli AM, Yang F. Regulation and Metabolic Significance of De Novo Lipogenesis in Adipose Tissues. *Nutrients*. 2018 Oct 1;
28. Kim JB, Spiegelman BM. ADD1/SREBP1 promotes adipocyte differentiation and gene expression linked to fatty acid metabolism. *Genes Dev*. 1996 May 1;1096–107.
29. Geisler CE, Renquist BJ. Hepatic lipid accumulation: cause and consequence of dysregulated glucoregulatory hormones. *J Endocrinol*. 2017 Jul 1;R1–21.
30. Wang Y, Viscarra J, Kim SJ, Sul HS. Transcriptional regulation of hepatic lipogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2015 1611. 2015 Oct 22;678–89.
31. Choi SH, Ginsberg HN. Increased Very Low Density Lipoprotein Secretion, Hepatic Steatosis, and Insulin Resistance. *Trends Endocrinol Metab*. 2011 Sep;353.
32. Postic C, Girard J. Contribution of de novo fatty acid synthesis to hepatic steatosis and insulin resistance: Lessons from genetically engineered mice. Vol. 118, *Journal of Clinical Investigation*. American Society for Clinical Investigation; 2008. p. 829–38.
33. Mandard S, Müller M, Kersten S. Peroxisome proliferator-activated receptor α target genes. *Cell Mol Life Sci C* 2004 614. 2004 Feb;393–416.
34. Chrousos GP, Charmandari E, Kino T. Glucocorticoid action networks—an introduction to systems biology. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004 Feb;563–4.
35. Sapolsky RM, Romero LM, Munck AU. How Do Glucocorticoids Influence Stress Responses? Integrating Permissive, Suppressive, Stimulatory, and Preparative Actions. *Endocr Rev*. 2000 Feb 1;55–89.
36. Lettéron P, Brahimi-Bourouina N, Robin MA, Moreau A, Feldmann G, Pessayre D. Glucocorticoids inhibit mitochondrial matrix acyl-CoA dehydrogenases and fatty acid β -oxidation. *Am J Physiol*. 1997;
37. Russo S, Kwiatkowski M, Govorukhina N, Bischoff R, Melgert BN. Meta-Inflammation and Metabolic Reprogramming of Macrophages in Diabetes and Obesity: The Importance of Metabolites. *Front Immunol*. 2021 Nov 5;4656.
38. Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest*. 2003 Dec 15;1796–808.
39. Castoldi A, De Souza CN, Saraiva Câmara NO, Moraes-Vieira PM. The Macrophage Switch in Obesity Development. *Front Immunol*. 2015;1.
40. Lumeng CN, Bodzin JL, Saltiel AR. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J Clin Invest*. 2007 Jan 4;175.
41. Morrison MC, Kleemann R. Role of Macrophage Migration Inhibitory Factor in Obesity, Insulin Resistance, Type 2 Diabetes, and Associated Hepatic Co-Morbidities: A Comprehensive Review of Human and Rodent Studies. *Front Immunol*. 2015;
42. Verschuren L, Kooistra T, Bernhagen J, Voshol PJ, Ouwens DM, van Erk M, et al. MIF deficiency reduces chronic inflammation in white adipose tissue and impairs the development of insulin resistance, glucose intolerance, and associated atherosclerotic disease. *Circ Res*. 2009 Jul 2;99–107.
43. Bloom BR, Bennett B. Mechanism of a reaction in vitro associated with delayed-type hypersensitivity. *Science*. 1966;80–2.
44. Weiser WY, Temple PA, Witek-Giannotti JS, Remold HG, Clark SC, David JR. Molecular cloning of a cDNA encoding a human macrophage migration inhibitory factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989;7522–6.
45. Suzuki M, Sugimoto H, Nakagawa A, Tanaka I, Nishihira J, Sakai M. Crystal structure of the macrophage migration inhibitory factor from rat liver. *Nat Struct Biol* 1996 33. 1996;259–66.
46. Sugimoto H, Suzuki M, Nakagawa A, Tanaka I, Nishihira J. Crystal structure of macrophage migration inhibitory factor from human lymphocyte at 2.1 Å resolution. *FEBS Lett*. 1996 Jul 1;145–8.
47. Bozza M, Satoskar AR, Lin G, Lu B, Humbles AA, Gerard C, et al. Targeted disruption of migration inhibitory factor gene reveals its critical role in sepsis. *J Exp Med*. 1999 Jan 18;341–6.
48. Toso C, Emamaullee JA, Merani S, Shapiro AMJ. The role of macrophage migration inhibitory factor on glucose metabolism and diabetes. *Diabetologia*. 2008 Nov;1937–46.

49. Calandra T, Bernhagen J, Metz CN, Spiegel LA, Bacher M, Donnelly T, et al. MIF as a glucocorticoid-induced modulator of cytokine production. *Nature*. 1995 Sep 7;68–71.
50. Bacher M, Metz CN, Calandra T, Mayer K, Chesney J, Lohoff M, et al. An essential regulatory role for macrophage migration inhibitory factor in T-cell activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Jul 23;7849.
51. Sakaue S, Nishihira J, Hirokawa J, Yoshimura H, Honda T, Aoki K, et al. Regulation of macrophage migration inhibitory factor (MIF) expression by glucose and insulin in adipocytes in vitro. 1999 Jun;
52. Waeber G, Calandra T, Roduit R, Haefliger JA, Bonny C, Thompson N, et al. Insulin secretion is regulated by the glucose-dependent production of islet beta cell macrophage migration inhibitory factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Apr 29;782–7.
53. Dandona P, Aljada A, Ghanim H, Mohanty P, Tripathy C, Hofmeyer D, et al. Increased plasma concentration of macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF) and MIF mRNA in mononuclear cells in the obese and the suppressive action of metformin. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004 Oct;5043–7.
54. Finucane OM, Reynolds CM, McGillicuddy FC, Roche HM. Insights into the role of macrophage migration inhibitory factor in obesity and insulin resistance. *Proc Nutr Soc*. 2012;622–33.
55. Veličković N, Djordjevic A, Vasiljević A, Bursać B, Milutinović DV, Matić G. Tissue-specific regulation of inflammation by macrophage migration inhibitory factor and glucocorticoids in fructose-fed Wistar rats. *Br J Nutr*. 2013 Aug 3;456–65.
56. Sánchez-Zamora YI, Rodriguez-Sosa M. The role of MIF in type 1 and type 2 diabetes mellitus. *J Diabetes Res*. 2014;
57. Finucane OM, Reynolds CM, McGillicuddy FC, Harford KA, Morrison M, Baugh J, et al. Macrophage migration inhibitory factor deficiency ameliorates high-fat diet induced insulin resistance in mice with reduced adipose inflammation and hepatic steatosis. *Nerurkar P V., editor. PLoS One*. 2014 Nov 20;1–14.
58. Heinrichs D, Berres ML, Coeuru M, Knaul M, Nellen A, Fischer P, et al. Protective role of macrophage migration inhibitory factor in nonalcoholic steatohepatitis. *FASEB J*. 2014 Dec 13;5136–47.
59. Serre-Beinier V, Toso C, Morel P, Gonelle-Gispert C, Veyrat-Durebex C, Rohner-Jeanrenaud F, et al. Macrophage migration inhibitory factor deficiency leads to age-dependent impairment of glucose homeostasis in mice. *J Endocrinol*. 2010 Sep 1;297–306.
60. Nikolic I, Vujicic M, Saksida T, Berki T, Stosic-Grujicic S, Stojanovic I. The role of endogenous glucocorticoids in glucose metabolism and immune status of MIF-deficient mice. *Arch Biol Sci*. 2013 Aug 15;499–505.
61. Vujicic M, Senerovic L, Nikolic I, Saksida T, Stosic-Grujicic S, Stojanovic I. The critical role of macrophage migration inhibitory factor in insulin activity. *Cytokine*. 2014;39–46.
62. Djordjevic A, Bursać B, Veličković N, Gligorovska L, Ignjatović D, Tomić M, et al. Disturbances of systemic and hippocampal insulin sensitivity in macrophage migration inhibitory factor (MIF) knockout male mice lead to behavioral changes associated with decreased PSA-NCAM levels. *Horm Behav*. 2017;
63. Vratarić M, Šenk V, Bursać B, Gligorovska L, Ignjatović D, Kovačević S, et al. Fructose diet ameliorates effects of macrophage migration inhibitory factor deficiency on prefrontal cortex inflammation, neural plasticity, and behavior in male mice. *BioFactors*. 2023 Jan 1;90–107.
64. Kleemann R, Bucala R. Macrophage migration inhibitory factor: critical role in obesity, insulin resistance, and associated comorbidities. *Mediators Inflamm*. 2010 Feb 9;610479.
65. Kim BS, Pallua N, Bernhagen J, Bucala R. The macrophage migration inhibitory factor protein superfamily in obesity and wound repair. *Exp Mol Med*. 2015;e161.
66. Gligorovska L, Bursać B, Kovačević S, Veličković N, Matić G, Djordjevic A. Mif deficiency promotes adiposity in fructose-fed mice. *J Endocrinol*. 2019 Feb 1;133–45.
67. Bursać BN, Djordjevic AD, Vasiljević AD, Milutinović DDV, Veličković NA, Nestorović NM, et al. Fructose consumption enhances glucocorticoid action in rat visceral adipose tissue. *J Nutr Biochem*. 2013;1166–72.
68. Lê KA, Faeh D, Stettler R, Ith M, Kreis R, Vermathen P, et al. A 4-wk high-fructose diet alters lipid metabolism without affecting insulin sensitivity or ectopic lipids in healthy humans. *Am J Clin Nutr*. 2006 Dec;1374–9.
69. Saksida T, Stosic-Grujicic S, Timotijevic G, Sandler S, Stojanovic I. Macrophage migration inhibitory factor deficiency protects pancreatic islets from palmitic acid-induced apoptosis. *Immunol Cell Biol*. 2012 Aug;688–98.
70. Conboy L, Varea E, Castro JE, Sakouhi-Ouertatani H, Calandra T, Lashuel HA, et al. Macrophage migration inhibitory factor is critically involved in basal and fluoxetine-stimulated adult hippocampal cell proliferation and in anxiety, depression and memory-related behaviors. *Mol Psychiatry*. 2011 May 23;533–47.
71. Hausman DB, DiGirolamo M, Bartness TJ, Hausman GJ, Martin RJ. The biology of white adipocyte proliferation. *Obes Rev*. 2001 Nov 1;239–54.

72. Kim JB, Sarraf P, Wright M, Yao KM, Mueller E, Solanes G, et al. Nutritional and insulin regulation of fatty acid synthetase and leptin gene expression through ADD1/SREBP1. *J Clin Invest.* 1998 Jan 1;1–9.
73. Liu L, Mei M, Yang S, Li Q. Roles of chronic low-grade inflammation in the development of ectopic fat deposition. Vol. 2014, *Mediators of Inflammation*. Hindawi Publishing Corporation; 2014.
74. Geng Y, Faber KN, de Meijer VE, Blokzijl H, Moshage H. How does hepatic lipid accumulation lead to lipotoxicity in non-alcoholic fatty liver disease? *Hepatol Int* 2021 151. 2021 Feb 6;21–35.
75. Gligorovska L, Teofilović A, Vojnović Milutinović D, Miladinović N, Kovačević S, Veličković N, et al. Macrophage migration inhibitory factor deficiency aggravates effects of fructose-enriched diet on lipid metabolism in the mouse liver. *BioFactors.* 2021;
76. Dentin R, Girard J, Postic C. Carbohydrate responsive element binding protein (ChREBP) and sterol regulatory element binding protein-1c (SREBP-1c): Two key regulators of glucose metabolism and lipid synthesis in liver. In: *Biochimie*. Elsevier; 2005. p. 81–6.
77. Reddy JK, Hashimoto T. Peroxisomal beta-oxidation and peroxisome proliferator-activated receptor alpha: an adaptive metabolic system. *Annu Rev Nutr.* 2001;193–230.
78. Dowman JK, Tomlinson JW, Newsome PN. Pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease. *QJM An Int J Med.* 2010 Nov 13;71.
79. Gligorovska L, Teofilović A, Vojnović Milutinović D, Miladinović N, Kovačević S, Veličković N, et al. Macrophage migration inhibitory factor deficiency aggravates effects of fructose-enriched diet on lipid metabolism in the mouse liver. *BioFactors.* 2021 May 1;363–75.
80. Marino JS, Stechschulte LA, Stec DE, Nestor-Kalinoski A, Coleman S, Hinds TD. Glucocorticoid receptor β induces hepatic steatosis by augmenting inflammation and inhibition of the Peroxisome Proliferator-activated Receptor (PPAR) α . *J Biol Chem.* 2016 Dec 9;25776–88.
81. D'souza AM, Beaudry JL, Szigiato AA, Trumble SJ, Snook LA, Bonen A, et al. Consumption of a high-fat diet rapidly exacerbates the development of fatty liver disease that occurs with chronically elevated glucocorticoids. *Am J Physiol Liver Physiol.* 2012 Apr 15;G850–63.
82. Ye D wei, Rong X lu, Xu A min, Guo J. Liver-adipose tissue crosstalk: A key player in the pathogenesis of glucolipid metabolic disease. *Chinese J Integr Med* 2017 236. 2017 Aug 10;410–4.
83. Lee Y, Wang MY, Kakuma T, Wang ZW, Babcock E, McCorkle K, et al. Liporegulation in diet-induced obesity. The antisteatotic role of hyperleptinemia. *J Biol Chem.* 2001 Feb 23;5629–35.
84. Polyzos SA, Kountouras J, Zavos C, Deretzi G. The potential adverse role of leptin resistance in nonalcoholic fatty liver disease: A hypothesis based on critical review of the literature. *J Clin Gastroenterol.* 2011;50–4.



Slika 1. Komunikacija između visceralnog masnog tkiva i jetre u regulaciji lipidnog metabolizma kod *MIF*^{-/-} miševa na ishrani obogaćenoj fruktozom (autor ilustracije Ana Đorđević).

Varijante i transkripcija gena koji kodiraju komponente leptinskog signalnog puta, inflamacije i antioksidativne zaštite u patogenezi multiple skleroze

Ivana Kolić, Ljiljana Stojković

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

Univerzitet u Beogradu

Kontakt: ivanak@vin.bg.ac.rs

Apstrakt

Multipla skleroza (MS) je hronična autoimunska bolest centralnog nervnog sistema (CNS) čiji osnovni patogenetski mehanizmi obuhvataju neuroinflamaciju, demijelinizaciju i neurodegeneraciju. Glavno patofiziološko obeležje MS je hiperaktivacija određenih komponenti imunskog sistema, koja dovodi do nastajanja i akumulacije strukturno-funkcionalnih oštećenja CNS kao posledice hronične inflamacije i oksidativnog stresa. Adipocitokin i hormon leptin potencijalni je molekularni marker MS, budući da učestvuje u patogenezi ove bolesti delovanjem na regulaciju imunskog i odgovora na oksidativni stres. Varijante i promene u transkripciji gena koji kodiraju komponente leptinskog signalnog puta, i sa njima povezane komponente inflamacije i antioksidativne zaštite, asocirane su sa nastankom i/ili kliničkim tokom MS kao i odgovorom na terapiju. Danas u Srbiji ima preko 9000 obolelih od MS, a samo 1 od 10 pacijenata dobija trenutno dostupnu konvencionalnu imunomodulatornu terapiju. Mogućnost modulisanja nivoa cirkulišućeg leptina sugerise njegov potencijalni značaj u budućem razvoju personalizovanog pristupa u lečenju MS baziranog na poboljšavanju efekata ili supstituciji postojeće konvencionalne terapije.

Ključne reči: gen, varijanta, transkripcija, leptinski signalni put, multipla skleroza

Variants and transcription of genes of the leptin signaling pathway, inflammation and antioxidant protection in pathogenesis of multiple sclerosis

Ivana Kolić, Ljiljana Stojković

"Vinca" Institute of Nuclear Sciences, National Institute of the Republic of Serbia,

University of Belgrade, Belgrade

Correspondence:ivanak@vin.bg.ac.rs

Abstract

Multiple sclerosis (MS) is a chronic autoimmune disease of the central nervous system (CNS) with underlying pathogenetic mechanisms that include neuroinflammation, demyelination and neurodegeneration. The main pathophysiological feature of MS is the hyperactivation of certain immune system components, which leads to formation and accumulation of structural and functional damage in the CNS as a result of chronic inflammation and oxidative stress. The adipocytokine and hormone leptin is a potential molecular marker of MS, since it participates in the pathogenesis of this disease by acting on the regulation of immune system and response to oxidative stress. Variants and transcriptional changes of genes coding for components of the leptin signaling pathway, and associated components of inflammation and antioxidant protection, are associated with the onset and/or clinical course of MS as well as response to therapy. Today, there are over 9,000 MS patients in Serbia, and only 1 out of 10 patients receives currently available conventional immunomodulatory therapy. The possibility of modulating the level of circulating leptin suggests its potential importance in the future development of a personalized approach in treatment of MS based on improving the effects or substituting the existing conventional therapy.

Key words: gene, variant, transcription, leptin signaling pathway, multiple sclerosis

Uvod

Multipla skleroza (MS) je kompleksna, autoimunska i neurodegenerativna bolest centralnog nervnog sistema (CNS), koja zahteva praćenje i terapiju tokom čitavog života [1,2]. Poremećaj CNS u MS karakteriše se hroničnom inflamacijom i destrukcijom mijelinskog omotača praćeno pojačanim oksidativnim stresom i oštećenjem aksona i oligodendrocita, što rezultuje progresivnim neurološkim deficitom [3,4]. Osnovni klinički parametri kojima se definišu stepen invaliditeta i progresije MS su EDSS (eng. *Expanded Disability Status Scale*) [5] i MSSS (eng. *Multiple Sclerosis Severity Score*) [6].

Simptomi i znaci MS zavise od lokalizacije i veličine MRI lezija, koje predstavljaju glavno patofiziološko i dijagnostičko obeležje bolesti [7]. Postoje dva osnovna vida kliničkog toka MS koji su asocirani sa različitim formama ove bolesti. Prvi definiše pogoršanje povezano sa relapsom karakteristično za recidivirajući tj. relapsno-remitentni (RR) tok bolesti, a drugi je nezavistan od egzacerbacije simptoma MS i kod njega dolazi do kontinuirane akumulacije neurološkog deficita i progresije bolesti, što je tipično za primarno i sekundarno progresivnu MS [8]. MS obično počinje kao RR forma bolesti, kod oko 85% pacijenata, koju karakteriše stalna smena relapsa - faze pogoršanja bolesti sa preovlađujućom neuroinflamacijom, i remisije - faze kliničkog oporavka [1]. U proseku, oko 10 godina nakon početka bolesti polovina pacijenata sa RR tokom MS ulazi u sekundarno progresivnu fazu, i to kada EDSS dostigne vrednost oko 5. Sekundarna progresija bolesti je definisana kao postepeno kontinuirano ireverzibilno pogoršanje neurološkog deficita nakon prethodne faze remisije. Primarno progresivnu formu bolesti ima oko 15% od ukupnog broja pacijenata i ona se odlikuje kontinuiranom progresijom neurološkog deficita od početka bolesti, tokom koje se mogu javljati relapsi i tada se radi o progresivno-relapsnoj MS [9].

Prevalenca bolesti u svetu znatno varira, od >100/100.000 stanovnika u severnoj Americi i Evropi do 2/100.000 stanovnika u istočnoj Aziji i subsaharskoj Africi [10], i razlikuje se u odnosu na pol, tako da se procenjuje da danas ima oko 3 puta više obolelih žena nego muškaraca [11]. U multicentričnoj opservacionoj studiji koja je uključila 27 603 pacijenta sa MS utvrđeno je prosečno skraćenje životnog veka za 6-14 godina kod obolelih od MS, u odnosu na opštu populaciju. U longitudinalnoj studiji u kojoj su obrađeni podaci 3 264 pacijenta kojima je dijagnostikovana bolest u periodu od 1950. do 2021. godine, uočeno je smanjenje mortaliteta ukoliko je u mlađem životnom dobu postavljena dijagnoza bolesti, kao i to da je mortalitet vezan za formu bolesti, tako da pacijenti sa RR formom žive u proseku 5 godina duže od pacijenata sa progresivnom formom bolesti [12]. U meta-analizi koja je obuhvatila različite uzroke smrti kod obolelih od MS utvrđeno je da standardizovani odnos smrtnosti (eng. *Standardized Mortality Ratio*) pacijenata iznosi 2,61, u poređenju sa opštom populacijom [13], pri čemu je poznato da najmanje 50% pacijenata sa MS umire direktno od posledica komplikacija ove bolesti [14].

Podaci o geografskoj distribuciji prevalence MS i stopi mortaliteta doprinose razumevanju sadejstva egzogenih i endogenih faktora u nastanku i progresiji bolesti. Definisanje razlika između rane i kasnije progresije bolesti kao i uticaja relapsnih događaja na njenu progresiju omogućavaju bolje razumevanje mehanizama koji leže u osnovi patogeneze ove bolesti, ostvarujući uticaj na planiranje i odabir adekvatnih terapijskih strategija [15]. Ovo je od naročitog značaja za kvalitet života mladih odraslih osoba, budući da oni čine starosnu kategoriju u kojoj je MS definisana kao jedan od glavnih uzroka trajnog invaliditeta [1].

Faktori rizika za nastanak MS

Egzaktni uzrok nastanka MS još uvek nije poznat. Iako nije utvrđeno šta je inicijalni okidač, smatra se da je hronična deregulacija imunske homeostaze u osnovi patogeneze MS. Remećenje balansa imunskog si-

stema se javlja kao rezultat složenih interakcija između genetičkih, infektivnih i proinflamatornih faktora uključujući pušenje, gojaznost i insuficijenciju vitamina D [16–18].

Žene češće oboljevanju od MS u odnosu na muškarace, i to oko 3 puta [19], što je generalno očekivano za autoimunske bolesti [20]. Međutim, muškarci imaju veći rizik za bržu progresiju bolesti i nastanak težeg invaliditeta [19]. Razumevanju ovih polnih razlika doprinosi novodefinisani MS lokus na hromozomu X [21]. Nasledni činioci igraju ulogu u MS, s obzirom da osobe sa obolelim rođakom prvog stepena srodstva dele 2 do 4% rizika za nastanak bolesti, u poređenju sa približno 0,1% rizika u opštoj populaciji, dok za monozi-gotne blizance taj rizik iznosi čak do 50% [20].

Do danas je identifikovan znatan broj varijanti DNK koje povećavaju rizik za nastanak MS: 32 varijante u lokusu za humane leukocitne antigene (HLA), 200 varijanti u autozomalnim genima van HLA lokusa i 1 varijanta na polnom hromozomu X [21]. Varijante u HLA genima, koje pokazuju najsnažniju asocijaciju sa nastankom MS, su pretežno asocirane sa imunološkim procesima [22], što je u skladu sa shvatanjem da su autoimunski mehanizmi ključni u nastanku i progresiji MS. Pojedinačne genetičke varijante doprinose na aditivni način ukupnom riziku za nastanak i/ili kliničku progresiju bolesti [23,24]. Kombinovani doprinos do sada definisanih genetičkih faktora riziku za nastanak MS ima važnu ulogu u izučavanju mehanizama patogeneze bolesti, što za jedan od glavnih ciljeva ima razvoj personalizovanog pristupa u lečenju MS kao kompleksnog poligenetskog oboljenja [25].

Inflamacija i oksidativni stres u patogenezi MS

Glavno histopatološko obeležje MS su perivaskularne inflamatorne lezije-plakovi u beloj i sivoj masi CNS, i oni predstavljaju mesta započinjanja procesa demijelinizacije koja je uzrok naknadnog gubitka aksona [26,27]. Dinamični proces formiranja lezija pokazuje veliku heterogenost kako u imunološkim obrascima tako i u patološkim promenama oligodendrocita, između relapsno-remitentnog i progresivnog toka MS [11]. Inflamatorni proces u aktivnim lezijama CNS povezan je sa oštećenjem krvno-moždane barijere (KMB) [28], a karakteriše se infiltracijom T- i B-limfocita, monocita i aktivacijom mikroglije [29,30]. Invazija limfocita koreliše sa povišenom lokalnom ekspresijom proinflamatornih citokina, hemokina i njihovih receptora [31]. Dolazi do demijelinizacije i oštećenja oligodendrocita, da bi u kasnijim stadijumima bolesti došlo do ireverzibilnog oštećenja aksona i neurodegeneracije [32]. Danas se zauzimaju dva stanovišta kojima se definiše inicijalni proces u nastanku MS [33]. Prema prvom gledištu, MS je primarno inflamatorna bolest u kojoj autoimunski mehanizmi učestvuju u demijelinizaciji i neurodegeneraciji [34]. Drugo gledište određuje MS kao primarno neurodegenerativnu bolest, pri čemu inflamacija u ranoj fazi bolesti utiče na njenu progresiju [35–37]. Neuronska smrt može biti uzrokovana direktnim uticajem potentnih proinflamatornih citokina, kao što su faktor nekroze tumora-alfa (TNF- α) i interleukin-1, ili njihovim indirektnim delovanjem putem podsticanja sinteze toksičnih supstanci u neurogliju [38–40].

Patogeneza MS u vezi je sa oksidativnim stresom koji se odražava kroz povećanu produkciju reaktivnih kiseoničnih vrsta (ROS) i smanjenu efikasnost mehanizama antioksidativne zaštite u ćelijama [41]. Uspostavljanje ravnoteže između stvaranja i uklanjanja ROS važno je za sprečavanje oštećenja tkiva CNS, predstavljajući jedan od mehanizama kojim bi se neurološki deficit u MS mogao držati pod kontrolom [42,43]. Kanonski antioksidativni enzimi, kao što su superoksid dismutase, katalaza i peroksidaze, predstavljaju činioce osnovnih mehanizama zaštite ćelija od oksidativnih modifikacija [44]. Savremene studije ukazuju na specifičnost autoimunskih bolesti, uključujući MS, u pogledu prisustva antitela koja pokazuju katalitičku aktivnost tzv. abzima, čija je koncentracija merljiva na početku bolesti, kada nivoi specifičnih autoantitela još

nisu značajno povišeni [45–47]. Abzimi katalizuju hidrolizu nukleinskih kiselina i mijelinskog baznog proteina [48], ali takođe imaju i redoks-aktivnost što ih čini komponentom odgovora na oksidativni stres [49]. Tokom indukcije eksperimentalnog autoimunskog encefalomijelitisa kod miševa je bio povećan broj limfocita koji sintetišu IgG abzime sa katalaznom aktivnošću, koja je esencijalna za redukovanje koncentracije vodonikperoksida i zaštitu od oksidativnog stresa. Takođe, u ovom eksperimentalnom modelu MS detektovano je značajno povećanje peroksidazne aktivnosti cirkulišućih abzima [49].

U uzorcima humanih moždanih lezija utvrđeno je da disfunkcija mitohondrija nastala usled oksidativnog oštećenja ima važnu ulogu u MS [50,51]. Reaktivne kiseonične/azotne vrste (ROS/RNS) u CNS obolelih od MS inicijalno produkuju aktivirane mikroglijalne ćelije i reaktivni astrociti. ROS/RNS deluju na neurone i oligodendrocite, dovodeći do oksidativnog oštećenja lipida, proteina i DNK, i oštećenja mitohondrija. Disfunkcionalnost mitohondrija dalje vodi ka pojačanoj produkciji slobodnih radikala, podstičući citokinima posredovan inflamatorni odgovor, a zatim i demijelinizaciju u mozgu, kičmenoj moždini i optičkim nervima [41,42,52,53]. Kod pacijenata sa MS pokazano je značajno povećanje koncentracija markera oksidativnog stresa u krvi [42], kao i to da ROS koje produkuju inflamatorne ćelije doprinose procesu neurodegeneracije [52]. Odnos između oksidativnog stresa i neuroinflamacije predstavlja začarani krug u kome se ovi mehanizmi međusobno podstiču, uzrokujući progresivno oštećenje nervnog tkiva, **Slika 1**.

Energetska homeostaza i MS - uloga leptina

U poslednje tri decenije zabeležen je znatni porast prevalence gojaznosti i poremećaja povezanih sa gojaznošću, nezavisno od pola i starosne kategorije, kako u razvijenim tako i u zemljama u razvoju širom sveta [54,55]. Gojaznost tokom adolescencije predstavlja faktor rizika asociran sa nastankom MS [55], pri čemu je jačina ove asocijacije zavisna od pola i geografskog regiona [56,57]. Pregledni rad koji sumira istraživanja odnosa ishrane i MS prikazuje rezultate iz kojih proizilazi da određeni tipovi nutrijenata i ishrane mogu uticati na nastanak i tok bolesti, te se njihovim izborom može uticati na kvalitet života obolelih [58]. Veliki broj pacijenata sa MS, zbog nedovoljne efikasnosti primenjene konvencionalne terapije, pokušava da poboljša kvalitet življenja uz izmenjeni režim ishrane i suplementaciju [59]. Utvrđeno je da povećani unos polinezasićenih masnih kiselina n-3 tipa u odnosu na n-6, kao i hrane bogate vlaknima, uz suplementaciju vitamina D, mogu imati suprimirajući efekat na progresiju bolesti tako što navedene komponente ishrane utiču na smanjenje broja i trajanje relapsa i smanjenje stepena neurološkog deficita [60,61].

Gojaznost je povezana sa hroničnim niskostepenim inflamatornim stanjem organizma, koje se karakteriše izmenjenom sekrecijom adipocitokina i polarizacijom makrofaga adipoznog tkiva ka M1 proinflamatornom fenotipu koji doprinosi insulinskoj rezistenciji [62]. U regulaciji energetskeg balansa koja se ostvaruje kroz praćenje depoa masnog tkiva važnu ulogu ima plejotropni adipocitokin i hormon adipocita leptin (LEP), čiji efekti obuhvataju i regulaciju neuroendokrine i imunske funkcije [63–65]. U studijama su detektovani značajno povišeni nivoi LEP u serumu i cerebrospinalnoj tečnosti pacijenata sa MS, u odnosu na zdrave osobe [66–69], što upućuje da je LEP mogući molekularni marker MS. Budući da se LEP predominantno produkuje i oslobađa iz adipocita, očekivano je da koncentracija cirkulišućeg LEP odražava količinu adipoznog tkiva [70], te je potvrđeno da nivo LEP u serumu i plazmi značajno pozitivno koreliše sa vrednošću indeksa telesne mase (eng. *body mass index*, BMI) [66,71–73]. Studije pokazuju da je koncentracija cirkulišućeg LEP, kao i učestalost MS, veća kod žena nego kod muškaraca [74,75]. Nadalje, u grupi pacijenata sa RR MS izmeren je značajno viši nivo LEP u plazmi kod žena nego kod muškaraca, bez razlike u BMI [72,76], što sugerise na postojanje polno-zavisnog uticaja LEP na patogenezu MS. Terapija je jedan od bitnih faktora koji mogu da utiču na koncentraciju LEP u cirkulaciji. U poređenju sa kontrolama, kod obolelih od MS koji

nisu uzimali terapiju, LEP je bio značajno povišen [66,77], dok kod RR MS pacijenata terapija interferonom-beta nije značajno uticala na promenu koncentracije cirkulišućeg LEP [72,78] ili je pak uticala na opadanje LEP [73].

Kada je reč o ulozi u patogenezi MS, pokazano je da LEP učestvuje u indukciji eksperimentalnog modela bolesti [79]. Ispitujući vezu gojaznosti sa MS, Marrodan i sar. su zaključili da LEP promoviše proliferaciju autoreaktivnih mijelin-specifičnih, a inhibira proliferaciju regulatornih T limfocita. Otkriće činilaca koji povezuju metabolizam i imunitet, među kojima se ističe LEP, daje doprinos razumevanju odnosa između patogeneze autoimunskih oboljenja, kakvo je i MS, i životnih navika. Dalja istraživanja će omogućiti razvoj novih terapijskih pristupa fokusiranih na modulaciju energetskeg metabolizma, čiji bi konačni cilj bila bolja kontrola nad progresijom MS i ostalih autoimunskih bolesti [71].

Komponente leptinskog signalnog puta, inflamacije i antioksidativne zaštite u MS

Više signalnih puteva u ćelijama koji se aktiviraju vezivanjem LEP za njegov receptor (LEPR) [80] čine ovaj adipocitokin i hormon intrigantnim i u pogledu dejstava koje ostvaruje u patogenezi bolesti CNS [65,81]. Analiza LEP u procesu inflamacije, u kontekstu autoimunskih bolesti, ukazuje na njegovu ulogu pojačivača inflamatornog odgovora [63]. Pored centralne uloge u kontroli energetske homeostaze [70], LEP ispoljava značajnu proinflamatornu aktivnost stimulišući na proliferaciju i aktivaciju humanih perifernih mononuklearnih leukocita (PML) i u njima podstiče produkciju proinflamatornih citokina, kao što su TNF- α i interleukin-6, što je potvrđeno i u PML obolelih od MS [73,82], **Slika 2**. Proinflamatorni citokini uzrokuju oštećenje KMB i stimulišu regrutovanje imunskih ćelija, sa periferije u tkivo CNS, koje dalje aktiviraju mikrogliju i pojačavaju neuroinflamatornu kaskadu. Aktivirana mikroglija ima važnu ulogu u inflamaciji koja vodi ka demijelinizaciji i konačnom oštećenju neurona u MS [4,33,83].

Identifikovano je da je CNS glavna meta LEP u regulaciji fizioloških funkcija [80], ali i patogenezi autoimunskih bolesti [63], s obzirom da se LEPR visoko eksprimira u hipotalamusu [84]. Aktivacijom JAK/STAT i PI3K-Akt signalnog puta u hipokampalnim neuronima, LEP može da indukuje ekspresiju ključnog mitohondrijskog enzima antioksidativne zaštite, superoksid-dismutaze 2 (SOD2) [85]. Postoji mogućnost da se ova indukcija SOD2 ostvaruje putem aktivacije transkripcionog regulatora koaktivatora 1 alfa receptora gama aktiviranog proliferatorom peroksizoma (PGC1A), budući da LEP reguliše posttranslacione modifikacije PGC1A koje utiču na aktivnost ovog regulatora [86], **Slika 2**. Navedeni antioksidativni i proinflamatorni efekti ukazuju na dualnu ulogu LEP i ističu leptinski signalni put kao potencijalno veoma značajnu komponentu u patogenezi MS i izazovnu liniju budućih istraživanja.

Geni koji kodiraju komponente leptinskog signalnog puta, inflamacije i antioksidativne zaštite - transkripcija i varijante DNK u patogenezi MS

LEP i LEPR

Hormon i citokin LEP ima ulogu u širokom spektru fizioloških funkcija, kako u tkivu CNS tako i u drugim tkivima [87], budući da je njegov receptor, LEPR, eksprimiran u različitim tipovima ćelija, kao što su glatke i poprečno-prugaste mišićne ćelije, endotelne ćelije i leukociti [88], uz visoku ekspresiju u ćelijama hipotalamusa [89]. Zanimljivo je da je fiziološka uloga LEP izučavana i mnogo pre njegovog otkrića. Decenijama kasnije, spontana mutacija koja je prvobitno bila povezana sa gojaznošću i dijabetesom kod miševa [90,91] definisana je kao uzrok nedostatka LEP i njegovog receptora.

Mikročip analiza transkripcionog profila iRNK u aktivnim humanim MS lezijama je pokazala da postoji povišena transkripcija gena uključenih u neuroimunoendokrinu osu, uključujući i *LEP*. Transkript *LEP* je naročito obogaćen u akutnim inflamatornim, u odnosu na hronične MS lezije, i to sa 6,5 puta višim nivoom [92]. Takođe, zabeležen je značajan porast nivoa *LEP* iRNK u PML kod pacijenata sa RR MS, u odnosu na kontrolnu grupu, i pozitivna korelacija između nivoa *LEP* u plazmi i *TNF-α* iRNK u PML pacijenata [72], što podržava predloženu proinflamatornu ulogu *LEP* u patogenezi MS. Eksperiment izveden na genetički modifikovanim miševima kod kojih je manipulirano stanjem aktivnosti *LEPR* u ranom životnom dobu, ukazuje na važnost adekvatne ekspresije *LEPR* i aktivnosti *LEP-LEPR* signalne ose u specifičnom starosnom periodu, pošto je utvrđeno da deaktivacija *LEPR* dovodi do trajne gojaznosti, smanjene uspešnosti reprodukcije i neadekvatnog razvića mozga, uz promenu aktivnosti određenih gena u mozgu [93]. Tokom akutne inflamacije u fazi relapsa, kod pacijenata sa MS detektovana je povišena ekspresija *LEPR* u PML i porast koncentracije serumskog *LEP*, u odnosu na pacijente u remisiji i kontrolne ispitanike [66]. S druge strane, uporedo sa povećanjem ekspresije *LEP* iRNK utvrđeno je značajno opadanje *LEPR* iRNK u PML pacijenata sa RR MS, u poređenju sa kontrolama, bez značajne asocijacije cirkulišućeg *LEP* sa bolešću [72]. Ovaj nalaz bi se mogao objasniti uticajem drugih faktora, poput proinflamatornih citokina, na *LEP* signalni put, pošto je u saglasnosti sa rezultatom *in vitro* analize efekata smeše proinflamatornih Th1 citokina čija je primena dovela do supresije transkripcije i translacije *LEPR* u glijalnim ćelijama CNS [94]. Pretpostavljeno proinflamatorno dejstvo *LEP* može biti ublaženo sniženim nivoom transkripcije *LEPR*, čime bi se postigao povoljniji uticaj na klinički tok i progresiju MS, što podržava pokazano značajno opadanje vrednosti MSSS kliničkog parametra u korelaciji sa opadanjem nivoa *LEPR* iRNK [72]. Iako su dosadašnji rezultati istraživanja vezani za efekte *LEP* i *LEP* signalne ose nekonzistentni, pregledna studija Rijnsburger i sar. naglašava važnost *LEP* u patogenezi MS i kliničkom toku bolesti [95], čime se i dalje podržava polazna pretpostavka o terapijskom targetovanju ovog proteina u cilju doprinosa poboljšanju kvaliteta života obolelih.

Varijanta zamene pojedinačnog nukleotida na poziciji 2548 uzvodno od mesta početka transkripcije gena *LEP*, rs7799039 (-2548G>A), prvobitno je asocirana sa povišenom koncentracijom *LEP* u plazmi kod gojaznih ispitanika [96,97]. Deceniju kasnije utvrđeno je da ova varijanta može uticati na regulaciju sinteze *LEP*, pošto je locirana u neposrednoj blizini mesta za vezivanje transkripcionog aktivatora [98]. Nukleotidna zamena u šestom egzonu gena *LEPR*, rs1137101 (c.668A>G, p.Gln223Arg), je najčešće ispitivana varijanta u ovom genu [99]. Prouzrokuje supstituciju glutamina argininom u vanćelijskom domenu *LEPR*, što dovodi do remećenja strukture receptora i njime posredovane transdukcije signala u ćeliji [100]. Do danas su u malom broju studija ispitivane varijante rs7799039 i rs1137101 u patogenezi MS. Najobimnija asocijaciona studija, izvedena na populaciji iz Nemačke, utvrdila je da nema značajne asocijacije rs7799039 i rs1137101 sa nastankom MS [101], što je potvrđeno i u studiji Kolić i sar. [102]. Takođe, pokazano je da dve ispitane genske varijante ne utiču na klinički tok bolesti, RR i SP. U analizi uticaja rs7799039 na transkripciju *LEP* u PML, kod pacijenata sa RR MS ređi alel, A, asociran je sa povišenim nivoom *LEP* iRNK, što ukazuje na mogući doprinos ove varijante ukupnom detektovanom porastu nivoa transkripcije *LEP* kod pacijenata, u poređenju sa kontrolama [102]. U ostalim studijama asocijacije rs7799039 sa MS, dobijeni su nekonzistentni rezultati. U jednoj je utvrđena asocijacija alela G sa povišenim vrednostima *LEP* u serumu pacijenata sa MS i sa povišenim rizikom za nastanak MS [103], dok je u drugoj studiji ustanovljena povezanost genotipa AA sa nastankom bolesti [104]. Varijanta *LEPR* rs1137101 je asocirana sa koncentracijom *LEP* u serumu kod pacijenata sa MS [103] i sa rizikom za nastanak MS uz nekonzistentnost dobijenih rezultata u nekoliko do sada ispitanih populacija [103–105]. Sugerisan je potencijalni polno-različit uticaj ove *LEPR* varijante na *LEP* signalni put u patogenezi MS, s obzirom da je ređi alel, G, bio asociran sa značajno povećanim vrednostima kliničkog parametra MSSS samo kod muškaraca obolelih od MS [102].

TNF- α

TNF- α i ostali članovi superfamilije citokina TNF, otkriveni kao antikancerogeni faktori, do sada su povezani sa nizom patofizioloških stanja uključujući i neurološke bolesti [106]. TNF- α se naročito povezuje sa fiziološkim i patološkim procesima u CNS [107]. Tipičan je medijator inflamacije, koji se predominantno eksprimira u aktiviranim monocitima/makrofagima (uključujući mikrogliju u CNS) i aktiviranim NK i T limfocitima [108,109]. Osamdesetih godina 20. veka u studiji izvedenoj na uzorcima lezija mozga pacijenata sa MS ustanovljeno je postojanje TNF- α -pozitivnih makrofaga i astrocita u ovim lezijama [110]. Takođe, povišeni nivo TNF- α u cerebrospinalnoj tečnosti pacijenata sa MS podržava njegovu ulogu u patogenezi MS [107]. Detektovan je značajno povišen nivo *TNF- α* iRNK u PML kod pacijenata sa MS u odnosu na zdrave osobe [111], kao i kod obolelih u relapsu u poređenju sa pacijentima u remisiji [112]. Odsustvo asocijacije nivoa transkripcije *TNF- α* sa RR MS, koje je utvrđeno u studiji Kolić i sar., može se objasniti nepostojanjem razlike u koncentraciji LEP u plazmi između grupa pacijenata i kontrola [72], pošto je prethodno pokazano da LEP indukuje ekspresiju TNF- α u PML [113]. Odsustvo očekivanog porasta *TNF- α* iRNK kod pacijenata može da bude prouzrokovano i efektom terapije interferonom-beta [72], s obzirom da postoji podatak da je interferon-beta smanjio sintezu TNF- α u PML obolelih od MS [114]. Ipak, uspostavljena značajna pozitivna korelacija nivoa cirkulišućeg LEP i *TNF- α* iRNK u PML samo u grupi pacijenata, ne i kontrola, sugerise na mogućnost da su produkcija i efekti TNF- α u patogenezi MS povezani sa LEP signalnim putem, podržavajući proinflamatornu ulogu LEP u MS [72].

PGC1A

PGC1A je centralni faktor regulacije biogeneze i funkcionisanja mitohondrija, adaptivne termogeneze, glukoneogeneze i drugih metaboličkih procesa [115]. U skladu sa svojim specifičnim efektima ovaj transkripcioni koaktivator je visoko ekspimiran u tkivima sa intenzivnim energetske metabolizmom, uključujući CNS [116]. PGC1A je važan za indukciju ćelijskih mehanizma zaštite od oksidativnog stresa, jer stimuliše ekspresiju enzima antioksidativne zaštite, među kojima su SOD2 i glutation peroksidaza 1 [117]. Kako je poznato da oksidativni stres učestvuje u autoimunske-posredovanoj neurodegeneraciji u MS [53], regulatorni efekat PGC1A na enzime antioksidativne zaštite povezuje ovaj transkripcioni koaktivator sa patogenezi MS. PGC1A može biti povezan sa MS i preko njegovog uticaja na regulaciju inflamacije. On interaguje sa p65 subjedinicom nuklearnog faktora-kB i tako suprimira transkripciju gena za Th1 citokine, utičući na smanjenje jačine inflamatornog odgovora [118,119]. U dosadašnjim istraživanjima, utvrđene su promene ekspresije PGC1A na nivou iRNK i proteina u neuronima i glijalnim ćelijama lezija, kao i u PML pacijenata, podržavajući vezu PGC1A sa patogenezi MS [50,51,72]. Snižena ekspresija PGC1A na nivou transkripcije i translacije u kortikalnim neuronima obolelih od MS, u odnosu na kontrolne ćelije, [51], i značajno opadanje nivoa *PGC1A* iRNK u PML pacijenata sa RR MS u odnosu na kontrole [72], mogli bi se povezati sa pojačanim oksidativnim stresom u MS, što bi doprinosilo procesu neurodegeneracije [120]. Ovaj predloženi mehanizam podržava i činjenica da je opadanje transkripcionog nivoa *PGC1A* praćeno opadanjem nivoa *SOD2* iRNK u PML pacijenata sa MS [72], kao i da je detektovanje značajno sniženog nivoa transkripcije *SOD2* u ćelijskoj liniji neuroblastoma sa "utišanim" *PGC1A* bilo praćeno unutarćelijskom akumulacijom ROS uz pojačanu osetljivost neurona na ROS [51].

Varijanta rs8192678 (c.1444G>A, p.Gly482Ser), tipa zamene pojedinačnog nukleotida, locirana je u osmom egzonu gena *PGC1A* i rezultuje aminokiselinskom zamenom koja dovodi do promene aktivnosti PGC1A u regulaciji transkripcije nekoliko ciljnih gena [121,122]. Utvrđena je asocijacija rs8192678 ređeg alela, A, sa povišenim rizikom za nastanak MS [72] i bržom progresijom bolesti [123], što se može dovesti u

vezu sa predloženim prooksidantnim efektom ovog alela [124,125], podržavajući ulogu oksidativnog stresa u patogenezi MS. Naime, ustanovljeno je da osobe sa homozigotnim genotipom AA imaju značajno višu koncentraciju cirkulišućeg molekularnog markera lipidne peroksidacije, u poređenju sa nosiocima genotipa GG [124]. Takođe, alel A je asociran sa povišenim vrednostima markera oksidativnog stresa u plazmi kod obolelih od amiotrofične lateralne skleroze, tokom i neposredno nakon fizičke aktivnosti [125]. Moguće je da varijanta rs8192678 utiče na domen *PGC1A* odgovoran za interakciju sa transkripcionim regulatorima gena antioksidativne zaštite, pošto je porast vrednosti markera oksidativnog stresa bio detektovan pri fizičkoj aktivnosti, tokom koje se očekuje indukcija aktivacije *PGC1A* u ćeliji, koja bi inače trebalo da bude praćena snižavanjem nivoa ROS [125].

SOD2

Izučavanje slobodnih radikala u biološkim sistemima započeto je otkrivanjem superoksid dismutaza (SOD) 1969. godine [126]. SOD katalizuju konverziju superoksid anjon radikala do molekularnog kiseonika i vodonik peroksida i na taj način, predstavljajući prvu liniju odbrane od slobodnih radikala, učestvuju u regulaciji brojnih procesa u ćelijama. SOD2 (Mn SOD) je enzim mitohondrijalnog matriksa, eksprimiran u svim tipovima ćelija [127]. Gubitak aktivnosti SOD2 izaziva oksidativni stres u ćelijama, te je povezan sa mnogim patološkim fenotipovima, prvenstveno u metabolički aktivnim tkivima kakvo je i nervno. Neurodegeneracija i oštećenje srca usled disfunkcije SOD2 rezultovali su letalnim ishodom [128]. Putem regulacije ćelijskog odgovora na oksidativni stres, SOD učestvuju i u patogenezi MS [129]. Na eksperimentalnom modelu MS pokazano je da indukcija ekspresije SOD2 dovodi do redukovanja stepena demijelinizacije i oštećenja tkiva prouzrokovanih prethodnom supresijom aktivnosti ovog enzima [130]. Kod pacijenata sa MS detektovano je značajno smanjenje ekspresije SOD2 u kortikalnim neuronima, koje je bilo praćeno porastom ROS, opadanjem nivoa *PGC1A* i smrću neurona [51]. Pokazano je da u ćelijama CNS *PGC1A* indukuje ekspresiju SOD2 [131]. U PML obolelih od RR MS uspostavljena je pozitivna korelacija nivoa *SOD2* i *PGC1A* iRNK, što ukazuje na vezu opadanja transkripcionih nivoa *PGC1A* i *SOD2* sa jedne i porasta oksidativnog stresa sa druge strane [72]. Istovremeno, pozitivna korelacija utvrđena između *SOD2* iRNK i nivoa *LEP*, *LEPR* i *TNF-α* iRNK u obe ispitivane grupe, pacijenata i kontrola, sugerije da sa aspekta patogeneze MS SOD2 verovatno nije specifični efektor LEP signalnog puta u PML [72].

Zaključak

Dosadašnja istraživanja podržavaju ulogu molekularnih komponenata povezanih sa LEP signalnim putem u patogenezi MS. Nekonzistentnost rezultata studija efekata varijanti i transkripcije gena koji kodiraju komponente LEP signalnog puta i sa njima povezane komponente antioksidativne zaštite i inflamacije, u asocijaciji sa nastankom i kliničkim tokom MS, ukazuje na potrebu za sprovođenjem dodatnih asocijacionih studija sa striktno definisanim kriterijumima za grupe ispitanika većeg obima, kao i funkcionalnih analiza. Interakcija različitih genetičkih i faktora sredine može biti uzrok navedene nekonzistentnosti rezultata genetičkih studija, ističući ishranu kao jedan od značajnih činilaca, budući da upravo LEP ima centralnu ulogu u regulaciji unosa hrane i energetske homeostaze. Uzimajući u obzir heterogenost MS i suštinsku složenost ljudskog genoma, doprinos rezultata genetičkih studija jeste i u mogućnosti da se okarakterisani genetički činioci u budućim istraživanjima uključe u razvoj personalizovane terapije MS kroz kreiranje kliničkog predikcionog algoritma koji bi, u odnosu na dati genetički profil, mogao predložiti izmene u životnim navikama u cilju dodatnog poboljšanja efekata primenjene konvencionalne terapije [132,133].

Zahvalnica

Rad je finansiran od strane Ministarstva nauke, tehnološkog razvoja i inovacija Republike Srbije; broj ugovora 451-03-47/2023-01/200017.

Posebnu zahvalnost upućujem rukovodiocu teme u okviru koje je ova disertacija realizovana, dr Aleksandri Stanković, kao i dr Maji Živković, rukovodiocu Laboratorije za radiobiologiju i molekularnu genetiku, na svesrdnoj pomoći u oblikovanju doktorske disertacije iz koje je proizašlo ovo poglavlje u monografiji.

Literatura

1. Dobson R, Giovannoni G. Multiple sclerosis – a review. *Eur J Neurol*. 2019;26(1):27–40.
2. Manouchehrinia A, Kingwell E, Zhu F, Tremlett H, Hillert J, Ramanujam R. A multiple sclerosis disease progression measure based on cumulative disability. *Mult Scler J*. 2021;27(12):1875–83.
3. Sokolova EA, Boyarskikh UA, Aulchenko YS, Filipenko ML. Genetics of multiple sclerosis today. *Biol Bull Rev*. 2016;6(2):113–25.
4. Ortiz GG, Pacheco-Moisés FP, Bitzer-Quintero OK, Ramírez-Anguiano AC, Flores-Alvarado LJ, Ramírez-Ramírez V, et al. Immunology and oxidative stress in multiple sclerosis: Clinical and basic approach. *Clin Dev Immunol*. 2013;2013:708659.
5. Kurtzke JF. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: An expanded disability status scale (EDSS). *Neurology*. 1983;33(11):1444–52.
6. Roxburgh RH, Seaman SR, Masterman T, Hensiek AE, Sawcer SJ, Vukusic S, et al. Multiple Sclerosis Severity Score: using disability and disease duration to rate disease severity. *Neurology*. 2005 Apr;64(7):1144–51.
7. Lassmann H. Multiple Sclerosis Pathology. 2018;1–16.
8. Lublin FD, Häring DA, Ganjgahi H, Ocampo A, Hatami F, Čuklina J, et al. How patients with multiple sclerosis acquire disability. *Brain*. 2022;145(9):3147–61.
9. Lublin FD, Reingold SC, Cohen JA, Cutter GR, Thompson AJ, Wolinsky JS, et al. Defining the clinical course of multiple sclerosis. *Neurology*. 2014;83:278–86.
10. Howard J, Trevick S, Younger DS. Epidemiology of Multiple Sclerosis. *Neurol Clin*. 2016;34(4):919–39.
11. Dighriri IM, Aldalbahi AA, Albeladi F, Tahiri AA, Kinani EM, Almohsen RA, et al. An Overview of the History, Pathophysiology, and Pharmacological Interventions of Multiple Sclerosis. *Cureus*. 2023;15(1):1–12.
12. Willumsen JS, Grytten N, Aarseth J, Myklebust TÅ, Myhr KM, Midgard R. Mortality and cause of death in multiple sclerosis in western Norway 1950-2021: a registry-based linkage study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2022;93(11):1154–61.
13. Smyrke N, Dunn N, Murley C, Mason D. Standardized mortality ratios in multiple sclerosis: Systematic review with meta-analysis. *Acta Neurol Scand*. 2022;145(3):360–70.
14. Scalfari A, Knappertz V, Cutter G, Goodin DS, Ashton R, Ebers GC. Mortality in patients with multiple sclerosis. *Neurology*. 2013;81(2):184–92.
15. Leray E, Moreau T, Fromont A, Edan G. Epidemiology of multiple sclerosis. *Rev Neurol (Paris)*. 2016;172(1):3–13.
16. Waubant E, Lucas R, Mowry E, Graves J, Olsson T, Alfredsson L, et al. Environmental and genetic risk factors for MS: an integrated review. *Ann Clin Transl Neurol*. 2019;6(9):1905–22.
17. Sintzel MB, Rametta M, Reder AT. Vitamin D and Multiple Sclerosis: A Comprehensive Review. *Neurol Ther*. 2018;7(1):59–85.
18. Belbasis L, Bellou V, Evangelou E, Ioannidis JPA, Tzoulaki I. Environmental risk factors and multiple sclerosis: An umbrella review of systematic reviews and meta-analyses. *Lancet Neurol*. 2015;14(3):263–73.
19. Voskuhl RR, Patel K, Paul F, Gold SM, Scheel M, Kuchling J, et al. Sex differences in brain atrophy in multiple sclerosis. *Biol Sex Differ*. 2020;11(1):1–10.
20. Reich DS, Lucchinetti CF, Calabresi PA. Multiple Sclerosis. *N Engl J Med*. 2018;378(2):169–80.
21. Patsopoulos NA. Genetics of multiple sclerosis: An overview and new directions. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2018;8(7):1–11.
22. Baranzini S, Sawcer S, Consortium =International Multiple Sclerosis Genetics, Consortium =MultipleMS, *. Genetic analysis of multiple sclerosis severity identifies a novel locus and implicates CNS resilience as a major determinant of outcome. Preprint at Research Square; 2022.

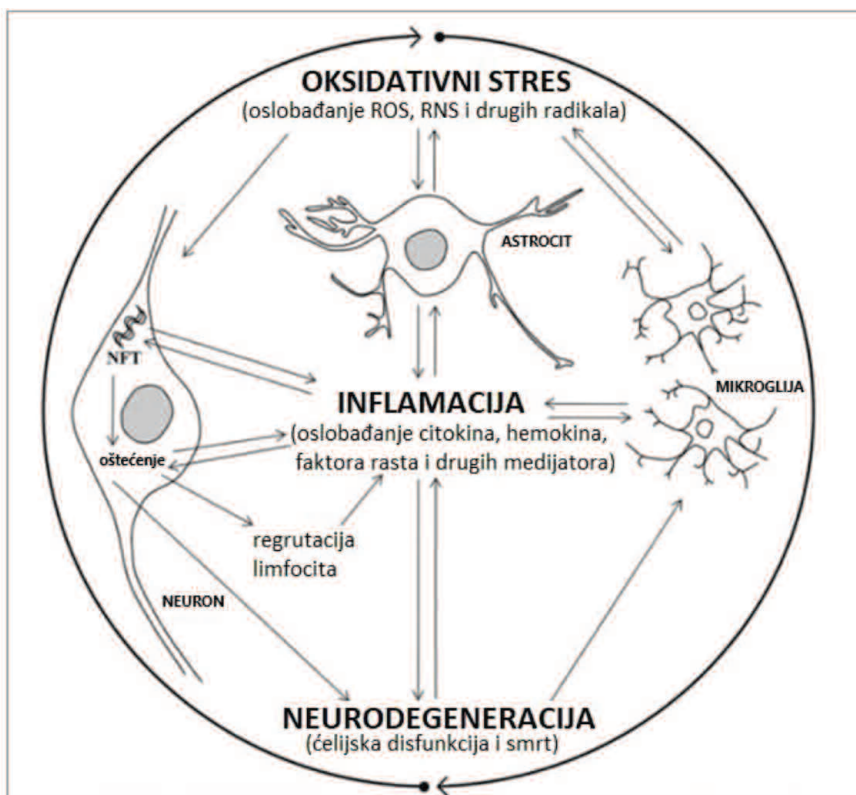
23. Cotsapas C, Mitrovic M. Genome-wide association studies of multiple sclerosis. *Clin Transl Immunol*. 2018;7(6):1–9.
24. Goris A, Vandebergh M, McCauley JL, Saarela J, Cotsapas C. Genetics of multiple sclerosis: lessons from polygenicity. *Lancet Neurol*. 2022 Sep;21(9):830–42.
25. Tsareva EY, Favorova OO, Boyko AN, Kulakova OG. Genetic Markers for Personalized Therapy of Polygenic Diseases: Pharmacogenetics of Multiple Sclerosis. *Mol Biol*. 2019;53(4):513–34.
26. Charcot JM. *Histologie de la sclerose en plaques*. Paris: [s.n.]; 1868.
27. Kuhlmann T, Ludwin S, Prat A, Antel J, Brück W, Lassmann H. An updated histological classification system for multiple sclerosis lesions. *Acta Neuropathol*. 2017;133(1):13–24.
28. Hochmeister S, Grundtner R, Bauer J, Engelhardt B, Lyck R, Gordon G, et al. Dysferlin is a new marker for leaky brain blood vessels in multiple sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2006;65(9):855–65.
29. van Langelaar J, Rijvers L, Smolders J, van Luijn MM. B and T Cells Driving Multiple Sclerosis: Identity, Mechanisms and Potential Triggers. *Front Immunol*. 2020;11(May):1–12.
30. Frischer JM, Bramow S, Dal-Bianco A, Lucchinetti CF, Rauschka H, Schmidbauer M, et al. The relation between inflammation and neurodegeneration in multiple sclerosis brains. *Brain*. 2009;132(5):1175–89.
31. Cui LY, Chu SF, Chen NH. The role of chemokines and chemokine receptors in multiple sclerosis. *Int Immunopharmacol*. 2020;83:106314.
32. Trapp BD, Peterson J, Ransohoff RM, Rudick R, Mörk S, Bö L. Axonal Transection in the Lesions of Multiple Sclerosis. *N Engl J Med*. 1998;338(5):278–85.
33. Pegoretti V, Swanson KA, Bethea JR, Probert L, Eisel ULM, Fischer R. Inflammation and Oxidative Stress in Multiple Sclerosis: Consequences for Therapy Development. *Oxid Med Cell Longev*. 2020;2020:7191080.
34. Hohlfeld R, Dornmair K, Meinl E, Wekerle H. The search for the target antigens of multiple sclerosis, part 1: Autoreactive CD4+ T lymphocytes as pathogenic effectors and therapeutic targets. *Lancet Neurol*. 2016;15(2):198–209.
35. Trapp BD, Nave KA. Multiple sclerosis: An immune or neurodegenerative disorder? *Annu Rev Neurosci*. 2008;31:247–69.
36. Kassmann CM, Lappe-Siefke C, Baes M, Brügger B, Mildner A, Werner HB, et al. Axonal loss and neuroinflammation caused by peroxisome-deficient oligodendrocytes. *Nat Genet*. 2007;39(8):969–76.
37. Kroner A, Schwab N, Ip CW, Leder C, Nave KA, Mäurer M, et al. PD-1 regulates neural damage in oligodendroglia-induced inflammation. *PLoS One*. 2009;4(2).
38. Probert L. TNF and its receptors in the CNS: The essential, the desirable and the deleterious effects. *Neuroscience*. 2015;302:2–22.
39. Neniskyte U, Vilalta A, Brown GC. Tumour necrosis factor alpha-induced neuronal loss is mediated by microglial phagocytosis. *FEBS Lett*. 2014;588(17):2952–6.
40. Thornton P, Pinteaux E, Gibson RM, Allan SM, Rothwell NJ. Interleukin-1-induced neurotoxicity is mediated by glia and requires caspase activation and free radical release. *J Neurochem*. 2006;98(1):258–66.
41. Ortiz GG, Pacheco-Moisés FP, Torres-Sánchez ED, Sorto-Gómez TE, Mireles-Ramírez M, León-Gil A, et al. Multiple Sclerosis and Its Relationship with Oxidative Stress, Glutathione Redox System, ATPase System, and Membrane Fluidity. *Trending Top Mult Scler*. 2016.
42. Padureanu R, Albu CV, Mititelu RR, Bacanoiu MV, Docea AO, Calina D, et al. Oxidative Stress and Inflammation Interdependence in Multiple Sclerosis. *J Clin Med*. 2019;8(11):1815.
43. Zhang SY, Gui LN, Liu YY, Shi S, Cheng Y. Oxidative Stress Marker Aberrations in Multiple Sclerosis: A Meta-Analysis Study. *Front Neurosci*. 2020;14(August):1–8.
44. Bhattacharyya A, Chattopadhyay R, Mitra S, Crowe SE. Oxidative stress: An essential factor in the pathogenesis of gastrointestinal mucosal diseases. *Physiol Rev*. 2014;94(2):329–54.
45. Baranova S V., Mikheeva E V., Buneva VN, Nevinsky GA. Antibodies from the sera of multiple sclerosis patients efficiently hydrolyze five histones. *Biomolecules*. 2019;9(11).
46. Aulova KS, Urusov AE, Toporkova LB, Sedykh SE, Shevchenko YA, Tereshchenko VP, et al. Production of abzymes in th, cba, and c57bl/6 mice before and after mog treatment: Comparing changes in cell differentiation and proliferation. *Biomolecules*. 2020;10(1):1–25.
47. Nevinsky GA. Autoimmune processes in multiple sclerosis: Production of harmful catalytic antibodies associated with significant changes in the hematopoietic stem cell differentiation and proliferation. In: Conzalez-Quevedo A, editor. *Multiple sclerosis*. Rijeka: InTech; 2016; 100–147.

48. Georgy A, Nevinsky VNB and PSD. Multiple Sclerosis : Enzymatic Cross Site-Specific Recognition. 2022;10:1876.
49. Urusov AE, Tolmacheva AS, Aulova KS, Nevinsky GA. Autoantibody–Abzymes with Catalase Activity in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis Mice. *Molecules*. 2023;28(3).
50. Nijland PG, Witte ME, van het Hof B, van der Pol S, Bauer J, Lassmann H, et al. Astroglial PGC-1alpha increases mitochondrial antioxidant capacity and suppresses inflammation: Implications for multiple sclerosis. *Acta Neuropathol Commun*. 2014;2(1):1–13.
51. Witte ME, Nijland PG, Drexhage JAR, Gerritsen W, Geerts D, Van Het Hof B, et al. Reduced expression of PGC-1α partly underlies mitochondrial changes and correlates with neuronal loss in multiple sclerosis cortex. *Acta Neuropathol*. 2013;125(2):231–43.
52. Ohi K, Tenbrock K, Kipp M. Oxidative stress in multiple sclerosis: Central and peripheral mode of action. *Exp Neurol*. 2016;277:58–67.
53. Solleiro-Villavicencio H, Rivas-Arancibia S. Effect of chronic oxidative stress on neuroinflammatory response mediated by CD4+T cells in neurodegenerative diseases. *Front Cell Neurosci*. 2018;12(April):1–13.
54. Jaacks LM, Vandevijvere S, Pan A, McGowan CJ, Wallace C, Imamura F, et al. The obesity transition: stages of the global epidemic. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2019;7(3):231–40.
55. Gianfrancesco M, Barcellos L. Obesity and Multiple Sclerosis Susceptibility: A Review. *J Neurol Neuromedicine*. 2016;1(7):1–5.
56. Wesnes K, Riise T, Casetta I, Drulovic J, Granieri E, Holmøy T, et al. Body size and the risk of multiple sclerosis in Norway and Italy: The EnvIMS study. *Mult Scler J*. 2015;21(4):388–95.
57. Awada R, Parimisetty A, Lefebvre dHellencourt C. Influence of Obesity on Neurodegenerative Diseases. *Neurodegener Dis*. 2013; 16:381–401.
58. Stoiloudis P, Kesidou E, Bakirtzis C, Sintila SA, Konstantinidou N, Boziki M, et al. The Role of Diet and Interventions on Multiple Sclerosis: A Review. *Nutrients*. 2022;14(6).
59. Penesová A, Dean Z, Kollár B, Havranová A, Imrich R, Vlček M, et al. Nutritional intervention as an essential part of multiple sclerosis treatment? *Physiol Res*. 2018;67(4):521–33.
60. Bjørnevik K, Chitnis T, Ascherio A, Munger KL. Polyunsaturated fatty acids and the risk of multiple sclerosis. *Mult Scler*. 2017;23(14):1830–8.
61. Riccio P, Rossano R, Larocca M, Trotta V, Mennella I, Vitaglione P, et al. Anti-inflammatory nutritional intervention in patients with relapsing-remitting and primary-progressive multiple sclerosis: A pilot study. *Exp Biol Med*. 2016;241(6):620–35.
62. Lumeng CN, Bodzin JL, Saltiel AR. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J Clin Invest*. 2007;117(1):175–84.
63. La Cava A. Leptin in inflammation and autoimmunity. *Cytokine*. 2017;98:51–8.
64. La Cava A, Matarese G. The weight of leptin in immunity. *Nat Rev Immunol*. 2004;4(5):371–9.
65. Matarese G, Carrieri PB, Montella S, De Rosa V, La Cava A. Leptin as a metabolic link to multiple sclerosis. *Nat Rev Neurol*. 2010;6(8):455–61.
66. Frisullo G, Mirabella M, Angelucci F, Caggiula M, Morosetti R, Sancricca C, et al. The effect of disease activity on leptin, leptin receptor and suppressor of cytokine signalling-3 expression in relapsing-remitting multiple sclerosis. *J Neuroimmunol*. 2007;192(1–2):174–83.
67. Matarese G, Procaccini C, De Rosa V. The intricate interface between immune and metabolic regulation: a role for leptin in the pathogenesis of multiple sclerosis? *J Leukoc Biol*. 2008 Oct;84(4):893–9.
68. Xie XF, Huang XH, Shen AZ, Li J, Sun YH. Association between circulating leptin levels and multiple sclerosis: a systematic review and meta-analysis. *Postgrad Med J*. 2018;94(1111):278–83.
69. Matarese G, Carrieri PB, La Cava A, Perna F, Sanna V, De Rosa V, et al. Leptin increase in multiple sclerosis associates with reduced number of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(14):5150–5.
70. Münzberg; H, Morrison CD, Pennington. Structure, production and signaling of leptin Heike. *Metabolism*. 2014;64(1):13–23.
71. Marrodan M, Farez MF, Balbuena Aguirre ME, Correale J. Obesity and the risk of Multiple Sclerosis. The role of Leptin. *Ann Clin Transl Neurol*. 2021;8(2):406–24.
72. Kolić I, Stojković L, Dinčić E, Jovanović I, Stanković A, Živković M. Expression of LEP, LEPR and PGC1A genes is altered in peripheral blood mononuclear cells of patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. *J Neuroimmunol*. 2020 Jan;338:577090.
73. Batocchi AP, Rotondi M, Caggiula M, Frisullo G, Odoardi F, Nociti V, et al. Leptin as a marker of multiple sclerosis activity in patients treated with interferon-beta. *J Neuroimmunol*. 2003;139(1–2):150–4.

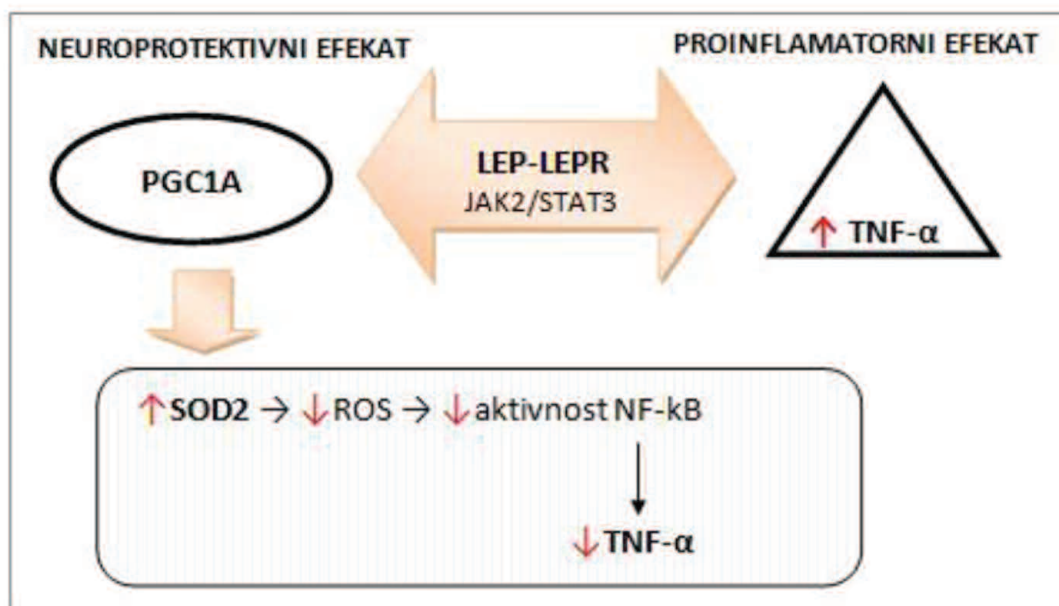
74. Havel PJ, Kasim-Karakas S, Dubuc GR, Mueller W, Phinney SD. Gender differences in plasma leptin concentrations [4]. *Nat Med*. 1996;2(9):949–50.
75. Harbo HF, Gold R, Tintora M. Sex and gender issues in multiple sclerosis. *Ther Adv Neurol Disord*. 2013;6(4):237–48.
76. Rotondi M, Batocchi AP, Coperchini F, Caggiula M, Zerbini F, Sideri R, et al. Severe disability in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis is associated with profound changes in the regulation of leptin secretion. *Neuroimmunomodulation*. 2013;20(6):341–7.
77. Emamgholipour S, Eshaghi SM, Hossein-nezhad A, Mirzaei K, Maghbooli Z, Sahraian MA. Adipocytokine Profile, Cytokine Levels and Foxp3 Expression in Multiple Sclerosis: A Possible Link to Susceptibility and Clinical Course of Disease. *PLoS One*. 2013;8(10):6–8.
78. Chatzantoni K, Papathanassopoulos P, Gourzoulidou E, Mouzaki A. Leptin and its soluble receptor in plasma of patients suffering from relapsing-remitting multiple sclerosis (MS): In vitro effects of leptin on type-1 and type-2 cytokine secretion by peripheral blood mononuclear cells, T-cells and monocytes of MS patient. *J Autoimmun*. 2004;23(2):169–77.
79. Sanna V, Di Giacomo A, La Cava A, Lechler RI, Fontana S, Zappacosta S, et al. Leptin surge precedes onset of autoimmune encephalomyelitis and correlates with development of pathogenic T cell responses. *J Clin Invest*. 2003;111(2):241–50.
80. Liu H, Du T, Li C, Yang G. STAT3 phosphorylation in central leptin resistance. *Nutr Metab*. 2021;18(1):1–13.
81. Zou X, Zhong L, Zhu C, Zhao H, Zhao F, Cui R, et al. Role of leptin in mood disorder and neurodegenerative disease. *Front Neurol*. 2019;13(MAY):1–8.
82. Sánchez-Margalet V, Martín-Romero C, Santos-Alvarez J, Goberna R, Najib S, Gonzalez-Yanes C. Role of leptin as an immunomodulator of blood mononuclear cells: Mechanisms of action. *Clin Exp Immunol*. 2003;133(1):11–9.
83. Kutzelnigg A, Lucchinetti CF, Stadelmann C, Brück W, Rauschka H, Bergmann M, et al. Cortical demyelination and diffuse white matter injury in multiple sclerosis. *Brain*. 2005;128(11):2705–12.
84. Gorska E, Popko K, Stelmaszczyk-Emmel A, Ciepiela O, Kucharska A, Wasik M. Leptin receptors. *Eur J Med Res*. 2010;15 Suppl 2(Suppl 2):50–4.
85. Guo Z, Jiang H, Xu X, Duan W, Mattson MP. Leptin-mediated cell survival signaling in hippocampal neurons mediated by JAK/STAT3 and mitochondrial stabilization. *J Biol Chem*. 2008;283(3):1754–63.
86. García-Carrizo F, Nozhenko Y, Palou A, Rodríguez AM. Leptin Effect on Acetylation and Phosphorylation of Pgc1 α in Muscle Cells Associated With Ampk and Akt Activation in High-Glucose Medium. *J Cell Physiol*. 2016;231(3):641–9.
87. Pérez-Pérez A, Sánchez-Jiménez F, Vilariño-García T, Sánchez-Margalet V. Role of leptin in inflammation and vice versa. *Int J Mol Sci*. 2020;21(16):1–24.
88. Peelman F, Waelpuut W, Iserentant H, Lavens D, Eyckerman S, Zabeau L, et al. Leptin: linking adipocyte metabolism with cardiovascular and autoimmune diseases. *Prog Lipid Res*. 2004;43(4):283–301.
89. White DW, Tartaglia LA. Leptin and OB-R: Body weight regulation by a cytokine receptor. *Cytokine Growth Factor Rev*. 1996;7(4):303–9.
90. Ingalls AM, Dickie MM, Snell GD. Obese, a new mutation in the house mouse. *J Hered*. 1950;41(12):315–7.
91. Hummel KP, Dickie MM, Coleman DL. Diabetes, a new mutation in the mouse. *Science* (80-). 1966;153(3740):1127–8.
92. Lock C, Hermans G, Pedotti R, Brendolan A, Schadt E, Garren H, et al. Gene-microarray analysis of multiple sclerosis lesions yields new targets validated in autoimmune encephalomyelitis. *Nat Med*. 2002;8(5):500–8.
93. Ramos-Lobo AM, Teixeira PD, Furigo IC, Melo HM, de M Lyra E Silva N, De Felice FG, et al. Long-term consequences of the absence of leptin signaling in early life. *Elife*. 2019;8:1–25.
94. Rose JJ, Bealmear B, Nedelkoska L, Studzinski D, Lisak RP, Benjamins JA. Cytokines Decrease Expression of Interleukin-6 Signal Transducer and Leptin Receptor in Central Nervous System Glia. 2009;3106(May):3098–106.
95. Rijnsburger M, Djuric N, Mulder IA, de Vries HE. Adipokines as immune cell modulators in multiple sclerosis. *Int J Mol Sci*. 2021;22(19):1–22.
96. Mammès O, Betoulle D, Aubert R, Herbeth B, Siest G, Fumeron F. Association of the G-2548A polymorphism in the 5' region of the LEP gene with overweight. *Ann Hum Genet*. 2000;64(5):391–4.
97. Olivier Mammès, Dina Betoulle, Roberte Aubert, Vincent Giraud, Sylvie Tuzet, Anne Petiet, Nicole Colas-Linhart and FF, O. Brief Genetics Report. *Diabetes*. 1998;47(march):487–9.
98. Bartella V, Cascio S, Fiorio E, Auriemma A, Russo A, Surmacz E. Insulin-dependent leptin expression in breast cancer cells. *Cancer Res*. 2008;68(12):4919–27.

99. Yang Y, Niu T. A meta-analysis of associations of LEPR Q223R and K109R polymorphisms with Type 2 diabetes risk. *PLoS One*. 2018;13(1):1–25.
100. Daghestani M, Purohit R, Daghestani M, Daghistani M, Warsy A. Molecular dynamic (MD) studies on leptin receptor gene and associated variations in the anthropometric and metabolic profiles of Saudi women. 2019;(Md):1–15.
101. Rey LK, Wiecezorek S, Akkad DA, Linker RA, Chan A, Hoffjan S. Polymorphisms in genes encoding leptin, ghrelin and their receptors in German multiple sclerosis patients. *Mol Cell Probes*. 2011;25(5–6):255–9.
102. Kolić I, Stojković L, Stankovic A, Stefanović M, Dinčić E, Zivkovic M. Association study of rs7799039, rs1137101 and rs8192678 gene variants with disease susceptibility/severity and corresponding LEP, LEPR and PGC1A gene expression in multiple sclerosis. *Gene*. 2021;774:145422.
103. Farrokhi M, Dabirzadeh M, Fadaee E, Beni AA, Saadatpour Z, Rezaei A, et al. Polymorphism in Leptin and Leptin Receptor Genes May Modify Leptin Levels and Represent Risk Factors for Multiple Sclerosis. *Immunol Invest*. 2016;45(4):328–35.
104. Dashti M, Alroughani R, Jacob S, Al-Temaimi R. Leptin rs7799039 polymorphism is associated with multiple sclerosis risk in Kuwait. *Mult Scler Relat Disord*. 2019;36(August):101409.
105. Yousefian M, Nemati R, Daryabor G, Gholijani N, Nikseresht A, Borhani-Haghighi A, et al. Gender-Specific Association of Leptin and Adiponectin Genes With Multiple Sclerosis. *Am J Med Sci*. 2018;356(2):159–67.
106. Aggarwal BB, Gupta SC, Kim JH. Historical perspectives on tumor necrosis factor and its superfamily: 25 years later, a golden journey. *Blood*. 2012;119(3):651–65.
107. Zahid M, Busmail A, Penumetcha SS, Ahluwalia S, Irfan R, Khan SA, et al. Tumor Necrosis Factor Alpha Blockade and Multiple Sclerosis: Exploring New Avenues. *Cureus*. 2021;13(10).
108. Almishri W, Santodomingo-Garzon T, Le T, Stack D, Mody CH, Swain MG. TNF α Augments Cytokine-Induced NK Cell IFN γ Production through TNFR2. *J Innate Immun*. 2016;8(6):617–29.
109. Falvo J V., Tsytsykova A V., Goldfeld AE. Transcriptional control of the TNF Gene. *Curr Dir Autoimmun*. 2010;11(table 1):27–60.
110. Hofman FM, Hinton DR, Johnson K, Merrill JE. Tumor necrosis factor identified in multiple sclerosis brain. *J Exp Med*. 1989;170(2):607–12.
111. Furlan R, Rovaris M, Boneschi FM, Khademi M, Bergami A, Gironi M, et al. Immunological patterns identifying disease course and evolution in multiple sclerosis patients. *J Neuroimmunol*. 2005;165(1–2):192–200.
112. Bertolotto A, Malucchi S, Capobianco M, Manzardo E, Guastamacchia G, Milano E, et al. Quantitative PCR reveals increased levels of tumor necrosis factor- α mRNA in peripheral blood mononuclear cells of multiple sclerosis patients during relapses. *J Interf Cytokine Res*. 1999;19(6):575–81.
113. Zarkesh-Esfahani H, Pockley G, Metcalfe RA, Bidlingmaier M, Wu Z, Ajami A, et al. High-Dose Leptin Activates Human Leukocytes Via Receptor Expression on Monocytes. *J Immunol*. 2001;167(8):4593–9.
114. Sternberg Z, Chadha K, Lieberman A, Hojnacki D, Drake A, Zamboni P, et al. Quercetin and interferon-beta modulate immune response(s) in peripheral blood mononuclear cells isolated from multiple sclerosis patients. *J Neuroimmunol*. 2008;205(1–2):142–147.
115. Handschin C, Spiegelman BM. Peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator 1 coactivators, energy homeostasis, and metabolism. *Endocr Rev*. 2006;27(7):728–35.
116. Esterbauer H, Oberkofler H, Krempler F, Patsch W. Human peroxisome proliferator activated receptor gamma coactivator 1 (PPARGC1) gene: cDNA sequence, genomic organization, chromosomal localization, and tissue expression. *Genomics*. 1999;62(1):98–102.
117. St-Pierre J, Lin J, Krauss S, Tarr PT, Yang R, Newgard CB, et al. Bioenergetic analysis of peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivators 1 α and 1 β (PGC-1 α and PGC-1 β) in muscle cells. *J Biol Chem*. 2003;278(29):26597–603.
118. Rius-Pérez S, Torres-Cuevas I, Millán I, Ortega ÁL, Pérez S, Sandhu MA. PGC-1 α , Inflammation, and Oxidative Stress: An Integrative View in Metabolism. *Oxid Med Cell Longev*. 2020;2020:1452696.
119. Pérez S, Rius-Pérez S, Finamor I, Martí-Andrés P, Prieto I, García R, et al. Obesity causes PGC-1 α deficiency in the pancreas leading to marked IL-6 upregulation via NF- κ B in acute pancreatitis. *J Pathol*. 2019;247(1):48–59.
120. Horssen J Van, Schreibelt G, Drexhage J, Hazes T, Dijkstra CD, Valk P Van Der, et al. Severe oxidative damage in multiple sclerosis lesions coincides with enhanced antioxidant enzyme expression. *Free Radic Biol Med*. 2008;45(12):1729–37.
121. Chen Y, Mu P, He S, Tang X, Guo X, Li H, et al. Gly482Ser mutation impairs the effects of peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator-1 α on decreasing fat deposition and stimulating phosphoenolpyruvate carboxykinase expression in hepatocytes. *Nutr Res*. 2013;33(4):332–9.

122. Choi YS, Hong JM, Lim S, Ko KS, Pak YK. Impaired coactivator activity of the Gly482 variant of peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator-1 α (PGC-1 α) on mitochondrial transcription factor A (Tfam) promoter. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006;344(3):708–12.
123. Briggs FBS, Shao X, Goldstein BA, Oksenberg JR, Barcellos LF, De Jager PL, et al. Genome-wide association study of severity in multiple sclerosis. *Genes Immun.* 2011;12(8):615–25.
124. Weng SW, Lin TK, Wang PW, Chen IY, Lee HC, Chen S Der, et al. Gly482Ser polymorphism in the peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator-1 α gene is associated with oxidative stress and abdominal obesity. *Metabolism.* 2010;59(4):581–6.
125. Pasquinelli A, Chico L, Pasquali L, Bisordi C, Lo Gerfo A, Fabbri M, et al. Gly482Ser PGC-1 α gene polymorphism and exercise-related oxidative stress in amyotrophic lateral sclerosis patients. *Front Cell Neurosci.* 2016;10(APR):1–11.
126. Mc Cord Joe M. and Fridovich Irwin. An enzymic. 1969;244(22):6049–55.
127. Wang Y, Branicky R, Noë A, Hekimi S. Superoxide dismutases: Dual roles in controlling ROS damage and regulating ROS signaling. *J Cell Biol.* 2018;217(6):1915–28.
128. Lebovitz RM, Zhang H, Vogel H, Cartwright J, Dionne L, Lu N, et al. Neurodegeneration, myocardial injury, and perinatal death in mitochondrial superoxide dismutase-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93(18):9782–7.
129. Ibitoye R, Kemp K, Rice C, Hares K, Scolding N, Wilkins A. Oxidative stress-related biomarkers in multiple sclerosis: A review. *Bio-mark Med.* 2016;10(8):889–902.
130. Qi X, Lewin AS, Sun L, Hauswirth WW, Guy J. Suppression of mitochondrial oxidative stress provides long-term neuroprotection in experimental optic neuritis. *Investig Ophthalmol Vis Sci.* 2007;48(2):681–91.
131. St-Pierre J, Drori S, Uldry M, Silvaggi JM, Rhee J, Jäger S, et al. Suppression of Reactive Oxygen Species and Neurodegeneration by the PGC-1 Transcriptional Coactivators. *Cell.* 2006;127(2):397–408.
132. Aljehani MN, Alshehri ZI, Alharbi FA, Balbaid YT, Wali AM. Corrected : Association Between Body Mass Index and Response to Disease-Modifying Therapies in Patients With Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis at King Abdulaziz University Hospital : A Retrospective Study This article has been corrected . 2023;14(12).
133. Bohr A, Memarzadeh K. The rise of artificial intelligence in healthcare applications. *Artificial Intelligence in Healthcare.* 2020. 25–60 p.
134. Gamba P, Testa G, Gargiulo S, Staurengi E, Poli G, Leonarduzzi G. Oxidized cholesterol as the driving force behind the development of Alzheimer's disease. *Front Aging Neurosci.* 2015;7(JUN):1–21.



Slika 1. Međuzavisnost oksidativnog stresa, inflamacije i neurodegeneracije. Shema preuzeta i izmenjena iz [134].



Slika 2. Leptinski signalni put u oksidativnom metabolizmu i inflamaciji: predložena dualna, neuroprotektivna i proinflamatorna, uloga LEP u patogenezi MS.

Parkinsonova bolest – dokle se stiglo?

Jadranka Miletić Vukajlović¹, Dunja Drakulić²

¹Laboratorija za fizičku hemiju, Institut za nuklearne nauke „Vinča“, Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerzitet u Beogradu, Beograd

²Laboratorija za molekularnu biologiju i endokrinologiju, Institut za nuklearne nauke „Vinča“, Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerzitet u Beogradu, Beograd

Kontakt: jadranka@vin.bg.ac.rs; drakulic@vin.bg.ac.rs

Apstrakt

Parkinsonova bolest (PB) je kompleksno progresivno neurodegenerativno oboljenje sa nerazjašnjenom etiopatogeneom. Odlikuje je, između ostalog, narušena struktura i funkcija komponenti dopaminskog sistema u delu mozga u kome se nalaze centri za izvođenje voljnih pokreta, kogniciju i pamćenje, dok su na ćelijskom nivo karakteristične neuroinflamacija, narušavanje strukture i funkcija mnogih organela uključujući mitohondrije, lizosome ili transportne vezikule, poremećen redoks status, nepravilno savijanje proteina koje uslovljava njihovo neadekvatno funkcionisanje, stvaranje unutarćelijskih depozita različitih supstanci (molekula/jona). Obično se manifestuje kombinacijom niza motornih i nemotornih simptoma, uključujući tremor pri mirovanju, usporenost i osiromašenost pokreta (bradikinezija), ukočenost mišića (rigidnost) ruku, nogu i vrata, gubitak posturalnih refleksa, fleksibilan položaj tela, kao i konstipacija, urinarna disfunkcija, impotencija, poremećaji faza sna, prekomerna dnevna pospanost, nemogućnost gutanja pljuvačke, znojenje, mučnina, anksioznost, apatija, depresija, demencija. Dijagnostikovanje PB se vrši posredno na osnovu prisustva minimum dva motorna simptoma i adekvatan odgovor na antiparkinson terapiju, a sa sigurnošću se potvrđuje tek post-mortem analizama utvrđivanjem postojanja karakterističnih patohistoloških promena u različitim regionima mozga. Kao potencijalni uzročnici njenog nastanka i progresije izdvajaju se genski faktori, faktori spoljašnje sredine, kao i njihovo međusobno delovanje. Iza zovi PB su ne samo nemogućnost ranog uspostavljanja dijagnoze, poteškoće u procenjivanju toka bolesti, identifikacija potencijalnih biomarkera i signalnih puteva koji su uključeni u patogenezu, njihova uloga u kliničkoj prezentaciji bolesti, već i terapija. Iako se ovo hronično oboljenje leči različitim lekovima (farmakoterapija), hirurškim zahvatima, i potpornim, komplementarnim i alternativnim terapijama, ni jedan od navedenih vidova terapije ne omogućava potpuno ozdravljenje već kontrolu simptoma radi što dužeg nezavisnog funkcionisanja obolelih.

Ključne reči: Parkinsonova bolest (PB), etiopatogeneza, kliničke karakteristike, dijagnostika, terapija.

Parkinson's disease – state of the art

Jadranka Miletić Vukajlović¹, Dunja Drakulić²

¹Laboratory for Physical Chemistry, "Vinca" Institute of Nuclear Sciences, National Institute of the Republic of Serbia, University of Belgrade, Belgrade

²Laboratory of Molecular Biology and Endocrinology, "Vinca" Institute of Nuclear Sciences, National Institute of the Republic of Serbia, University of Belgrade, Belgrade

Correspondence: jadranka@vin.bg.ac.rs; drakulic@vin.bg.ac.rs

Abstract

Parkinson's disease (PD) is a complex progressive neurodegenerative disease with uncertain etiopathogenesis. Among others, it is characterized by impaired structure and function of components of the dopamine system in regions of the brain responsible for performing voluntary movements, cognition and memory; neuroinflammation; disruption of structure and function of various organelles including mitochondria, lysosomes or transport vesicles, disturbed redox status, misfolding of proteins, intracellular deposition of various substances (molecules/ions). Usually PD is manifested by a combination of several motor and non-motor symptoms, including resting tremor, slowness of movement and speed (bradykinesia), stiffness of arms, legs and neck muscles (rigidity), loss of postural reflexes, flexible body position, along with constipation, urinary dysfunction, impotence, sleep disorders, excessive daytime sleepiness, inability to swallow saliva, sweating, nausea, anxiety, apathy, depression, dementia. Diagnosing is performed indirectly based on the presence of at least two motor symptoms and an adequate response to antiparkinsonian therapy, while it can be confirmed with certainty only by post-mortem analysis according to the existence of characteristic pathohistological changes in different regions of the brain. In PD pathogenesis the relative contribution of genes, environmental/lifestyle factors, as well as their specific interactions has been recognized. The challenges of PD are not only the impossibility of early diagnosis, difficulties in assessing the course of the disease, the identification of potential biomarkers and signaling pathways involved in pathogenesis, their role in the clinical presentation of the disease, but also the therapy. Although the PD patients are treated with various drugs (pharmacotherapy), surgical interventions, and supportive, complementary and alternative therapies, none of the mentioned types of therapy provide the healing but they enable the control of the symptoms for the longest possible independent functioning of the patients.

Key words: Parkinson's disease (PD), etiopathogenesis, clinical characteristics, diagnosis, therapy.

Uvod

Starenje je složen fenomen koji ne samo da utiče na fizičke i mentalne funkcije čoveka već povećava i rizik od razvijanja mnogobrojnih patoloških stanja koji imaju efekat na celokupan organizam. Najkarakterističnije i najizraženije promene koje su povezane sa bolestima starenja su: gubitak pamćenja, smanjenje kognitivnih sposobnosti i/ili motornih funkcija. Stoga, starenje predstavlja jedan od glavnih faktora rizika za razvoj mnogobrojnih degenerativnih bolesti koje karakteriše progresivni gubitak neurona u centralnom nervnom sistemu (CNS) [1]. Među patofiziološkim promenama koje se javljaju u mozgu tokom starenja, javi i progresiji neurodegeneracije potencijalno doprinose narušen oksidativni status, promene u energetsom metabolizmu, neuroinflamacija, akumulacija proteinskih agregata, disfunkcija neurovaskularnog sistema, aktivacija imunog sistema, i drugo [2].

Neurodegenerativne bolesti pored toga što utiču na kvalitet života pojedinca, utiču i na njihove celokupne porodice i društvo u mnogobrojnim aspektima, kako psihološkim, tako i socijalnoekonomskim [3]. Zbog toga se različitim aspektima neurodegenerativnih bolesti već dugi niz godina bave brojne studije. Rezultati tih istraživanja mogu pružiti potencijalne odgovore o nastanku i progresiji neurodegenerativnih bolesti (poput Parkinsonove bolesti (PB), Alchajmerove bolesti (AB), i amiotrofične lateralne skleroze (ALS), i drugih), kao i o specifičnim biomarkerima za predikciju razvoja bolesti, procenu stanja pacijenata, kao i o onima koji će dati indicaciju pozitivnog odgovora na terapiju [4]. Za lečenje većine bolesti koriste se različite terapijske strategije kojima se samo usporavaju neurodegenerativne promene i kontrolišu simptomi, i koje ne dovode do potpunog oporavka pacijenta. Stoga, identifikacija biomarkera, kao primena novih, efikasnijih terapijskih pristupa (neuroprotektivne terapije ili terapije kojima se bolest modifikuje) bi potencijalno omogućili rano dijagnostikovanje bolesti i poboljšanje kvaliteta života, ozdravljenje obolelih, pa čak bi i predupredili nastanak bolesti [5].

Parkinsonova bolest: klinička slika i dijagnostikovanje

Parkinsonizam predstavlja grupu neuroloških, motoričkih poremećaja koja se prepoznaje po kombinaciji niza simptoma uključujući tremor pri mirovanju, usporenost i osiromašenost pokreta (bradikinezija), ukočenost mišića ruku, nogu i vrata (rigiditet), semifleksioni stav tela, poremećaj ravnoteže, motornu blokadu pri kretanju, izostanak mimike lica (hipomija), i ostalo [6]. Pored ovih simptoma kod većeg broja obolelih tokom vremena razvija se i depresija, a kod trećine javlja se i intelektualno propadanje.

Na osnovu porekla i uzroka nastanka, razlikuje se:

- idiopatska ili primarna Parkinsonova bolest (PB);
- nasledni odnosno hereditarni parkinsonizam koji se javlja kod 10-15% obolelih;
- stečeni ili sekundarni parkinsonizam nastaje kao posledica dejstva nekog od poznatih faktora poput traume glave usled čega se, na primer, stvara subduralni hematoma koji pritiska pojedine regione mozga i dovodi do trajnih oštećenja; hidrocefalusa; strukturnih lezija mozga usled tumora, infarkta koji je zahvatio mezencefalom ili bazalne ganglije; trovanja manganom i ugljen monoksidom; upotrebe i zloupotrebe različitih lekova (na primer, antipsihotika fenotiazina, tioksantena, butirofenona ili rezerpina, koji blokiraju dopaminergičke receptore); poremećaja metabolizma, ateroskleroze, encefalitisa koji zahvata bazalne ganglije, i drugo;
- atipični parkinson sindrom u kome je parkinsonizmu pridružen i niz drugih neuroloških poremećaja uključujući i poremećaje pokretljivosti bulbusa, amiotrofiju, ranu demenciju, rane autonomne poremećaje;
- parkinsonizam u okviru heredo-degenerativnih bolesti kao deo složenije kliničke slike.

Parkinsonova bolest je progresivno neurodegenerativno oboljenje CNS sa globalnom rasprostranjenosti većom od šest miliona ljudi, što je izdvaja kao jednu od vodećih neuroloških poremećaja [7]. Iako su bolest i veći broj simptoma opisani pre više od 2 veka od strane dr Džejmsa Parkinsona (*James Parkinson*), njena tačna etiologija nije u potpunosti poznata. Starenje i ćelijski procesi vezani za starenje izdvajaju se kao glavni rizici za njeno dobijanje i progresiju [8]. Osim toga, neidentifikovani patogen (virus ili bakterija) u crevima, prema Braak-ovoj hipotezi [9,10], odgovoran je za pojavu premotorne faze bolesti i formiranje patoloških promena u mozgu, takozvanih, Levijevih telašaca (LT) i Levijevih neurita (LN) u predilekcionim mestima, a koje se šire ka olfaktornom traktu i vagalnim nervima prema i unutar CNS.

U najvećem broju slučajeva PB se javlja sporadično, mada na njeno dobijanje i progresiju može imati uticaj i genetička predispozicija, kao i uticaj spoljašnjih faktora uključujući izloženost toksičnim i infektivnim supstancama (na primer pesticidi, zagađena voda, i drugo) [11,12]. Iako se može javiti u svim životnim dobima, pretežno je bolest muške, starije populacije jer se češće javlja u šestoj i sedmoj deceniji života kod muškaraca (odnos muškarci žene 3:2) [7,13].

Kod većine PB pacijenata ispoljavanje motornih i/ili nemotornih simptoma je individualno, postepeno i asimetrično, i može zavisiti od samog toka bolesti [14]. Za najraniji stadijum PB karakteristično je asimetrično ispoljavanje motornih simptoma koji su teško prepoznatljivi i nekada se javljaju i godinama ranije poput motornih simptoma (tremor mišića, bradikinezija, rigidnost, promene u hodu, i ostali). Na početku bolesti, tremor mišića je maksimalan u stanju mirovanja i postaje izraženiji kod emocionalnog uzbuđenja i/ili umora, dok se u pokretu smanjuje, a u snu nestaje. Tremorom su najjače zahvaćene šake, ruke i noge, pa mišići vilice, usana, očnih kapaka i čela. Razlikuje se [15]: *posturalni tremor*, koji se javlja u antigravitacionom položaju; *akcioni (kinetički) tremor* koji se javlja isključivo prilikom pokreta određenog dela tela; i *tremor u mirovanju* koji je najkarakterističniji simptom PB [16]. Tremor u mirovanju se javlja asimetrično, i to prvo u gornjim ekstremitetima, a kako bolest napreduje, može zahvatiti i ostale ekstremitete, usne, vilicu i jezik, a izuzetno retko vrat i glavu. Bradikinezija je karakterističan simptom svih obolelih, nepoznate patofiziologije [17]. Rigidnost se javlja kod više od 90% PB pacijenata i obično se ispoljava na strani tela koju bolest inicijalno zahvata, a koja je već zahvaćena bradikinezijom i tremorom. Karakteriše ga povišen tonus agonističkih i antagonističkih mišića [9,18,19], skraćeno vreme njihove relaksacije čime se ograničava obim pokretanja udova i javlja se nelagodnost, ali i bol. Eksperimentalni podaci ukazuju da na pojavu rigiditeta jedne strane tela utiču promene u suprotnoj hemisferi mozga i narušena kontrola motornih impulsa i petlji [9,18,20,21].

U ranoj fazi PB javljaju se i nemotorni simptomi (konstipacija, urinarna disfunkcija, impotencija, poremećaji REM faze sna, prekomerna dnevna pospanost, nemogućnost gutanja pljuvačke, znojenje, mučnina, anksioznost, apatija, depresija, demencija, i drugi) [22,23]. Gubitak čula mirisa (hiposmija) je jedan od najkarakterističnijih i vrlo čestih simptoma PB, koji se može ispoljiti i nekoliko godina pre zvanične dijagnoze [7,23,24], dok se gastrointestinalni problemi javljaju čak kod više od polovine pacijenata i deceniju pre ispoljavanja prvih motornih simptoma [7,25]. Na početku bolesti oboleli mogu izgledati i depresivno zbog usporenih i smanjenih pokreta mišića lica. Napredovanjem bolesti tremor može postati manje izražen, a ispoljavaju se i dodatni motorni simptomi koji obolelima otežavaju izvršavanje radnji/pokreta kao što su ustajanje i okretanje u krevetu, oblačenje, uključujući zakopčavanje dugmadi i vezivanja pertli [26]. Postepeno, lice im postaje hipomimično poput maske, s karakterističnim položajem usta i smanjenim treptanjem, dok im je govor hipofoničan i monoton zbog poremećaja artikulacije. Kod mnogih PB pacijenata javlja se i rigiditet bez tremora, sa čijim napredovanjem usled bolova u mišićima i osećaja umora pokreti se teško započinju (akinezija), postaju smanjeni (hipokinezija) i sporiji (bradikinezija). Sa progresijom bolesti brzina i amplituda jednostavnih, repetitivnih pokreta se smanjuju do njihovog potpunog gubitka [27]. S odmicanjem

bolesti, javlja se posturalna nestabilnost koju karakteriše pogrbljeno držanje tela ka napred sa savijenim donjim ekstremitetima u kolenima, sve teže započinjanje kretanja, otežano okretanje i zaustavljanje, nesiguran hod sa sitnim koracima, posrtanje, ubrzavanje i naginjanje usled gubitka posturalnih refleksa, flektirane ruke uz telo bez njihanja pri hodaњу, i drugo. Posturalna nestabilnost se obično javlja u uznapređenoj fazi bolesti i predstavlja jedan od najtežih simptoma. Narušeno pravilno držanje tela, njegova nestabilnost izražena sklonost ka padovima i gubitak samostalnosti kod ovog simptoma povezuje se sa značajnim gubitkom holinergetičkih neurona [27,28,29]. Osim toga, vrlo često se javljaju i poteškoće sa gutanjem i aspiracijom hrane. Usled hipokinezije i smanjene kontrole distalne muskulature manifestuje se i progresivna mikrografija (pisanje sitnim slovima) i znatno se otežava izvođenje mnogih svakodnevnih rutinskih aktivnosti.

Pacijenti sa PB mogu se klasifikovati na osnovu kliničke slike i ispoljavanja motornih simptoma u četiri kategorije [30-32]. U prvu kategoriju spadaju mlađe osobe kod kojih se bolest razvija sporije i koje odlikuje niži stepen kognitivnih oštećenja, ali veće fluktuacije u razvoju motornih simptoma, najverovatnije zbog dužine trajanja antiparkinson terapije. Drugu kategoriju čine pacijenti sa izraženim tremorom, sporijom progresijom bolesti i izraženim komplikacijama tokom terapije zbog lošijeg odgovora na levodopu (L-dopu). U trećoj kategoriji su pacijenti kod kojih tremor nije dominantni motorni simptom, koji imaju sporiju progresiju bolesti i slabije komplikacije tokom terapije, ali i lošiji odgovor na antiparkinson terapiju. Poslednjoj kategoriji pripadaju pacijenti bez kognitivnih oštećenja, ali kod kojih se bolest brzo razvija.

Iako postoje mnogobrojne skale na osnovu kojih se procenjuje stepen motornih oštećenja i invaliditeta kod PB pacijenata, najčešće korišćena je H&Y (Hoehn i Yahr) skala [33], kojom se grubo određuje progresija bolesti i kojom se mogu porediti grupe PB pacijenata. Ova skala je u rasponu od 0 do 5. *Stadijumom 0* se opisuje PB pacijent koji nema znakove bolesti. *Stadijum 1* podrazumeva sam početak bolesti u kom se javlja jednostrana i aksijalna zahvaćenost tela, dok u *stadijumu 2* simptomi zahvataju obe strane tela bez poremećaja ravnoteže. Blaga do umerene obostrane zahvaćenosti tela i posturalna nestabilnost klasifikuje PB pacijenta u *stadijumu 3*, a stanje kada su simptomi sve izraženiji i PB pacijenti sve onesposobljeniji, ali sa mogućnošću samostalnog hoda i stajanja karakteriše *stadijum 4*. *Stadijum 5* podrazumeva da PB pacijent ne može da vodi brigu o sebi, zavisi od tuđe pomoći, vezan je za kolica ili krevet [27,34,35].

Dijagnostikovanje PB se vrši posredno, klinički od strane neurologa. Neuroradiološke metode poput CT skenera i magnetne rezonance ne mogu se samostalno koristiti za postavljanje dijagnoze PB, već se one koriste u kombinaciji sa kliničkom slikom pacijenta, i anamnezom koja podrazumeva informacije o povredi glave, hidrocefalusu, moždanom udaru, terapiji koju pacijent uzima, izloženosti toksinima, tipičnim i atipičnim neurološkim i drugim simptomima i znakovima ili postojanju druge neurodegenerativne bolesti, i ostalo. Osim toga, koriste se i dijagnostičke metode kao što su dopaminski transporter-SPECT, meta-jodobenzilgvanidin-SPECT, fluorodeokiglukoza PET, transkranijalni ultrazvuk, genetičko testiranje [7] i testiranje uzoraka različitog porekla (krv, cerebrospinalna tečnost (CSF), i drugo) mnogobrojnim laboratorijskim i eksperimentalnim metodama [36].

Sa sigurnošću PB se dijagnostikuje tek post-mortem na osnovu karakterističnih patohistoloških promena u različitim regionima mozga [37,38]. Za postavljanje dijagnoze PB danas najčešće u upotrebi je revidirana verzija dijagnostičkih kriterijuma *UK Parkinson's Disease Society Brain Bank Research criteria*, UK, London [39], kojom se utvrđuje prisustvo minimum dva od četiri glavna motorna simptoma (tremor, rigiditet, bradikinezija i posturalna nestabilnost), kao i adekvatan efekat antiparkinson terapije. Ukoliko se ne ispunjavaju navedene karakteristike, onda postoji mogućnost da to nije idiopatska PB već neki drugi oblik parkinsonizma [15]. Dijagnostikovanje PB u ranoj fazi je, generalno, problematično s obzirom da celokupna klinička

slika nije ispoljena, kao i u atipičnim slučajevima kada se znaci i simptomi preklapaju sa drugim „parkinsonizam plus” sindromima. Stoga, za dijagnostikovanje PB primenjuju se i, takozvane, crvene zastavice kojima se proverava postojanje više neisključujućih kliničkih odlika koje su karakteristične i za druge bolesti i kojima se postavlja potencijalno alternativna dijagnoza [7].

Parkinsonova bolest: etiopatogeneza

Za obolele od PB karakteristične su promene u ćelijama različitih regiona mozga poput neuroinflamacije, oksidativnog stresa (OS), stvaranja unutarćelijskih depozita različitih supstancija (molekula/jona), narušavanja sinaptičkog transporta, struktura i funkcija mnogih organela uključujući mitohondrije, lizosome ili transportne vezikule, nepravilnog savijanja proteina koje uslovljava njihovo neadekvatno funkcionisanje, i ostalo [5]. Te promene, između ostalog, odgovorne su za: smanjenu osetljivost receptora za dopamin (DA) u strijatumu, poremećeno pražnjenje dopaminergičkih sinapsi, progresivnu degeneraciju dopaminergičkih neurona jedne od bazalnih ganglija mozga – kompaktnog dela crne supstancije (lat. *substantia nigra pars compacta*, SNpc), pojavu lezija nigrostrijalnih projekcija, narušavanje strukture i funkcije samog strijatuma, i drugo [40]. U najvećoj meri, DA se sintetiše u neuronima CNS i pored toga što predstavlja prekursor za sintezu noradrenalina, može imati ulogu i neurotransmitera jer se skladišti u vezikulama, transportuje do pre-sinaptičke membrane i oslobađa procesom egzocitoze u sinaptičku pukotinu gde se vezuje za odgovarajuće receptore na postsinaptičkim membranama okolnih neurona i/ili se vezuje za receptore na membrani ćelije u kojoj je sintetisan [40]. Brojne studije ukazuju da se smanjena sinteza, transport, izlučivanje i vezivanje DA za odgovarajuće receptore može nadomestiti medikamentima [41,42]. Promene obično nastaju i razvijaju se godinama i decenijama pre ispoljavanja prvih kliničkih znakova bolesti. Prvi znaci ispoljavanja PB javljaju se, obično, po narušavanju preko 50% nigrostrijalnog dopaminergičkog sistema i po smanjenju sinteze, transporta i otpuštanja DA za više od 70%. Posledično, propadanje dopaminergičkog sistema izdvaja se kao uzrok pojave Levijeve patologije (LT i LN) i ispoljavanja simptoma kod idiopatske PB [43-45]. Osim toga, nastanak i progresija PB povezuje se i sa agregacijom α -sinukleina. Iako do sada nije u potpunosti definisana uloga α -sinukleina u fiziološkim stanjima osim u očuvanju integriteta DNK molekula [46], regulaciji stabilnosti membrane i/ili transporta neurotransmitera [47], literaturni podaci ukazuju na vezu mutacije nje-govog gena, kao i abnormalnog nagomilavanja sa pojavom različitih ćelijskih poremećaja, kao što su oštećenja mikrotubula, strukturne i funkcionalne promene sinapsi i mitohondrija, narušeni redoks status, proteazomski i lizozomski putevi, i ostalo [48,49]. Posledica agregacije α -sinukleina je formiranje LT [50], primarno u moždanom stablu (jedru vagusu i olfaktornom nervu) [51] i ispoljavanje prvih nemotornih simptoma. Povećana agregacija LT u drugim moždanim strukturama karakteristična je za kasnije faze bolesti i pojavu motornih simptoma. Međutim, nepoznanica vezana za agregaciju α -sinukleina jeste da li sama agregacija predstavlja osnovni uzrok ili posledicu PB, karakteristiku fiziološkog starenja, odbrambenu reakciju organizma na stanje u kome se nalazi ili reakciju organizma na neidentifikovani patogen [52-54].

Iako etiologija PB nije u potpunosti razjašnjena, kao predikatori rizika za njenu pojavu izdvajaju se genetički faktori [55-58], faktori spoljašnje sredine [59], ali i njihovo međusobno delovanje. Literaturni podaci ukazuju da su u 5-10% slučajeva za pojavu PB odgovorne promene na više od 30 hromozomskih regiona i šest gena (*ATP13A2*, *DJ1*, *LRRK2*, *PINK1*, *PRKN* i *SNC*) koji kodiraju proteine neophodne za, na primer, pražnjenje vezikula, kontrolisanje koncentracije Fe^{2+} , normalan metabolizam mitohondrija, održavanje nivoa glukoze u krvi [58,60], ali pre svega za normalno funkcionisanje komponenti dopaminskog sistema. Upravo, pojava naslednog oblika PB je u određenoj meri spregnuta sa promenama navedenih gena i proteina [55-57]. Pored genetičkih faktora, pokazano je i da mnogobrojni faktori spoljašnje sredine mogu povećati rizik za nastanak

i progresiju PB [59] uključujući izloženost pesticidima [59], taloženje teških metala (gvožđe, bakar, cink, olovo, aluminijum i mangan) u neuronima bazalnih ganglija [61]. Dok su rezultati nekih studija pokazali da PB može nastati i usled uticaja spoljašnjih faktora na ekspresiju pojedinih gena [62].

Pored pomenutih faktora, povećana ekspresija hemokina i citokina kao odlike neuroinflamacije, praćene visokim nivom i taloženjem gvožđa u ćelijama SNpc i remećenjem ćelijske homeostaze, mogu dovesti do pojave OS usled narušavanja ciklusa nastajanja/uklanjanja slobodnih radikala, malih reaktivnih vrsta (jona, atoma i molekula) kao što su reaktivne kiseonične vrste (RKV), reaktivne azotne vrste (RAV), i druge [63,64]. Slobodni radikali mogu stupiti u interakcije sa okolnim biomolekulima (lipidi, proteini i nukleinske kiseline) i izazvati njihova oštećenja koja rezultiraju ćelijskom disfunkcijom, i na kraju ćelijskom smrću [65]. Tako na primer, RKV/RAV mogu direktno ili indirektno reagovati sa aminokiselinama, od kojih su najosetljivije cistein i metionin, i dovesti do strukturnih i funkcionalnih promena proteina. Pored proteina, slobodni radikali modifikacijom svih komponenti nukleinskih kiselina i uzrokuju mnogobrojna genetska oštećenja [66-71]. Dok oksidativna oštećenja lipida odnosno lipidna peroksidacija (LPO) podrazumeva reakciju slobodnih radikala sa polinezasićenim masnim kiselinama – PNMK (eng. *polyunsaturated fatty acids*, PUFAs) koje ulaze u sastav, između ostalih i, fosfolipida (PL) gradivnih molekula membrana. Oksidacijom PNMK narušava se integritet ćelijske membrane, ali i membrana ćelijskih organela, oslobađaju se hidrolitički enzimi, a samim tim narušava se i funkcionisanje i opstanak ćelije [67]. Treba istaći da se u procesu LPO formiraju i lipidni radikali koji dalje uzrokuju nove oksidativno-kaskadne reakcije, a nastali produkti mogu ispoljiti akutne toksične efekte i sprečiti proliferaciju [72], ali mogu se ponašati i kao sekundarni glasnici u mnogim ćelijskim procesima, uključujući i unutarćelijski prenos signala, modulaciju aktivnosti određenih enzima, transkripcionih faktora, i ostalo [73-76]. Najznačajniji produkti LPO su kratko lančani produkti:

- 4-hidroksinonenal (HNE) – toksični, lipidni aldehid [77] koji zbog lakog stupanja u interakcije sa okolnim biomolekulima može suprimirati mitohondrijalnu respiraciju, aktivnost glikolitičkih enzima, i proteinsku sintezu, uticati na metabolizam lipoproteina, regulisati promene na sestrinskim hromatidama, usloviti DNK fragmentaciju, formiranje mikronukleusa, imati genotoksični efekat, narušiti proliferaciju, diferencijaciju i preživljavanje ćelija [78-83]. U interakciji sa presinaptičkim proteinom α -sinukleinom pokreće se njegova modifikacija i agregacija u α -sinuklein fibrile koje uzrokuju gubitak dopaminergičkih neurona i neurodegeneraciju u PB [84];
- malondialdehid (MDA) – stabilniji i membranski permeabilniji molekul u poređenju sa HNE [77,85]. Između ostalog, ponaša se kao sekundarni glasnik u brojnim signalnim kaskadama [86,87].

Odgovor ćelije na ove promene zavisi od stepena toksičnog stanja u kom se nalazi. Tako na primer, u subtoksičnim uslovima, aktiviraju se *komponente antioksidativne (AO) odbrane* odnosno antioksidansi pomoću kojih ćelija teži da neutrališe, ukloni prekomerno nastale slobodne radikale i/ili ublaži njihove efekte. Antioksidansi se mogu definisati kao vrste, prisutne u ćeliji u maloj koncentraciji u odnosu na oksidujuće molekule, koji značajno umanjuju ili inhibiraju oksidaciju biomolekula. Dele se na: *antioksidanse primarne linije odbrane (enzimske)* ključne u procesima razlaganja i uklanjanja slobodnih radikala, koji uključuju: superoksid dizmutazu (SOD), katalazu (CAT), glutation peroksidazu (GPx), glutation-reduktazu (GR), glutation S-transferazu (GST), i ostale; *antioksidanse sekundarne linije odbrane (ne-enzimske)* čine vitamini A, C i E, glutation (GSH), koenzim Q, i drugi, koji doniranjem elektrona slobodnim radikalima ih prevode u manje štetne i time se oni lakše neutrališu; *antioksidanse treće linije odbrane (reparacione)* – *de novo* enzimi koji posebnim mehanizmima vrše reparaciju i uklanjanje oštećenih biomolekula, poput komponenti DNK enzimskog reparacionog sistema i proteolitičkih enzima; *antioksidanse četvrte linije odbrane (atraktante)* čine signalni molekuli koji u prisustvu slobodnih radikala pokreću sintezu i transport drugih antioksidanasa do mesta delovanja

[88]. U toksičnim uslovima (srednji i visoki nivo OS) reparacioni sistem ne može adekvatno da odreaguje [88-93], pokreću se nishodne signalne kaskade koje za posledicu mogu imati inicijalizaciju smrti ćelija i razvoj različitih patoloških stanja karakterističnih za starenje [88-97]. Upravo, uloga navedenih komponenti OS i AO odbrane je prepoznata u neurodegenerativnim fiziološkim i mnogim patofiziološkim stanjima, poput starenja, PB, AB, VaD (vaskularna demencija), ALS, moždanog udara, traumatske povrede mozga (TPM) [98-101].

U mozgu se visok nivo slobodnih radikala i oštećenja biomolekula javlja zbog visokih metaboličkih zahteva moždanog tkiva za kiseonikom i nutritivnim supstratima, uključujući glukozu, koju je moguće detektovati različitim metodama [102-104]. Takođe je povećana količina nezasićenih masnih kiselina. Prisutan je i visoki nivo gvožđa, ali i njegov relativno niski redukujući kapacitet za regeneraciju u odnosu na druga tkiva i organe. Njegova katalazna aktivnost je u mozgu znatno niža u odnosu na ostale organe, pri čemu OS vodi do narušavanja strukture i funkcija kako neuronskih tako i vaskularnih ćelija [105].

Literaturni podaci ukazuju da je kod PB pacijenata metabolizam DA u različitim regionima mozga poremećen usled OS i:

- narušenog nivoa oksidacije DA enzimima monoamin oksidaza A i B (MAO A i MAO B) koji ga prevode do neurotoksičnog aldehida [106];
- pokretanja procesa autooksidacije DA i povećane produkcije reaktivnih kinona koji nishodno interaguju sa okolnim molekulima i dovode do njihovih oksidativnih oštećenja. Na ovaj način prekomerno nastali i neadekvatno uklonjeni kinoni imaju toksični uticaj na mitohondrije i u najvećoj meri doprinose njihovoj disfunkciji koja pogoršava OS u dopaminergičkim neuronima [107].

Humane studije, na primer, ukazuju na povećan nivo produkata LPO – MDA u plazmi [108,109,110] i u SNpc obolelih od PB [111], kao i HNE i HNE – protein produkata u plazmi [109,110,112], CST [113,114], neuronima [115-117], LT [118] i dopaminergičkim ćelijama SNpc, koji doprinose progresiji bolesti [119]. Pored nivoa MDA i HNE u plazmi PB pacijenata pokazano je i da drugi indikatori OS, uključujući i PAB (prooksidativni-antioksidativni balans) i AOPP (produkti oksidovane modifikacije proteina, eng. *advanced oxidation protein products*) mogu ukazati na povećan intenzitet OS i pojavu kliničke manifestacije bolesti [109,110,120]. Fluktuacije nivoa PAB, AOPP, MDA i HNE u plazmi PB pacijenata mogu se povezati i sa kliničko-patološkim karakteristikama obolelih, kao što su starost, pol, dužina bolesti i stadijum bolesti prema H&Y skali [109,110,120]. Tako na primer, pol pacijenata je u vezi sa nivoom PAB i produkata LPO(MDA i HNE); H&Y stadijum bolesti sa nivoom MDA i PAB; dok je starost PB pacijenata bitna za nivo PAB. Rezultati navedenih istraživanja potvrđuju da se ova progresivna neurodegenerativna bolest češće javlja kod individua muškog pola nego kod ženskih osoba, iste starosne dobi [109,110,120], najverovatnije zbog protektivnog dejstva ženskih polnih hormona koji mogu odložiti ne samo početak bolesti, već i njenu progresiju [121]. Pokazana je i veza ranijeg ulaska u menopauzu usled smanjenja nivoa estrogena i njegove deprivacije sa povećanim rizikom nastajanja PB kod individua ženskog pola [122,123]. Paralelno, uočeno je da se intenzitet OS povećava sa porastom kako stadijuma bolesti tako i starosti obolelih, što može biti posledica napredovanja bolesti usled prekomernog nastanka slobodnih radikala. Poremećenu oksidativnu ravnotežu opisuje i pozitivna korelacija između starosti i MDA, što dodatno ukazuje da sa godinama PB pacijenata raste i OS [109,110,120]. Osim toga, i modulacija aktivnosti SOD, jedne od enzimskih komponenti AO odbrane, praćena smanjenom koncentracijom ne-enzimskog parametara AO odbrane, GSH, povezuje se sa povećanjem intenziteta OS u plazmi PB pacijenata u odnosu na zdrave ispitanike [109,110,120]. Pozitivna korelacija GSH sa AOPP dodatno sugerise na poremećen status AO zaštite i oksidativne ravnoteže. Dok povećanje aktivnosti CAT može predstavljati kompenzatorni mehanizam zaštite organizma od OS [109,110,120]. Post-mortem histopato-

loške analize moždanog tkiva PB pacijenata potvrdile su promene nivoa GSH u SNpc, kao i u dopaminergičkim neuronima ove moždane regije [124,125], kao i povećanu proteinsku i DNK oksidaciju i/ili nitraciju, narušenu aktivnosti SOD i nivo jona Fe^{2+} [126]. Osim toga, treba ukazati i na nezavisnost raspodele niskih, srednjih i visokih vrednosti pojedinih enzimskih komponenti AO odbrane od kliničko-patoloških karakteristika [109,110,120], čime je pokazano da promene tih parametara zavise isključivo od same pojave PB i povećanja intenziteta OS, a ne od progresije bolesti, kao ni od pola i starosti PB pacijenata. Pozitivna korelacija između dužine trajanja bolesti i GSH ilustruje modulaciju ne-enzimske komponente AO zaštite, i sugeriše na viši intenzitet OS [109,110,120].

Među najzastupljenijim vrstama lipida identifikovanim u CNS su holesterol, PL i sfingolipidi (SL), koji ulaze u sastav membrana, mogu biti energetske depoi, ali i signalni molekuli neophodni za normalno odvijanje mnogih procesa poput sinaptičke transdukcije, transdukcije signala između različitih organela, regulacije ekspresije gena, i drugog [127]. Narušen metabolizam lipida povezuje se sa pojavom i progresijom mnogih bolesti, kao što su kancer, dijabetes, arteroskleroza, kao i sa neurološkim i neurodegenerativnim oboljenjima, uključujući i PB [128-135]. Rezultati nekoliko studija ukazuju da je metabolizam dokosaheksainske kiseline (DHK), jedne od ključnih PNMK, izmenjen kod obolelih od PB, ali i u drugim neurodegenerativnim bolestima [133-135]. Sa druge strane, diacilglicerolom (DAG)-posredovana transdukcija može imati uticaj na dugotrajnu potencijaciju, rast dendrita, sazrevanje trnčica, što se povezuje sa narušavanjem pažnje i memorije [136-138], dok je metabolizam mnogih SL i PL narušen usled nedostatka apolipoproteina E [139]. Proučavanje rizika za razvoj PB povezuje se sa dislipidemijom [140], nivoom ukupnog holesterola (UH), kao i holesterola u lipoproteinskim česticama niske gustine (LDL-C) [141-143], odnosno između holesterola u lipoproteinskim česticama visoke gustine (HDL-C) i dužine trajanja PB [144]. Dodatno, pokazano je da se sa neurodegeneracijom mogu povezati akumulirani produkti LPO i modifikovani sastav/odnos PL poput fosfatidilholina (PC) i lizofosfatidilholina (LPC) i drugih, koji se ponašaju kao sekundarni glasnici, ali ulaze i u sastav membrana i koji su odgovorni za promene njihove fluidnosti i propustljivosti [120,128,145]. Naime, utvrđeno je da kod neurodegenerativnih oboljenja značajno se menja nivo LPC u plazmi [146]. Narušeni lipidni profil potvrđen je i u nekolicini prethodnih studija u kojima su pronađeni viši nivoi pojedinih LPC (na primer, LPC 16:0 i LPC 18:1) u parkin-mutiranim fibroblastima [147] i njegov negativan efekat u dopaminergičkom sistemu [130,148], smanjen nivo PC u plazmi, čeonom režnju, SNpc PB pacijenata [149,150], kao i u animalnim modelima bolesti [151]. Što se tiče odnosa intenziteta PL pikova, PC i LPC, u plazmi PB pacijenata u poređenju sa zdravim ispitanicima, pokazano je da se i on menja [120,128]. Ovaj odnos može poslužiti za povezivanje narušenog lipidnog profila obolelih sa povećanim intenzitetom OS i promenjenim statusom AO odbrane. Dok odsustvo razlika odnosa intenziteta pikova u plazmi obolelih od PB u različitim stadijumima bolesti, i sa različitom dužinom trajanja bolesti, upućuju da je izmenjeni lipidni profil pacijenata odlika same bolesti kada je struktura i funkcija većine DA neurona u SNpc već narušena, a bolest u poodmaklim stadijumima [120,128]. Na osnovu svega navedenog, ne samo nivo PC i LPC, već i njihov odnos PC i LPC može se iskoristiti kao marker promene lipidnog profila i rekonfiguracije lipida kod obolelih od različitih neurodegenerativnih bolesti, uključujući i PB.

Parkinsonova bolest: terapija

U lečenju PB koriste se lekovi (farmakoterapija), hirurški zahvati, i potporne, komplementarne i alternativne terapije. S obzirom da se ni jednim tretmanom ne ostvaruje ozdravljenje obolelog od PB, glavni cilj navedenih terapija je da se pacijentu, kontrolom simptoma, omogući da što duže nezavisno funkcioniše. Treba istaći da se u lečenju PB pacijenata primenjuje personalizovan terapijski pristup s obzirom da se kod

njih javljaju jedinstvene kombinacije motornih i nemotornih simptoma, ali i odgovora na terapiju, kao i niz društvenih, profesionalnih i emocionalnih problema koje treba rešiti [5,152].

Farmakoterapija podrazumeva korišćenje lekova kojima se dopunjava ili povećava koncentracija DA u pojedinim regionima mozga; reguliše nivo drugih supstanci odnosno molekula u mozgu, kao što su neurotransmiteri, koji prenose informacije između moždanih ćelija; na neki drugi način pomaže kontroli simptoma, i drugo. U početku, PB se u većini slučajeva može lečiti jednim lekom (monoterapija), dok se sa progresijom bolesti obično uvode novi lekovi sa drugačijim mehanizmom dejstva (politerapija) [153]. Lekovi su se pokazali veoma korisnim u početku, ali efikasnost često opada s vremenom. Razlikuju se: simptomatske terapije (simptomatske terapije motornih simptoma i simptomatske terapije za L-dopa rezistentne i nemotorne simptome) i neuroprotektivne terapije ili terapije koje modifikuju bolest.

Simptomatske terapije podrazumevaju dva tipa terapija:

a) *Simptomatske terapije motornih simptoma* – terapije metaboličkim prekursorom DA (L-dopa), agonistima DA, antiholinergijskim agensima, antiglutamatergijskim agensima, inhibitorima MAO-A i MAO-B, inhibitorima katehol-O-metil transferaze (KOMT), agonistom adenozienskog A2 receptora, i druge [5].

L-dopa se smatra zlatnim standardom u lečenju PB [154]. Aktivnim transportom prenosi se do dopaminergičkih neurona SNpc i pomoću enzima dopa-dekarboksilaze prevodi se u DA [155]. Međutim, iako prolazi krvno-moždanu barijeru (KMB) u dopaminergičke neurone dospeva manje od 5%. Zbog toga se kao dodatna terapija obično koriste inhibitori dekarboksilaze, kojima se blokira rad enzima van mozga i čime se omogućava da više od 10% L-dope ipak stigne do mozga [156]. S obzirom da dugotrajno korišćenje L-dope može dovesti do određenih motornih komplikacija, obično se sa L-dopa koriste i dopa dekarboksilazni inhibitori, inhibitori MAO-B i KOMT, kao i agonisti DA [157-159]. Generalno, L-dopa ima dobar efekat na regulisanje motornih simptoma i najveći potencijal ispoljava u prvim godinama od početka korišćenja [204] zbog čega se preporučuje što duže odlaganje njene upotrebe, postepeno povećavanje doze i učestalosti primene [5,160].

Agonisti DA poboljšavaju mobilnost i smanjuju diskinezu direktno stimulišući receptore za DA. U plazmi imaju duži poluživot u odnosu na L-dopu. Mogu se koristiti kao monoterapija za motoričke simptome; pomoćna terapija kada simptomi nisu dovoljno dobro kontrolisani L-dopom; kada su prisutne motoričke fluktuacije u ranijim fazama bolesti i kod pacijenata kod kojih se bolest javila u mlađoj životnoj dobi. Neki od neželjenih efekata su halucinacije, pospanost, edem nogu, ali i promene u ponašanju kao na primer kompulzivna kupovina i jedenje, hiperseksualnost [161-165].

Antiholinergijski agensi smanjuju tremor tako što sprečavaju vezivanje acetilholina za muskarinske receptore u strijatumu. Nemaju efekte na bradikineziju. Kao nuspojave korišćenja ovih lekova javljaju se kognitivni poremećaji, konfuzija, halucinacije, zamagljen vid, konstipacija, i drugo [5].

Antiglutamatergijski agensi poboljšavaju diskineziju i motorne fluktuacije jer reaguju kao antagonisti glutamatskih/NMDA (N-Metil-D-Aspartat) receptora, stimulišu oslobađanje DA iz endogenih depoa, blokiraju ponovno preuzimanje DA iz sinaptičkih pukotina, ispoljavaju antiholinergična svojstva. Njihova primena može dovesti do vizuelnih halucinacija, perifernog edema i vrtoglavica [166].

Inhibitori MAO-A i MAO-B najčešće se koriste kao terapija ranih i blagih oblika PB, kao i kod pacijenata sa umerenom PB koji imaju motoričke komplikacije zbog korišćenja L-dopa. Ova grupa lekova smanjuje ponovno preuzimanje DA i smanjuje oslobađanje glutamata blokiranjem odgovarajućih jonskih kanala [167].

Inhibitori KOMT regulišu degradaciju L-dope u perifernim sistemima, kao i L-dope i DA u CNS. Pokazano je da produžavaju efekte L-dope i zato se često upotrebljavaju kao pomoćni lekovi za pacijente sa fluktuacijama motorike povezane sa L-dopom. Iako se generalno dobro tolerišu, njihova upotreba može povećati diskinezije povezane sa L-dopom, izazvati probleme sa organima za varenje, posturalnu hipotenziju, i ostalo [168,169].

Agonist adenozienskog A2 receptora koristi se kao dodatni tretman kod PB pacijenata na L-dopi/karbidopi sa „off“ epizodama. U većini slučajeva pokazao se kao visoko toleribilni lek, koji može izazvati neke neželjene efekte poput halucinacija, nesanice, diskinezije, vrtoglavice, i konstipacije [170].

b) Simptomatske terapije za L-dopa rezistentne i nemotorne simptome primenjuju se u lečenju L-dopa rezistentnih simptoma (dizartrije, disfagije, zamrzavanja hoda, posturalne nestabilnosti, disautonomije, iznenadne nepokretnosti stopala, blefarospazma, apraksije otvaranja kapaka, seboreje, hiperhidroze, prekomerno aktivne bešike, konstipacije, i drugih), kao i nemotornih simptoma (depresije, anksioznosti, apatije, psihoze, disfunkcije kontrole impulsa, kognitivnih oštećenja, demencije, autonomne disfunkcije, nesanice, olfaktorne disfunkcije, boli, umora, i ostalih). Podrazumevaju injeciranje toksina botulina, korišćenje inhibitora holinesteraze (donepezil i rivastigmin), agoniste NMDA receptora (memantin), atipičnih antipsihotika (kvetiapin i klopazin), i druge [5].

Neuroprotektivne terapije ili terapije koje modifikuju bolest – potencijalno neuroprotektivne strategije koje kada se primene dovoljno rano povoljno utiču na napredovanje bolesti. Do sada su testirani efekti inhibitora MAO-B ili inhibitora monoamin oksidaze (MAOI) (selegilin, rasagilin), tokoferola (vitamin E), monoklonalnih antitela na α -sinuklein, imunizacije na α -sinuklein, antiagregacionih lekova, agonista receptora za glukagonu-slični peptid 1, GBA ili LRRRK2 modifikatori (ambroksol hidroklorid, DNL201 ili DNL151) [5]. Iako je proteklih godina predloženo više različitih pristupa, ni jedan nije u potpunosti usvojen.

Treba istaći da brojne farmakološke studije u kojima su se pratili efekti različitih medikamenata i njihove kombinacije pokazuju oprečne rezultate [120,171-174]. Naime, jedna grupa studija beleži porast oksidacije, narušenu povratnu spregu i povećan citosolni sadržaj DA, neurotoksičnost nakon tretmana L-dopom [171-175], dok druga ukazuje na odsustvo štetnog uticaja L-dope i dodatnih oštećenja nigrostrijalnih neurona [176], kao i da različite vrste terapije i različite doze ne doprinose promenama nivoa parametara OS i PC/LPC inteziteta pikova, odnosno da one ne doprinose intezitetu OS kod PB pacijenata [120].

Hirurško lečenje je do skoro podrazumevalo samo operaciju lezija odnosno ablativne hirurške pristupe poput stereotaksičnog uništavanja fiziološki definisanih preaktivnih moždanih jezgara (talamotomija, paliidotomija), a od nedavno se koristi i duboka stimulacija mozga (eng. *deep brain stimulation*, DBS) [5]. Duboka stimulacija mozga podrazumeva visokofrekventnu električnu stimulaciju određenih delova mozga (obično subtalamičkih jezgara manje komponente bazalnih ganglija) pomoću elektroda povezanih sa generatorom impulsa ugrađenim u grudni koš, blizu ključne kosti. Parametri stimulacije se prilagođavaju individualnim potrebama obolelih. Primenjuje se kod PB pacijenta u uznapredovalim stadijumima bolesti sa vrlo izraženim tremorom a koji neadekvatno reaguju na lekove, kao i kod PB pacijenta sa dugotrajnim komplikacijama na terapiju L-dopom, poput fluktuacija motorike i teške diskinezije [177]. Ovim tipom lečenja može se značajno redukovati rigidnost, kontralateralni tremor na više od 4 godine, poboljšati pokreti, smanjiti ili zaustaviti nevoljni pokreti tipa diskinezije, ali i stabilizovati fluktuacije lekova i smanjiti doze lekova koji se koriste. Lečenje pomoću DBS je neučinkovito za druge simptome PB, ne sprečava progresiju PB, i često je praćeno nuspojavama kao što su promene ponašanja i psihijatrijske promene [178]. Osim DBS, hirurškim putem PB pacijentima se ugrađuju i stomachne infuzione gel pumpe kojima se obezbeđuje kontinuirano

unošenje L-dopa-karbidopa (duopa), kao i pumpe kojima se apomorfin aplikuje subkutano tokom budnih sati, čime se smanjuje period kada su PB pacijenti u „off” stanju. U poređenju sa intermitentnom dopaminergičkom stimulacijom, pokazano je da kontinuirana i povećana dostupnost DA u infuzionim terapijama značajno smanjuje motorne fluktuacije, diskineziju i fluktuacije u odgovoru na lečenje. Iako se ovaj vid terapije primenjuje u Evropi, u Sjedinjenim Američkim Državama se njihova efikasnost i sigurnost upotrebe još uvek ispituju [152].

U lečenju PB koristi se i MRI–vođen fokusirani ultrazvuk (eng. *MRI–guided focused ultrasound*), minimalno invazivan tretman koji je pomogao nekim PB pacijentima da kontrolišu tremor, pogotovo onima kod kojih se javljaju izraziti asimetrični simptomi. Metoda se zasniva na spaljivanju dubokih moždanih struktura koje su odgovorne za podrhtavanje (thalamus i subtalamičko jedro) visokim temperaturama pomoću MRI–usmeravanih ultrazvučnih talasa [5] bez narušavanja strukture lobanje.

Kao nove oblasti eksperimentalne terapije izdvajaju se genske terapije i regenerativne terapije zasnovane na ćelijama (ćelijske transplantacije). Klinička ispitivanja učinkovitosti genske terapije u PB zasnivaju se na pronalaženju patogenih varijanti specifičnih za PB; proučavanju intenziteta kojim se obnavljanja sinteza DA, stepena neuroprotekcije i mogućnosti genske neuromodulacije [179]. Poslednjih godina ohrabrujući je broj kliničkih studija u kojima se primenjuju neki od navedenih pristupa i koje su u fazi 1 pokazale uspeh. Trenutno se ispituju efekti uvođenja gena za tirozin hidroksilazu i dopa-dekarboksilazu (enzimi potrebni za proizvodnju DA) u mozak pomoću adenovirusnih ili lentivirusnih vektora. Tako na primer, u fazi 1 kliničkog ispitivanja pokazano je da ubacivanje adeno-povezanog virusnog vektora serotipa-2 koji kodira komplementarnu DNK za enzim VI-AADC01 (aromatična L-aminokiselinska dekarboksilaza) odgovornog za prevođenje L-dopa u DA u putamen poboljšava klinički ishod i kvalitet života PB pacijenata. Faza 2 se trenutno sprovodi u više centara na većem broju pacijenata sa uznapredovalom PB [180]. Sa druge strane, u eksperimentalnom terapijskom modelu transplantacije DA-produkujućih ćelija, dobijenih od humanih embrionalnih matičnih (stem) ćelija ili od indukovanih pluripotentnih matičnih ćelija, selektovano je smanjen DA gubitak u putamenu. Rezultati ove studije pokazali su u isto vreme i interesantan ishod i neočekivana otkrića [181]. Naime, post-mortem analiza mozga PB pacijenta kojem je urađena bilateralna transplantacija fetalnih mezencefalnih grafova u putamen pokazala je veliki broj preživelih dopaminskih neurona, kao i gustu i rasprostranjenu strijatalnu DA reinervaciju. Međutim, klinički oporavak nije primećen, a javile su se i diskinezije koje liče na difaznu diskineziju (odbegle diskinezije), koje su se ispoljavale kada pacijent nije uzimao lekove [181]. Iako su se u nekoliko slučajeva regenerativne terapije zasnovane na fetalnim moždanim ćelijama pokazale kao efikasne, javio se problem održivosti zbog nedostupnosti fetalnog tkiva potrebnog za ovaj vid terapije, poput dopaminergičkih progenitora izvedenih iz indukovanih pluripotentnih matičnih ćelija ili ćelija dobijenih iz embrionalnih matičnih ćelija [182]. Efekte ostalih terapija uključujući apliciranje neurotrofnog faktora glijalnih ćelija (eng. *glial cell line-derived neurotrophic factor*) i drugih neurotrofnih faktora u mozak, neophodno je dalje istražiti kod ljudi s obzirom da su u PB modelima kod nekih primata ovi faktori rasta ispoljili neuroprotektivni i neuroregenerativni učinak [183].

Potporne, komplementarne i alternativne terapije su vidovi terapija kojima se obolelima može olakšati život i pomoći da se nose sa simptomima na dnevnom nivou. To su fizička aktivnost (hodanje, trčanje, plivanje, ples, joga, boks, i slično), fizikalna terapija, okupaciona terapija, terapija za probleme sa govorom i gutanjem, aromaterapija, akupunktura, homeopatija, meditacija, masaže, i druge. Na primer, radom sa fizioterapeutom i upražnjavanjem odgovarajućih vežbi obolelima se može olakšati kretanje, poboljšati hodanje i fleksibilnost, ublažiti ukočenost mišića, smanjiti bolovi u zglobovima, doprineti poboljšanju kondicije, omogućiti da se prilagode trenutnim ograničenjima, i postignu maksimalne učinke u

obavljanju svakodnevnih aktivnosti u odnosu na stadijum bolesti. Okupacionom terapijom mogu se identifikovati poteškoće u obavljanju svakodnevnih, rutinskih aktivnosti, kao što su oblačenje ili odlazak do prodavnice, dobiti pomoć u smišljanju praktičnih rešenja uključujući i prilagođavanje prostora u kom PB pacijent boravi prema njegovim trenutnim potrebama, čime on dobija mogućnost da što duže održi svoju nezavisnost. S obzirom da PB uzrokuje poteškoće pri gutanju (disfagija) i probleme sa govorom, vežbe govora i gutanja ili korišćenje asistivne tehnologije u radu sa logopedom i jezičkim terapeutom mogu pomoći da se umanje ovi problemi. Dodatno, sama bolest, terapija antiparkinson lekovima i neaktivnost kod PB pacijenata dovode do problema sa kilažom, varenjem i konstipacijom, fluktuacijom krvnog pritiska, i ostalo, te im se preporučuje da se pridržavaju specijalnog režima ishrane (najčešće se preporučuje mediteranska ishrana odnosno hrana bogata vlaknima), mali i češći obroci, korišćenje dijetetskih suplemenata i laksativa, unos dovoljne količine tečnosti, povećane količine soli, i drugo [153].

Zaključak

Poslednjih decenija napravljen je veliki napredak u razumevanju etiopatogeneze PD, dijagnostici, ali i u lečenju simptoma povezanih sa PB. Međutim, progresivno fizičko, mentalno, socijalno i ekonomsko propadanje obolelih PB je posebno zastrašujuće zbog još uvek neadekvatnih terapija, ali i neidentifikacije biomarkera za predikciju razvoja bolesti, evaluaciju stanja pacijenata, kao i onih koji će dati indicaciju pozitivnog odgovora na terapiju. Upravo, zbog toga potraga za biomarkerima, kao i novim, efikasnijim terapijskim pristupima, poput neuroprotektivnih terapija ili terapija kojima se bolest modifikuje, i dalje je u toku.

Zahvalnica

Izrada ovog rada je omogućena zahvaljujući finansiranju Ministarstva nauke, tehnološkog razvoja i inovacija Republike Srbije, broj ugovora **451-03-47/2023-01/ 200017**.

Literatura

1. Hou, Y., Dan, X., Babbar, M., Wei, Y., Hasselbalch, S. G., Croteau, D. L. Et al. Ageing as a risk factor for neurodegenerative disease. *Nature Reviews Neurology* 2019;15 (10): 565-81.
2. Maher, P. The potential of flavonoids for the treatment of neurodegenerative diseases. *International journal of molecular sciences* 2019;20 (12), 3056.
3. Kavaliunas, A., Danylaitė Karrenbauer, V., Binzer, S., & Hillert, J. Systematic review of the socioeconomic consequences in patients with multiple sclerosis with different levels of disability and cognitive function. *Frontiers in Neurology* 2022;12: 737211.
4. Emamzadeh, F. N., & Surguchov, A. Parkinson's disease: biomarkers, treatment, and risk factors. *Frontiers in neuroscience*, 2018;12: 612.
5. Jankovic, Joseph, and Eng King Tan. "Parkinson's disease: Etiopathogenesis and treatment." *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* 2020;91 (8) 795-08.
6. Sveinbjornsdottir S. The clinical symptoms of Parkinson's disease. *Journal of Neurochemistry* 2016;139 (S1): 318–24.
7. Tolosa, E., Garrido, A., Scholz, S. W., & Poewe, W. Challenges in the diagnosis of Parkinson's disease. *The Lancet Neurology* 2021;20 (5): 385-97.
8. Foltynie T, Sawcer S, Brayne C, Barker RA. The genetic basis of Parkinson's disease. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry* 2002;73 (4): 363–70.
9. Hawkes CH. The prodromal phase of sporadic Parkinson's disease: does it exist and if so how long is it? *Movement Disorder* 2008;23 (13): 1799–07.
10. Zou J, Weng R-H, Chen Z-Y, Wei X-B, Wang R, Chen D, et al. Position emission tomography/single-photon emission tomography neuroimaging for detection of premotor Parkinson's disease. *CNS Neuroscience & Therapeutics* 2016;22 (3): 167–77.

11. Global, regional, and national burden of neurological disorders, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet Neurology* 2019;18: 459–80
12. Blauwendraat C, Nalls MA, Singleton AB. The genetic architecture of Parkinson's disease. *Lancet Neurology* 2020;19: 170–78.
13. Armstrong, M. J., & Okun, M. S. Diagnosis and treatment of Parkinson disease: a review. *Jama* 2020;323 (6): 548–60.
14. Foltynie T, Brayne C, Barker RA. The heterogeneity of idiopathic Parkinson's disease. *Journal of Neurology* 2002;249 (2): 138–45.
15. Bartels AL, Leenders KL. Parkinson's disease: the syndrome, the pathogenesis and pathophysiology. *Cortex* 2009;45 (8): 915–21.
16. Papengut F, Raethjen J, Binder A, Deuschl G. Rest tremor suppression may separate essential from parkinsonian rest tremor. *Parkinsonism Relate Disorder* 2013;19 (7): 693–97.
17. Vingerhoets FJ, Schulzer M, Calne DB, Snow BJ. Which clinical sign of Parkinson's disease best reflects the nigrostriatal lesion? *Annals of Neurology* 1997;41 (1): 58–64.
18. Fereshtehnejad SM, Yao C, Pelletier A, Montplaisir JY, Gagnon JF, Postuma RB. Evolution of prodromal Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies: a prospective study. *Brain*. 2019;142 (7): 2051–67.
19. Maetzler W, Liepelt I, Berg D. Progression of Parkinson's disease in the clinical phase: potential markers. *Lancet Neurology* 2009;8 (12): 1158–71.
20. Berardelli A, Rothwell JC, Thompson PD, Hallett M. Pathophysiology of bradykinesia in Parkinson's disease. *Brain*. 2001;124 (11): 2131–46.
21. Berardelli A, Sabra AF, Hallett M. Physiological mechanisms of rigidity in Parkinson's disease. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*. 1983;46 (1): 45–53.
22. Chaudhuri KR, Schapira AHV. Non-motor symptoms of Parkinson's disease: dopaminergic pathophysiology and treatment. *Lancet Neurology* 2009;8 (5): 464–74.
23. Schrepf W, Brandt MD, Storch A, Reichmann H. Sleep disorders in Parkinson's disease. *Journal of Parkinson Disease* 2014;4 (2): 211–21.
24. Hawkes CH, Shephard BC, Daniel SE. Olfactory dysfunction in Parkinson's disease. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry* 1997;62 (5): 436–46.
25. Pfeiffer RF. Gastrointestinal dysfunction in Parkinson's disease. *Parkinsonism & Related Disorders* 2011;17 (1): 10–5
26. Fearnley, J. M., & Lees, A. J. Ageing and Parkinson's disease: substantia nigra regional selectivity. *Brain* 1991;114 (Pt 5), 2283–01.
27. Jankovic J. Parkinson's disease: clinical features and diagnosis. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry* 2008;79 (4): 368–76.
28. Samii A, Nutt JG, Ransom BR. Parkinson's disease. *Lancet Lond Engl* 2004;363 (9423): 1783–93.
29. Kim SD, Allen NE, Canning CG, Fung VSC. Postural instability in patients with Parkinson's disease. *CNS Drugs* 2013;27 (2): 97–112.
30. Jankovic J, McDermott M, Carter J, Gauthier S, Goetz C, Golbe L, et al. Variable expression of Parkinson's disease: a base-line analysis of the DATATOP cohort. The Parkinson Study Group. *Neurology* 1990;40 (10): 1529–34.
31. Lewis SJG. Heterogeneity of Parkinson's disease in the early clinical stages using a data driven approach. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry* 2005;76 (3): 343–48.
32. Liu P, Feng T, Wang YJ, Zhang X, Chen B. Clinical heterogeneity in patients with early-stage Parkinson's disease: a cluster analysis. *Journal of Zhejiang University Science B*. 2011;12: 694–03.
33. Hoehn MM, Yahr MD. Parkinsonism: onset, progression and mortality. *Neurology* 1967;17 (5): 427–42.
34. Ebersbach G, Baas H, Csoti I, Müngersdorf M, Deuschl G. Scales in Parkinson's disease. *Journal of Neurology* 2006;253 (4): iv32–iv35.
35. Ramaker C, Marinus J, Stiggelbout AM, Hilten BJ van. Systematic evaluation of rating scales for impairment and disability in Parkinson's disease. *Movement Disorders* 2002;17 (5): 867–76.
36. Vukajlović, J. M., Panić-Janković, T. Mass Spectrometry in Clinical Laboratories. Mitulović, G, editor. *Mass Spectrometry in Life Sciences and Clinical Laboratory*. InTech, Rijeka; 2021. p. 78–82.
37. Jankovic J. Parkinson's disease: clinical features and diagnosis. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry* 2008;79 (4): 368–76.
38. Poewe W, Wenning G. The differential diagnosis of Parkinson's disease. *European journal of neurology*. 2002; 9 Suppl 3: 23–30.
39. Hughes AJ, Daniel SE, Kilford L, Lees AJ. Accuracy of clinical diagnosis of idiopathic Parkinson's disease: a clinico-pathological study of 100 cases. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry* 1992;55 (3): 181–84.

40. Lehninger AL, Nelson DL, Cox MM. *Lehninger Principles of Biochemistry*, Fourth Edition - New York: W.H. Freeman 2005
41. Carlsson A, Lindqvist M, Magnusson T. 3,4-Dihydroxyphenylalanine and 5-hydroxytryptophan as reserpine antagonists. *Nature* 1957;180 (4596): 1200.
42. McCallum SE, Parameswaran N, Perez XA, Bao S, McIntosh JM, Grady SR, et al. Compensation in pre-synaptic dopaminergic function following nigrostriatal damage in primates. *Journal of Neurochemistry* 2006;96 (4): 960–72.
43. Dexter DT, Jenner P. Parkinson disease: from pathology to molecular disease mechanisms. *Free Radical Biology and Medicine* 2013;62: 132–44.
44. Rodriguez-Oroz MC, Jahanshahi M, Krack P, Litvan I, Macias R, Bezard E, et al. Initial clinical manifestations of Parkinson's disease: features and pathophysiological mechanisms. *Lancet Neurology* 2009;8 (12): 1128–39.
45. Simon, D. K., Tanner, C. M., & Brundin, P. Parkinson disease epidemiology, pathology, genetics, and pathophysiology. *Clinics in geriatric medicine* 2020;36 (1): 1-12.
46. Schaser, A. J., Osterberg, V. R., Dent, S. E., Stackhouse, T. L., Wakeham, C. M., Boutros, S. W., et al. Alpha-synuclein is a DNA binding protein that modulates DNA repair with implications for Lewy body disorders. *Scientific reports* 2019;9 (1): 10919.
47. Kara, E., Crimi, A., Wiedmer, A., Emmenegger, M., Manzoni, C., Bandres-Ciga, S., et al. An integrated genomic approach to dissect the genetic landscape regulating the cell-to-cell transfer of α -synuclein. *Cell reports* 2021;35 (10).
48. Mezey, E., Dehejia, A., Harta, G., Papp, M. I., Polymeropoulos, M. H., & Brownstein, M. J. Alpha synuclein in neurodegenerative disorders: murderer or accomplice?. *Nature medicine* 1998;4 (7): 755-57.
49. Uversky, V. N. α -synuclein misfolding and neurodegenerative diseases. *Current protein and peptide science* 2008;9 (5): 507-40.
50. Ozansoy M, Başak AN. The central theme of Parkinson's disease: α -synuclein. *Molecular Neurobiology* 2013;47 (2): 460–65.
51. Del Tredici K, Braak H. Lewy pathology and neurodegeneration in premotor Parkinson's disease. *Mov Disord Off J Mov Disord Soc* 2012;27 (5): 597–607.
52. Braak H, Del Tredici K, Rüb U, de Vos RAI, Jansen Steur ENH, Braak E. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiology of Aging* 2003;24 (2): 197–11.
53. Kouli A, Torsney KM, Kuan W-L. Parkinson's Disease: Etiology, Neuropathology, and Pathogenesis. In: Stoker TB, Greenland JC, editors. Codon Publications: Brisbane (AU), 2018.
54. Lotharius J, Brundin P. Pathogenesis of Parkinson's disease: dopamine, vesicles and α -synuclein. *Nature Reviews Neuroscience* 2002;3 (12): 932-42.
55. Dauer W, Przedborski S. Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron* 2003;39 (6): 889–909.
56. Lesage S, Brice A. Parkinson's disease: from monogenic forms to genetic susceptibility factors. *Human Molecular Genetics* 2009;18 (R1): R48-59.
57. Tolleson CM, Fang JY. Advances in the mechanisms of Parkinson's disease. *Discovery Medicine* 2013;15 (80): 61–6.
58. Jellinger KA. Neuropathology of sporadic Parkinson's disease: evaluation and changes of concepts. *Movement Disorders* 2012;27 (1): 8–30.
59. Priyadarshi A, Khuder SA, Schaub EA, Priyadarshi SS. Environmental risk factors and Parkinson's disease: a metaanalysis. *Environmental Research* 2001;86 (2): 122–27.
60. Biosa, A., Outeiro, T. F., Bubacco, L., & Bisaglia, M. Diabetes mellitus as a risk factor for Parkinson's disease: a molecular point of view. *Molecular Neurobiology* 2018;55: 8754-63.
61. Lai BCL, Marion SA, Teschke K, Tsui JKC. Occupational and environmental risk factors for Parkinson's disease. *Parkinsonism Related Disorders* 2002;8 (5): 297–309.
62. Klein C, Westenberger A. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2012;2 (1): a008888.
63. Blesa J, Trigo-Damas I, Quiroga-Varela A, Jackson-Lewis VR. Oxidative stress and Parkinson's disease. *Frontiers in Neuroanatomy* 2015;9: 91.
64. Rocha NP, de Miranda AS, Teixeira AL. Insights into neuroinflammation in Parkinson's disease: from biomarkers to anti-inflammatory based therapies. *BioMed Research International* 2015.
65. Halliwell B. Biochemistry of oxidative stress. *Biochemical Society Transactions* 2007;35 (Pt 5): 1147–50.
66. Buonocore G, Perrone S, Tataranno ML. Oxygen toxicity: chemistry and biology of reactive oxygen species. *Semin Fetal Neonatal Med* 2010;15 (4): 186–90.
67. Kruidenier L, Verspaget HW. Review article: oxidative stress as a pathogenic factor in inflammatory bowel disease—radicals or ridiculous? *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* 2002;16 (12): 1997–2015.

68. Stadtman ER, Levine RL. Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. *Amino Acids* 2003;25 (3–4): 207–18.
69. Shacter E. Quantification and significance of protein oxidation in biological samples. *Drug Metabolism Reviews* 2000;32 (3–4): 307–26.
70. Beal MF. Oxidatively modified proteins in aging and disease. *Free Radical Biology and Medicine* 2002;32 (9): 797–803.
71. Stadtman ER. Protein oxidation and aging. *Science* 1992;257 (5074): 1220–24.
72. Jacob C, Winyard PG. Introduction. In: *Redox Signaling and Regulation in Biology and Medicine*. Wiley-Blackwell, 2009: 1–11.
73. Ceaser EK, Moellering DR, Shiva S, Ramachandran A, Landar A, Venkartraman A, et al. Mechanisms of signal transduction mediated by oxidized lipids: the role of the electrophile-responsive proteome. *Biochemical Society Transactions* 2004;32 (Pt 1): 151–55.
74. Poli G, Schaur RJ, Siems WG, Leonarduzzi G. 4-hydroxynonenal: a membrane lipid oxidation product of medicinal interest. *Medicinal Research Reviews* 2008;28 (4): 569–631.
75. Noguchi N. Role of oxidative stress in adaptive responses in special reference to atherogenesis. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition* 2008;43 (3): 131–38.
76. Parthasarathy S, Santanam N, Ramachandran S, Meilhac O. Potential role of oxidized lipids and lipoproteins in antioxidant defense. *Free Radical Research* 2000;33 (3): 197–215.
77. Spiteller P, Kern W, Reiner J, Spiteller G. Aldehydic lipid peroxidation products derived from linoleic acid. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease* 2001;1531 (3): 188–208.
78. Csala M, Kardon T, Legeza B, Lizák B, Mandl J, Margittai É, et al. On the role of 4-hydroxynonenal in health and disease. Aldehydic lipid peroxidation products derived from linoleic acid. *Biochimica (BBA)-Molecular Basis of Disease* 2015;1852 (5): 826–38.
79. Schaur RJ. Basic aspects of the biochemical reactivity of 4-hydroxynonenal. *Molecular Aspects of Medicine* 2003;24 (4–5): 149–59.
80. Poli G, Biasi F, Leonarduzzi G. 4-Hydroxynonenal-protein adducts: A reliable biomarker of lipid oxidation in liver diseases. *Molecular Aspects of Medicine* 2008;29 (1–2): 67–71.
81. Vatsyayan R, Lelsani PCR, Chaudhary P, Kumar S, Awasthi S, Awasthi YC. The expression and function of vascular endothelial growth factor in retinal pigment epithelial (RPE) cells is regulated by 4-hydroxynonenal (HNE) and glutathione S-transferaseA4-4. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2012;417 (1): 346–51.
82. Almeida M, Ambrogini E, Han L, Manolagas SC, Jilka RL. Increased lipid oxidation causes oxidative stress, increased peroxisome proliferator-activated receptor-gamma expression, and diminished pro-osteogenic Wnt signaling in the skeleton. *The Journal of Biological Chemistry* 2009;284 (40): 27438–48.
83. Chandra A, Srivastava SK. A synthesis of 4-hydroxy-2-trans-nonenal and 4-(3H) 4-hydroxy-2-trans-nonenal. *Lipids* 1997;32 (7): 779–82.
84. Fedorova, T. N., Logvinenko, A. A., Poleshchuk, V. V., Muzychuk, O. A., Shabalina, A. A., & Illarioshkin, S. N. Lipid Peroxidation Products in the Blood Plasma of Patients with Parkinson's Disease as Possible Biomarkers of Different Stages of the Disease. *Neurochemical Journal* 2019;13: 391-5.
85. Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radical Biology and Medicine* 1991;11 (1): 81–128.
86. Wang X, Lei XG, Wang J. Malondialdehyde regulates glucose-stimulated insulin secretion in murine islets via TCF7L2-dependent Wnt signaling pathway. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2014;382 (1): 8–16.
87. Li L, Davie JR. The role of Sp1 and Sp3 in normal and cancer cell biology. *Annals of Anatomy-Anatomischer Anzeiger*. 2010;192 (5): 275-83.
88. Ighodaro OM, Akinloye OA. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alexandria Journal of Medicine* 2018;54 (4): 287–93.
89. Volinsky R, Kinnunen PKJ. Oxidized phosphatidylcholines in membrane-level cellular signaling: from biophysics to physiology and molecular pathology. *FEBS Journal* 2013;280 (12): 2806–16.
90. Kinnunen PKJ, Kaarniranta K, Mahalka AK. Protein-oxidized phospholipid interactions in cellular signaling for cell death: from biophysics to clinical correlations. *Biochimica et Biophysica Acta* 2012;1818 (10): 2446–55.
91. Fruhwirth GO, Loidl A, Hermetter A. Oxidized phospholipids: from molecular properties to disease. *Biochimica et Biophysica Acta* 2007;1772 (7): 718–36.

92. Reis A, Spickett CM. Chemistry of phospholipid oxidation. *Biochimica et Biophysica Acta* 2012;1818 (10): 2374–87.
93. Valenta Šobot A, Drakulić D, Joksić G, Miletić Vukajlović J, Savić J, Potočnik J, Filipović Tričković J. Yellow gentian root extract provokes concentration-and time-dependent response in peripheral blood mononuclear cells. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju*. 2020;71 (4): 320–8.
94. Stanojlović M, Horvat A, Guševac I, Grković I, Mitrović N, Buzadžić I, Drakulić D. Time course of cerebral hypoperfusion-induced neurodegenerative changes in the cortex of male and female rats. *Folia Biologica* 2014;60: 123–32.
95. Stanojlović MR, Guševac I, Grković I, Mitrović NL, Horvat A, Drakulić DR. Time-related sex differences in cerebral hypoperfusion-induced brain injury. *Archives of biological sciences*. 2014;66 (4): 1673–80.
96. Zaric M, Drakulic D, Dragic M, Gusevac Stojanovic I, Mitrovic N, Grkovic I, et al. Molecular Alterations and Effects of Acute Dehydroepiandrosterone Treatment Following Brief Bilateral Common Carotid Artery Occlusion: Relevance to Transient Ischemic Attack. *Neuroscience*. 2019;410: 128–39.
97. Zaric M, Drakulic D, Stojanovic IG, Mitrovic N, Grkovic I, Martinovic J. Regional-Specific Effects of Cerebral Ischemia/Reperfusion and Dehydroepiandrosterone on Synaptic NMDAR/PSD-95 Complex in Male Wistar rats. *Brain Research*. 2018;1688: 73–80.
98. Mayne K, White JA, McMurrin CE, Rivera FJ, de la Fuente AG. Aging and Neurodegenerative Disease: Is the Adaptive Immune System a Friend or Foe? *Frontiers in Aging Neuroscience* 2020;12: 572090.
99. Salganik RI. The benefits and hazards of antioxidants: controlling apoptosis and other protective mechanisms in cancer patients and the human population. *Journal of the American college of nutrition*. 2001;20 (sup5): 464S–72S.
100. Gilgun-Sherki Y, Melamed E, Offen D. Oxidative stress induced-neurodegenerative diseases: the need for antioxidants that penetrate the blood brain barrier. *Neuropharmacology* 2001;40 (8): 959–75.
101. Alam ZI, Jenner A, Daniel SE, Lees AJ, Cairns N, Marsden CD, et al. Oxidative DNA damage in the parkinsonian brain: an apparent selective increase in 8-hydroxyguanine levels in substantia nigra. *Journal of Neurochemistry* 1997;69 (3): 1196–1203.
102. Popović I, Milovanović D, Miletić J, Nešić M, Vranješ M, Šaponjić Z, et al. Dependence of the quality of SALDI TOF MS analysis on the TiO₂ nanocrystals' size and shape. *Optical and Quantum Electronics*. 2016;48: 1–6.
103. Galant AL, Kaufman RC, Wilson JD. Glucose: Detection and analysis. *Food chemistry*. 2015;188: 149–60.
104. Ohta S, Meyer E, Thompson CJ, Gjedde A. Oxygen Consumption of the Living Human Brain Measured after a Single Inhalation of Positron Emitting Oxygen. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 1992;12 (2): 179–92.
105. Chong ZZ, Li F, Maiese K. Oxidative stress in the brain: novel cellular targets that govern survival during neurodegenerative disease. *Progress in neurobiology* 2005;75 (3): 207–46.
106. Hastings TG. The role of dopamine oxidation in mitochondrial dysfunction: implications for Parkinson's disease. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 2009;41 (6): 469–72.
107. Gluck MR, Zeevalk GD. Inhibition of brain mitochondrial respiration by dopamine and its metabolites: implications for Parkinson's disease and catecholamine-associated diseases. *Journal of Neurochemistry* 2004;91 (4): 788–95.
108. Kiliç A, Yalçın AS, Yalçın D, Taga Y, Emerk K. Increased erythrocyte susceptibility to lipid peroxidation in human Parkinson's disease. *Neuroscience Letters* 1988;87 (3): 307–10.
109. Miletić J, Drakulić D, Pejić S, Petković M, Ilić TV, Miljković M, et al. Prooxidant–antioxidant balance, advanced oxidation protein products and lipid peroxidation in Serbian patients with Parkinson's disease. *International Journal of Neuroscience*. 2018;128 (7): 600–7.
110. Vukajlović JM, Pejić S, Todorović A, Šobot AV, Drakulić D, Pavlović I, et al. Antioxidant status and clinicopathological parameters in patients with Parkinson's disease. *Vojnosanitetski preglod*. 2020;77 (7).
111. Dexter DT, Carter CJ, Wells FR, Javoy-Agid F, Agid Y, Lees A, et al. Basal lipid peroxidation in substantia nigra is increased in Parkinson's disease. *Journal of Neurochemistry* 1989;52 (2): 381–89.
112. Chahine L, Stern M, Chen-Plotkin A. Blood-based biomarkers for Parkinson's disease. *Parkinsonism Related Disorders* 2014;20 (0 1): S99–103.
113. Yoritaka A, Hattori N, Uchida K, Tanaka M, Stadtman ER, Mizuno Y. Immunohistochemical detection of 4-hydroxynonenal protein adducts in Parkinson disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1996;93 (7): 2696–701.
114. Picklo MJ, Amarnath V, McIntyre JO, Graham DG, Montine TJ. 4-Hydroxy-2(E)-nonenal inhibits CNS mitochondrial respiration at multiple sites. *Journal of Neurochemistry* 1999;72 (4): 1617–24.
115. Jomova K, Vondrakova D, Lawson M, Valko M. Metals, oxidative stress and neurodegenerative disorders. *Molecular and Cellular Biochemistry* 2010;345 (1–2): 91–104.

116. Coppedè F, Armani C, Bidia DD, Petrozzi L, Bonuccelli U, Migliore L. Molecular implications of the human glutathione transferase A-4 gene (hGSTA4) polymorphisms in neurodegenerative diseases. *Mutation Research* 2005;579 (1–2): 107–14.
117. Qin Z, Hu D, Han S, Reaney SH, Di Monte DA, Fink AL. Effect of 4-hydroxy-2-nonenal modification on alpha-synuclein aggregation. *Journal of Biological Chemistry* 2007;282 (8): 5862–70.
118. Castellani RJ, Perry G, Siedlak SL, Nunomura A, Shimohama S, Zhang J, et al. Hydroxynonenal adducts indicate a role for lipid peroxidation in neocortical and brainstem Lewy bodies in humans. *Neuroscience Letters* 2002;319 (1): 25–8.
119. Morel P, Tallineau C, Pontcharraud R, Piriou A, Huguet F. Effects of 4-hydroxynonenal, a lipid peroxidation product, on dopamine transport and Na⁺/K⁺ ATPase in rat striatal synaptosomes. *Neurochemistry International* 1998;33 (6): 531–40.
120. Miletić Vukajlović J. 2019, Ispitivanje zavisnosti lipidnog sastava plazme i parametara lipidne peroksidacije od stadijuma i dužine trajanja Parkinsonove bolesti i primene terapije, doktorska disertacija, Farmaceutski fakultet Univerziteta u Beogradu.
121. Bourque M, Dluzen DE, Di Paolo T. Neuroprotective actions of sex steroids in Parkinson's disease. *Frontiers Neuroendocrinology* 2009;30 (2): 142–57.
122. Saunders-Pullman M MPH, Rachel, Derby C, Santoro N, Bressman S, Chiu B, Lipton R. Role of endogenous and exogenous hormone exposure on the risk of Parkinson's disease: results from the women's health initiative observational study. abstracts of the 61st meeting of the American academy of neurology. *Neurology* 2009;72: S23.
123. Benedetti MD, Maraganore DM, Bower JH, McDonnell SK, Peterson BJ, Ahlskog JE, Schaid DJ, Rocca WA. Hysterectomy, menopause, and estrogen use preceding Parkinson's disease: an exploratory case-control study. *Movement disorders*. 2001;16 (5): 830-7.
124. Sofic E, Sapcanin A, Tahirovic I, Gavrankapetanovic I, Jellinger K, Reynolds GP, Tatschner T, Riederer P. Antioxidant capacity in postmortem brain tissues of Parkinson's and Alzheimer's diseases. *Oxidative Stress and Neuroprotection*. 2006: 39-43.
125. Venkateshappa C, Harish G, Mythri RB, Mahadevan A, Srinivas Bharath MM, Shankar SK. Increased oxidative damage and decreased antioxidant function in aging human substantia nigra compared to striatum: implications for Parkinson's disease. *Neurochemical Research* 2012;37 (2): 358–69.
126. Sian H, Hülsmann J, Mandel S, Youdim MBH, Riederer P. The relevance of iron in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Journal of Neurochemistry* 2011;118 (6): 939–57.
127. Wong, M. W., Braidy, N., Poljak, A., Pickford, R., Thambisetty, M., & Sachdev, P. S. Dysregulation of lipids in Alzheimer's disease and their role as potential biomarkers. *Alzheimer's & Dementia* 2017;13 (7): 810-27.
128. Miletić Vukajlović J, Drakulić D, Pejić S, Ilić TV, Stefanović A, Petković M, Schiller J. Increased plasma phosphatidylcholine/lysophosphatidylcholine ratios in patients with Parkinson's disease. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 2020;34 (4): e8595.
129. Drzazga A, Sowińska A, Koziolkiewicz M. Lysophosphatidylcholine and lysophosphatidylinositol—novel promising signaling molecules and their possible therapeutic activity. *Acta poloniae pharmaceutica*. 2014;71 (6): 887-99.
130. Farmer K, Smith C, Hayley S, Smith J. Major alterations of phosphatidylcholine and lysophosphatidylcholine lipids in the substantia nigra using an early stage model of Parkinson's disease. *International Journal of Molecular Sciences* 2015;16 (8): 18865–77.
131. Mulder C, Wahlund L-O, Teerlink T, Blomberg M, Veerhuis R, van Kamp GJ, et al. Decreased lysophosphatidylcholine/phosphatidylcholine ratio in cerebrospinal fluid in Alzheimer's disease. *Journal of Neural Transmission* 2003;110 (8): 949–55.
132. Shamim A, Mahmood T, Ahsan F, Kumar A, Bagga P. Lipids: An insight into the neurodegenerative disorders. *Clinical nutrition experimental* 2018;20: 1–19.
133. Grey A, Bolland M. Clinical trial evidence and use of fish oil supplements. *JAMA Internal Medicine* 2014;174 (3): 460–62.
134. MacLean CH, Newberry SJ, Mojica WA, Khanna P, Issa AM, Suttrop MJ, et al. Effects of omega-3 fatty acids on cancer risk: a systematic review. *JAMA* 2006;295 (4): 403–15.
135. Rizos EC, Ntzani EE, Bika E, Kostapanos MS, Elisaf MS. Association between omega-3 fatty acid supplementation and risk of major cardiovascular disease events: a systematic review and meta-analysis. *JAMA* 2012;308 (10): 1024–33.
136. Browse J, Warwick N, Somerville CR, Slack CR. Fluxes through the prokaryotic and eukaryotic pathways of lipid synthesis in the '16:3' plant *Arabidopsis thaliana*. *Biochemical Journal* 1986;235 (1): 25–31.
137. Dembitsky VM, Rozentsvet OA, Pechenkina EE. Glycolipids, phospholipids and fatty acids of brown algae species. *Phytochemistry* 1990;29 (11): 3417–21.
138. Dembitsky VM, Rozentsvet OA. Diacylglyceryltrimethylhomoserines and phospholipids of some green marine macrophytes. *Phytochemistry* 1989;28 (12): 3341–43.
139. Chen Y, Wen S, Jiang M, Zhu Y, Ding L, Shi H, et al. Atherosclerotic dyslipidemia revealed by plasma lipidomics on ApoE^{−/−} mice fed a high-fat diet. *Atherosclerosis* 2017;262: 78–86.

140. Huang X, Abbott RD, Petrovitch H, Mailman RB, Ross GW. Low LDL cholesterol and increased risk of Parkinson's disease: prospective results from Honolulu-Asia Aging Study. *Movement Disorder* 2008;23 (7): 1013–18.
141. Hu G, Antikainen R, Jousilahti P, Kivipelto M, Tuomilehto J. Total cholesterol and the risk of Parkinson disease. *Neurology* 2008;70 (21): 1972–79.
142. Huang X, Auinger P, Eberly S, Oakes D, Schwarzschild M, Ascherio A, et al. Serum cholesterol and the progression of Parkinson's disease: results from DATATOP. *PLoS One* 2011;6(8): e22854.
143. de Lau LML, Koudstaal PJ, Hofman A, Breteler MMB. Serum cholesterol levels and the risk of Parkinson's disease. *American Journal of Epidemiology* 2006;164 (10): 998–1002.
144. Cassani E, Cereda E, Barichella M, Madio C, Canello R, Caccialanza R, Zini M, Cilia R, Pezzoli G. Cardiometabolic factors and disease duration in patients with Parkinson's disease. *Nutrition*. 2013;29 (11-12): 1331-5.
145. Farooqui AA, Horrocks LA, Farooqui T. Glycerophospholipids in brain: their metabolism, incorporation into membranes, functions, and involvement in neurological disorders. *Chemistry and Physics of Lipids* 2000;106 (1): 1–29.
146. Fuchs B, Schiller J, Wagner U, Häntzschel H, Arnold K. The phosphatidylcholine/lysophosphatidylcholine ratio in human plasma is an indicator of the severity of rheumatoid arthritis: investigations by ³¹P NMR and MALDI-TOF MS. *Clinical Biochemistry* 2005;38 (10): 925–33.
147. Lobasso S, Tanzarella P, Vergara D, Maffia M, Cocco T, Corcelli A. Lipid profiling of parkin-mutant human skin fibroblasts. *Journal of Cellular Physiology* 2017;232 (12): 3540–51.
148. Lee E-SY, Chen H, Shepherd KR, Lamango NS, Soliman KFA, Charlton CG. Inhibitory effects of lysophosphatidylcholine on the dopaminergic system. *Neurochemical Research* 2004;29 (7): 1333–42.
149. Wood PL, Tippireddy S, Feriante J, Woltjer RL. Augmented frontal cortex diacylglycerol levels in Parkinson's disease and Lewy Body Disease. *PLOS ONE* 2018;13(3): e0191815.
150. Zhang J, Zhang X, Wang L, Yang C. High performance liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) based quantitative lipidomics study of ganglioside-NANA-3 plasma to establish its association with Parkinson's disease patients. *Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research* 2017;23: 5345–53.
151. Lu Z, Wang J, Li M, Liu Q, Wei D, Yang M, et al. (1)H NMR-based metabolomics study on a goldfish model of Parkinson's disease induced by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP). *Chemico-Biological Interactions* 2014;223: 18–26.
152. Serva SN, Bernstein J, Thompson JA, Kern DS, Ojemann SG. An update on advanced therapies for Parkinson's disease: From gene therapy to neuromodulation. *Frontiers in Surgery*. 2022;9.
153. <https://hrcak.srce.hr/file/316409>
154. Morgan JC, Currie LJ, Harrison MB, Bennett JP, Trugman JM, Wooten GF. Mortality in levodopa-treated Parkinson's disease. *Parkinson's Disease* 2014;2014: 426976.
155. Mercuri NB, Bernardi G. The “magic” of L-dopa: why is it the gold standard Parkinson's disease therapy? *Trends in Pharmacological Sciences* 2005;26 (7): 341–44.
156. Papavasiliou PS, Cotzias GC, Düby SE, Steck AJ, Fehling C, Bell MA. Levodopa in Parkinsonism: potentiation of central effects with a peripheral inhibitor. *New England Journal of Medicine* 1972;286 (1): 8–14.
157. Rascol O, Brooks DJ, Korczyn AD, De Deyn PP, Clarke CE, Lang AE. A five-year study of the incidence of dyskinesia in patients with early Parkinson's disease who were treated with ropinirole or levodopa. *New England Journal of Medicine* 2000;342 (20): 1484–91.
158. Rascol O, Brooks DJ, Melamed E, Oertel W, Poewe W, Stocchi F, Tolosa E. Rasagiline as an adjunct to levodopa in patients with Parkinson's disease and motor fluctuations (LARGO, Lasting effect in Adjunct therapy with Rasagiline Given Once daily, study): a randomised, double-blind, parallel-group trial. *The Lancet* 2005;365 (9463): 947-54.
159. Olanow CW, Stern MB, Sethi K. The scientific and clinical basis for the treatment of Parkinson disease. *Neurology* 2009;72 (21 Suppl 4): S1-136.
160. Rinne UK. Problems associated with long-term levodopa treatment of Parkinson's disease. *Acta Neurologica Scandinavica* 1983;68: 19–26.
161. Schapira AHV, Fox SH, Hauser RA, et al. Assessment of safety and efficacy of safinamide as a levodopa adjunct in patients with Parkinson disease and motor fluctuations. *JAMA Neurology* 2017;74: 216–24.
162. Latt MD, Lewis S, Zekry O, et al. Factors to Consider in the Selection of Dopamine Agonists for Older Persons with Parkinson's Disease. *Drugs Aging* 2019;36: 189–202.
163. PD MED Collaborative Group Long-Term effectiveness of dopamine agonists and monoamine oxidase B inhibitors compared with levodopa as initial treatment for Parkinson's disease (PD Med): a large, open-label, pragmatic randomised trial. *The Lan-*

cet 2014;384: 1196–205.

164. Rascol O, Brooks DJ, Korczyn AD, et al. A five-year study of the incidence of dyskinesia in patients with early Parkinson's disease who were treated with ropinirole or levodopa. *New England Journal of Medicine* 2000;342: 1484–91.
165. Warren N, O'Gorman C, Lehn A, et al. Dopamine dysregulation syndrome in Parkinson's disease: a systematic review of published cases. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry* 2017;88: 1060–4.
166. Pahwa R, Tanner CM, Hauser RA, et al. ADS-5102 (amantadine) extended-release capsules for levodopa-induced dyskinesia in Parkinson disease (ease lid study): a randomized clinical trial. *JAMA Neurology* 2017;74: 941949
167. Schapira AHV, Fox SH, Hauser RA, et al. Assessment of safety and efficacy of safinamide as a levodopa adjunct in patients with Parkinson disease and motor fluctuations. *JAMA Neurology* 2017;74: 216–24.
168. Lees AJ, Ferreira J, Rascol O, et al. Opicapone as adjunct to levodopa therapy in patients with Parkinson disease and motor fluctuations. *JAMA Neurology* 2017;74: 197–206.
169. Ferreira JJ, Lees AJ, Poewe W, et al. Effectiveness of opicapone and switching from entacapone in fluctuating Parkinson disease. *Neurology* 2018;90: e1849–57.
170. Torti M, Vacca L, Stocchi F. Istradefylline for the treatment of Parkinson's disease: is it a promising strategy? *Expert Opinion on Pharmacotherapy* 2018;19: 1821–8.
171. Perry TL, Yong VW, Ito M, Foulks JG, Wall RA, Godin DV, et al. Nigrostriatal dopaminergic neurons remain undamaged in rats given high doses of L-DOPA and carbidopa chronically. *Journal of Neurochemistry* 1984;43 (4): 990–93.
172. Colamartino M, Santoro M, Duranti G, Sabatini S, Ceci R, Testa A, et al. Evaluation of levodopa and carbidopa antioxidant activity in normal human lymphocytes in vitro: implication for oxidative stress in Parkinson's disease. *Neurotoxicity Research* 2015;27 (2): 106–17.
173. Mytilineou C, Walker RH, JnoBaptiste R, Olanow CW. Levodopa is toxic to dopamine neurons in an in vitro but not an in vivo model of oxidative stress. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 2003;304 (2): 792–800.
174. Asanuma M, Miyazaki I, Ogawa N. Dopamine- or L-DOPA-induced neurotoxicity: The role of dopamine quinone formation and tyrosinase in a model of Parkinson's disease. *Neurotoxicity Research* 2003;5 (3): 165–76.
175. Lipski J, Nistico R, Berretta N, Guatteo E, Bernardi G, Mercuri NB. L-DOPA: A scapegoat for accelerated neurodegeneration in Parkinson's disease? *Progress in Neurobiology* 2011;94 (4): 389–407.
176. Perry TL, Yong VW, Ito M, Foulks JG, Wall RA, Godin DV, et al. Nigrostriatal dopaminergic neurons remain undamaged in rats given high doses of L-DOPA and carbidopa chronically. *Journal of Neurochemistry* 1984;43 (4): 990–93.
177. Adam EM, Brown EN, Kopell N, McCarthy MM. Deep brain stimulation in the subthalamic nucleus for Parkinson's disease can restore dynamics of striatal networks. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2022;119 (19): e2120808119.
178. Volkmann, J. Deep brain stimulation for the treatment of Parkinson's disease. *Journal of clinical neurophysiology* 2004; 21(1): 6–17.
179. Merola A, Van Laar A, Lonser R, Bankiewicz K. Gene therapy for Parkinson's disease: contemporary practice and emerging concepts. *Expert Review of Neurotherapeutics*. 2020;20 (6): 577–90.
180. Christine CW, Bankiewicz KS, Van Laar AD, Richardson RM, Ravina B, Kells AP, Boot B, Martin AJ, Nutt J, Thompson ME, Larson PS. Magnetic resonance imaging-guided phase 1 trial of putaminal AADC gene therapy for Parkinson's disease. *Annals of neurology*. 2019;85 (5): 704–14.
181. Kordower, J. H., Goetz, C. G., Chu, Y., Halliday, G. M., Nicholson, D. A., Musial, T. F., et al. Robust graft survival and normalized dopaminergic innervation do not obligate recovery in a Parkinson disease patient. *Annals of neurology* 2017;81 (1): 46–57.
182. <https://www.news-medical.net/health/Recent-Advancements-in-Treatment-for-Parkinsons-Disease.aspx>
183. Parmar, M., Grealish, S., & Henchcliffe, C. The future of stem cell therapies for Parkinson disease. *Nature Reviews Neuroscience* 2020;21 (2): 103–15.

FARMAKOGENOMIKA

PHARMACOGENOMICS



Značaj farmakogenetike u terapijskom pristupu akutnog ishemijskog moždanog udara rekombinovanim tkivnim aktivatorom plazminogena

Marija Dušanović Pjević

Institut za humanu genetiku Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

Kontakt: marija.dusanovic-pjevic@med.bg.ac.rs

Apstrakt

Ishemijski moždani udar (IMU) je praćen visokom incidencijom invaliditeta i mortaliteta širom sveta. Trombolitička terapija rekombinovanim tkivnim aktivatorom plazminogena (rtPA) predstavlja jedinu odobrenu terapiju u lečenju akutnog IMU (AIMU). Pokazano je da primena rtPA terapije dovodi do boljeg funkcionalnog oporavka pacijenata nakon AIMU. Međutim, kod određenog broja pacijenata, rtPA terapija je praćena neželjenim efektima, što značajno utiče na njihov oporavak.

Genske varijante, ne samo da utiču na predispoziciju za IMU, već i na terapijski odgovor i klinički ishod same bolesti. Usled velikih interindividualnih varijacija u odgovoru na primljenu trombolitičku terapiju, farmakogenetika se sve više fokusira na ispitivanje uticaja genskih varijanti nakon primene pomenute terapije za lečenje AIMU, imajući u vidu da su već neke polimorfne varijante povezane sa različitim odgovorom na rtPA terapiju, tokom same bolesti, ali i javljanjem rtPA-indukovanih hemoragijskih komplikacija.

U poslednjih 20 godina, farmakogenetičke rtPA studije su pokušavale da pronađu genske faktore rizika povezane sa odgovorom na rtPA terapiju. Većina ovih studija koristila je studije ispitivanja gena kandidata. Međutim, nedavne studije asocijacije kompletnog genoma su ukazale na to da bi genska predispozicija mogla da utiče na rtPA odgovor.

Cilj ovog rada je prikaz dosadašnjih rezultata o genima i genskim varijantama povezanih sa hemoragijskim komplikacijama i stepenom rekanalizacije nakon rtPA terapije kod pacijenata sa AIMU, kao i doprinosa doktorske disertacije pod nazivom „Ispitivanje povezanosti polimorfizama gena koji regulišu fibrinolizu i integritet vanćelijskog matriksa sa efektima terapije ishemijskog moždanog udara rekombinovanim tkivnim aktivatorom plazminogena” postojećim znanjima o uticaju genskih varijanti na oporavak pacijenata nakon AIMU lečenog rtPA terapijom.

Ključne reči: farmakogenetika, ishemijski moždani udar, tkivni aktivator plazminogena

Importance of pharmacogenetics for ischemic stroke therapy with recombinant tissue plasminogen activator

Marija Dušanović Pjević

Institute of Human Genetics, Faculty of Medicine, University of Belgrade

Correspondence: marija.dusanovic-pjevic@med.bg.ac.rs

Abstract

Ischemic stroke (IS) is a major global health concern with high rates of disability and mortality. The approved treatment for acute ischemic stroke is thrombolytic therapy, which involves using recombinant tissue plasminogen activator (rtPA). While rtPA therapy has been shown to improve functional recovery in patients, it also has drawbacks and can lead to adverse effects that hinder patient recovery.

Genetic variations not only affect the susceptibility to ischemic stroke but also play a role in determining the response to rtPA treatment and clinical outcomes. To better understand the individual variability in response to thrombolytic therapy, pharmacogenetic studies are focusing on investigating the influence of genetic variations. These studies aim to identify specific genetic variants associated with different responses to rtPA therapy and the occurrence of rtPA-induced hemorrhagic complications.

Traditionally, candidate gene strategies have been used in pharmacogenetic studies of rtPA. However, recent advancements in genome-wide association studies (GWAS) have suggested that genetic predisposition may have an impact on the response to rtPA.

This study aims to present current findings on genes and genetic variations linked to hemorrhagic transformation and recanalization rates following rtPA therapy in patients with acute ischemic stroke. It also highlights insights provided by a doctoral dissertation titled "Analysis of the association between polymorphisms within genes which regulate fibrinolysis and extracellular matrix integrity with the effects of ischemic stroke therapy with recombinant tissue plasminogen activator". The research contributes to our understanding of how gene variants can affect patient recovery after acute ischemic stroke treated with rtPA therapy.

Key words: pharmacogenetics, ischemic stroke, tissue plasminogen activator

Ishemijski moždani udar

Ishemijski moždani udar (IMU) je praćen visokom incidencijom invaliditeta i mortaliteta širom sveta (1). IMU nastaje usled redukovano, ili potpunog prekida cirkulacije u određenim regionima mozga nakon okluzije krvnog suda embolusom, ili razvojem tromboze in situ (2). Funkcija neurona unutar centralne zone ishemije ireverzibilno je oštećena, za razliku od neurona unutar zone penumbre, smeštene oko centralnog ishemijskog jezgra. U penumbri, neuroni su izmenjene funkcije, ali strukturalno intaktni, pa je još uvek moguće oporaviti njihovu funkciju. Međutim, ukoliko se rekanalizacija ne uspostavi na vreme, dolazi do ireverzibilnog strukturnog i funkcionalnog oštećenja ovih neurona, odnosno ishemijske nekroze i u zoni penumbre, što značajno povećava neurološki deficit tj. stepen invaliditeta (3). IMU predstavlja veoma kompleksno oboljenje u čijem nastanku učestvuju, kako genski, tako i faktori rizika i sredine (4).

Terapija akutnog ishemijskog moždanog udara

U poslednje dve decenije, terapija akutnog IMU (AIMU) fokusira se na smanjenju, a uporedo i sprečavanju dodatnog širenja moždane ishemije sa ciljem postizanja blagovremene rekanalizacije okludirane arterije i reperfuzije ishemijskog tkiva, uspostavljanju kolateralnog krvotoka, kao i sprečavanju sekundarnih oštećenja moždanog tkiva (5). Trombolitička terapija rekombinovanom tkivnim aktivatorom plazminogena (rtPA) zajedno sa mehaničkom ekstrakcijom tromba (trombektomijom) jedine su dozvoljene terapije AIMU u svetu. Međutim, iako je rtPA terapija zlatni standard u lečenju AIMU, benefiti ove terapije često su u senci komplikacija koje za sobom povlači njena primena gde su studije pokazale da je šest do sedam puta povećan rizik od intrakranijalnog krvarenja nakon primene ovog leka, što predstavlja ozbiljno terapijsko ograničenje rtPA terapije (6). Imajući u vidu da se radi o terapiji sa potencijalno izuzetno teškim neželjenim efektima, aplikacija trombolitičke terapije kod pacijenata sa AIMU je strogo regulisana međunarodnim smernicama i protokolima (7,8), striktno vodeći računa o poznavanju tačnog vremena početka prvih simptoma AIMU. Terapijski prozor, vremenski okvir unutar kog se smatra da primena trombolitičke terapije ima veću korist u odnosu na moguće neželjene efekte, iznosi tri do četiri i po sata (9). Takođe, zbog destruktivnog dejstva rtPA na bazalnu membranu i vanćelijski matriks, može doći do popuštanja krvno-moždane barijere (KMB) i najozbiljnije komplikacije trombolitičke terapije- intrakranijalnog krvarenja (10). Hemoragijska transformacija (HT) predstavlja bilo koje krvarenje u regionu ishemije nakon IMU, koje može da varira od mikroskopski vidljivih krvarenja do velikih hemoragija (11), a koja se u 3% slučajeva završava smrtnim ishodom (12). U skladu sa ECASS (*engl.* European Cooperative Acute Stroke Study) II kriterijumima, a na osnovu radiografskih nalaza, HT se može podeliti na hemoragijske infarkte (tip I i II) i parenhimske hematome (tip I i II) (13). Najtežu prezentaciju post-rtPA neželjenih efekata predstavlja simptomatska intrakranijalna hemoragija (sICH) koja se javlja sa učestalošću između 2% i 7% u različitim populacijama, a definisana je kao bilo koji tip intrakranijalne hemoragije povezan sa neurološkim i funkcionalnim pogoršanjem unutar sedam dana od primene trombolitičke terapije, ili dovodi do smrtnog ishoda pacijenta kao direktnim uzrokom (13,14).

Uprkos činjenici da samo mali broj pacijenata sa AIMU primi trombolitičku terapiju, pacijenti u terapijskom prozoru za primenu iste, imaju veće dugoročno preživljavanje i niže stope mortaliteta, kao i bolji funkcionalni oporavak (15) i značajno poboljšan kvalitet života nakon IMU (16). Međutim, kod 40% pacijenata rekanalizacija se uopšte ne uspostavi, ili se uspostavi kada je već došlo do ireverzibilnog oštećenja neurona (17). Duže vreme potrebno za rekanalizaciju nakon primene rtPA u visokoj je korelaciji sa veličinom infarktne lezije, posledično sa lošijim neurološkim ishodom i lošijim oporavkom nakon AIMU (18). Efikasnost rtPA terapije ogleda se u brzini i obimu rekanalizacije zahvaćenog krvnog suda. Sa druge strane, efikasnost rtPA terapije je smanjena usled pojave neželjenih efekata, kao što su HT, reokluzija krvnog suda, neurološka ekscitotoksičnost ili oštećenja KMB koja vode dodatnom oštećenju moždanog parenhima (19).

U cilju poboljšanja sigurnosti i ishoda terapije rekombinovanim tkivnim aktivatorom plazminogena, sve je veće interesovanje za pronalazak novih biomarkera, kao potencijalnih prediktora HT i drugih neželjenih ishoda ove terapije. Identifikacija faktora koji predviđaju efikasnost rtPA bila bi značajna za tretman pacijenata sa IMU, posebno onih za koje se ispostavi da nemaju odgovarajući odgovor na rtPA, jer kod ovih pacijenata, primena rtPA sa dodatnim koadjuvantim lekovima mogla bi biti efikasnija nego lečenje samo sa rtPA.

Genetička osnova ishemijskog moždanog udara

Studije asocijacije kompletnog genoma (*engl.* Genome wide association studies- GWAS) potvrdile su oko 30 genskih lokusa povezanih sa nastankom IMU, podtipovima IMU, kao i ishodima nakon IMU. Osim njih, i studije ispitivanja gena kandidata, metode sekvenciranja nove generacije (*engl.* Next generation sequencing- NGS), kao i metode sekvenciranja celog genoma (*engl.* Whole genome sequencing- WGS) doprinele su ovim saznanjima. Uz pomoć navedenih molekularno-genetičkih metoda moguće je pronaći potencijalne gene povezane sa različitim bolestima, među kojima je i IMU (20). Sa druge strane, brojne studije ukazale su na postojanje genetičkih osnova u efektima rtPA terapije, oporavku pacijenata nakon primene iste, ali i komplikacijama nakon navedene terapije.

Farmakogenetika

Farmakogenetika predstavlja modernu disciplinu koja se bazira na otkrivanju individualnih genskih varijanti koje utiču na efikasnost ili toksičnost lekova (21,22). Primarni cilj farmakogenetike je detekcija onih pacijenata za koje je veća verovatnoća da će imati koristi od određene intervencije korišćenjem njihovih genetičkih informacija za odabir odgovarajućeg tretmana lečenja. Farmakogenetika ima za cilj da iskoristi ovo znanje za razvoj personalizovanih pristupa medicine, prilagođavajući izbor lekova i njihovo doziranje genskom profilu pojedinca. Razumevanjem genskog profila pacijenta, mogao bi se optimizovati izbor lečenja, poboljšati terapijski ishod i smanjiti neželjene reakcije nakon primene konkretnog leka (23). Farmakogenetika AIMU se bazira na ispitivanju polimorfizama različitih gena kako bi se utvrdio njihov uticaj na šarenolik odgovor na rtPA terapiju kod pacijenata sa AIMU. Razlozi zašto se kod određenog broja pacijenata razvije HT, kao i zašto neki pacijenti bolje, a drugi lošije odgovore na rtPA terapiju su brojni, ali i dalje nisu do kraja razjašnjeni. Poznavanje faktora rizika i patofizioloških mehanizama HT nakon trombolitičke terapije mogu da smanje rizik od nastanka ove komplikacije kod pacijenata u riziku (24). Usled velikih interindividualnih varijacija u odgovoru na primljenu trombolitičku terapiju, farmakogenetika se sve više fokusira na ispitivanje uticaja genskih varijanti nakon primene pomenute terapije za lečenje IMU, imajući u vidu da su već neke SNP (*engl.* Single Nucleotide Polymorphism - SNP) varijante povezane sa odgovorom na rtPA terapiju, tokom same bolesti, ali i javljanjem hemoragijskih komplikacija nakon primljene trombolitičke terapije (25).

Iako je opisana ogromna interindividualna varijabilnost u odgovoru na rtPA terapiju kod pacijenata sa AIMU (26), ne tako veliki broj studija se bavio farmakogenetikom rtPA. Nekoliko studija udruženosti gena kandidata i samo jedna GWAS korišćene su za ispitivanje moguće povezanosti različitih polimorfizama i odgovora na rtPA terapiju, ili pojavu neželjenih efekata nakon primene pomenute terapije.

Geni povezani sa efektima rtPA terapije AIMU

Klinički ishod nakon IMU je veoma raznolik i zavisi od mnogo faktora (27) među kojima su starost pacijenta, vreme započinjanja terapije, lokalizacija zahvaćenog dela mozga, kao i težina IMU (28). Do funkcionalnog oporavka nakon IMU može se doći brzo, a može da traje mesecima i godinama. Takođe, stepen

oporavka može značajno da varira od potpunog oporavka do trajne i teške onesposobljenosti ili smrtnog ishoda. Procena ishoda je, prema tome, veoma teška i nepouzdana i zavisi od više faktora, sa nejasnim ili ograničenim uticajem. Uticaj genetičke varijabilnosti na mogućnost i stepen funkcionalnog oporavka nakon IMU sve je više u žiži interesovanja. U načelu, studije koje su se bavile ovom tematikom svoja istraživanja najčešće su delila u dva segmenta: ispitivanje povezanosti polimorfnih genskih varijanti i odgovorom na rtPA terapiju, odnosno stepenom rekanalizacije zahvaćenog krvnog suda sa jedne strane i povezanosti SNP varijanti sa pojavom neželjenih efekata nakon primene rtPA terapije, sa druge strane.

Polimorfne genske varijante povezane sa odgovorom na rtPA terapiju i stepenom rekanalizacije nakon rtPA

Svega par studija su ispitivale stepen rekanalizacije zahvaćenog cerebralnog krvnog suda kod pacijenata lečenih rtPA terapijom nakon AIMU. Najverovatniji razlog za mali broj ovih studija je kompleksnost i potreba za adekvatnom aparaturom i stručnim kadrom u bolnicama, imajući u vidu da se ovo ispitivanje ne radi rutinski. Ipak, postoji nekoliko studija koje su analizirale povezanost genske predispozicije i stepena rekanalizacije nakon rtPA terapije kod pacijenata sa AIMU.

Studija koja je analizirala I/D polimorfizam *ACE* gena otkrila je da su pacijenti, nosioci DD genotipa, imali bolji stepen rekanalizacije u poređenju sa pacijentima drugih genotipova nakon AIMU. Dodatno, u istoj studiji je pronađena pojava hemoragijskih komplikacija nakon rtPA terapije, ali statistička značajnost nije potvrđena (29).

Trombinom aktivirani inhibitor fibrinolize (TAFI) je molekul koji direktno povezuje procese koagulacije i fibrinolize i koji utiče na stopu rekanalizacije. Supstitucija aminokiseline Thr325Ile u kodirajućem regionu *TAFI* gena povećava njegovu aktivnost (30,31). Dva funkcionalna polimorfizma inhibitora fibrinolize, *TAFI* (-1040 C/T- rs1926447) i *PAI-1* (4G/5G- rs1799889) gena, ukazala su na značaj gen-gen interakcije jer kombinacija genotipova (*TAFI* TT homozigoti i osobe sa *PAI-1* 4G alelom) ova dva polimorfizma povećava rizik za rezistenciju na rekanalizaciju nakon primene rtPA terapije (32).

Jedna od najvećih studija koja je ispitivala stepen rekanalizacije okludiranog krvnog suda nakon primene rtPA terapije kod pacijenata sa AIMU obuhvatala je 497 pacijenata, a ispitivala je 140 SNP varijante (33). Tri polimorfizma, dva unutar *IL-1 β* gena (rs1143627 i rs16944) i jedan unutar *vWF* gena (rs1063856), ukazali su na njihovu povezanost sa stepenom rekanalizacije nakon rtPA. Dok je IL-1 β proinflamatorni citokin, protein kodiran *vWF* genom važan je, kako u procesu hemostaze kao antihemofilni faktor, tako i u adheziji trombocita za zid krvnog suda u procesu koagulacije (33). Osobe sa TC haplotipom *IL-1 β* gena (rs1143627 i rs16944) imale su veće vrednosti IL-1 β u plazmi i visok stepen rekanalizacije jedan sat nakon rtPA administracije. Takođe, uočena je značajna povezanost GG genotipa rs1063856 polimorfizma *vWF* gena i nižih vrednosti faktora koagulacije VIII sa bržom rekanalizacijom kod pacijenata nakon IMU.

Sve farmakogenetičke studije o rekanalizaciji su se uglavnom fokusirale na sistem koagulacije/fibrinolize, međutim, još uvek nisu sprovedene nepristrasne studije na nivou genoma u ovoj oblasti. Upravo bi GWAS mogle dati informacije o novim genskim varijantama koje su povezane sa revaskularizacijom kod pacijenata koji su tretirani rtPA, a da to nisu bile varijante izabrane iz studija gena kandidata.

Polimorfne genske varijante povezane sa pojavom hemoragijskih komplikacija nakon rtPA terapije

Za razliku od malobrojnih studija koje su direktno pratile stepen rekanalizacije nakon primene rtPA, u literaturi se može pronaći nešto veći broj studija koje su ispitivale efikasnost ove terapije, odnosno funk-

cionalni oporavak pacijenata nakon pomenute terapije, kao i pojavu neželjenih efekata, prvenstveno hemoragijskih, nakon primene iste.

Veliki broj genetičkih studija je bio usmeren na ispitivanje povezanosti funkcionalnih polimorfizama unutar gena čiji produkti učestvuju u koagulaciji i odgovoru na rtPA terapiju, kao i pojavu neželjenih efekata nakon primene iste.

Faktor XIII (FXIII) predstavlja važan element u koagulacionoj kaskadi. Njegova uloga se ogleda u dodatnoj stabilizaciji tromba tako što formira poprečne veze unutar njega, što otežava njegovu razgradnju (30,34). Val34Leu polimorfizam *FXIII* gena proučavan je u različitim kardiovaskularnim bolestima, međutim, njegova uloga nije najjasnija usled oprečnih rezultata (34,35). Kada se radi o IMU, neke studije su ukazale da je alel Leu faktor rizika, kako za hemoragijski, tako i za ishemijski moždani udar (36), međutim, druge studije nisu ovo potvrdile (37). Studija koja je ispitala uticaj ovog polimorfizma na pojavu neželjenih efekata rtPA terapije uočila je da su pacijenti sa Val/Val genotipom ređe imali sICH u poređenju sa nosiocima Leu alela. Štaviše, pacijenti sa Val/Val genotipom su imali nižu stopu mortaliteta. Dodatno, Val/Val genotip Val34Leu polimorfizma *FXIII* gena zajedno sa nižim vrednostima fibrinogena u krvi (<3,6 g/l) povezan je sa boljim oporavkom pacijenata sa IMU lečenih rtPA terapijom i nižim mortalitetom (38). Sa druge strane, u nedavno sprovedenoj studiji nije uočena asocijacija Val34Leu, ali ni drugih polimorfizama *FXIII* gena i pojave HT (39). Međutim, u istoj studiji, nivoi FXIII u plazmi su bili povezani sa smrtnošću nakon rtPA terapije.

Inhibitor aktivatora plazminogena-1 (PAI-1) predstavlja glavni inhibitor endogene fibrinolitičke aktivnosti tako što se vezuje za tkivni aktivator plazminogena (tPA), zajedno formirajući neaktivan kompleks (40). Interakcija između primarnog medijatora fibrinolize- tPA i njegovog inhibitora- PAI-1 direktno reguliše stvaranje ili razgradnju tromba (41). U poslednjih nekoliko godina 4G/5G polimorfizam *PAI-1* gena je najčešće analiziran *PAI-1* polimorfizam, kako kod različitih cerebrovaskularnih oboljenja, uključujući IMU, tako i kod brojnih drugih oboljenja kao što su infarkt miokarda (42), trombofilije (43), spontani pobačaji (44) i drugi. *PAI-1* 4G/5G polimorfizam je povezan sa nivoom PAI-1 u plazmi, tako što je 4G alelna varijanta u vezi sa višim koncentracijama PAI-1 u plazmi (45). Dodatno, studije *in vivo* su pokazale da osobe homozigoti za 4G alel imaju najviše nivoe PAI-1 u plazmi, dok su kod osoba homozigota za 5G alel ovi nivoi najniži (46). Viši nivoi PAI-1 u plazmi uočeni su kod osoba sa IMU (47).

Studija sprovedena na 165 pacijenata sa IMU, ukazala je na moguću povezanost 4G/4G genotipa sa lošijim oporavkom pacijenata sa IMU lečenih rtPA. U pomenutoj studiji oporavak pacijenata je procenjivan na osnovu skora modifikovane Rankin skale (mRS) i stepena rekanalizacije. Sa druge strane, u istoj studiji povezanost genotipova 4G/5G polimorfizma i pojave rtPA indukovane HT je izostala (48). Saglasno sa ovim rezultatima, studija na 94 pacijenta koju su sproveli Dušanović Pjević i saradnici, takođe, nije potvrdila povezanost 4G/5G polimorfizma *PAI-1* gena i oporavka pacijenata nakon IMU kao ni pojave HT kod pacijenata sa AIMU lečenih rtPA terapijom (49). Sa druge strane, Szegedi i saradnici su u svojoj studiji, koja je uključila 131 uzastopna pacijenta sa IMU lečenih rtPA, uočili povezanost 4G/5G polimorfizma *PAI-1* gena i pojave HT (50). Međutim, u istoj studiji nisu uočili povezanost ovog polimorfizma sa oporavkom pacijenata nakon IMU, niti sa nivoima PAI-1 u plazmi.

Drugi inhibitori rtPA, kao što je neuroserpin, povezivani su sa pojavom parenhimskog hematoma (PH) (51). Neuroserpin je prirodni inhibitor tPA koji je eksprimiran u moždanom tkivu. Nivoi neuroserpina pre rtPA bili su povezani sa javljanjem PH i sa funkcionalnim oporavkom nakon moždanog udara u grupi od 80 pacijenata sa IMU. Međutim, ne postoje farmakogenetičke studije koje su analizirale pojedinačne polimorfne varijante unutar gena koji kodira neuroserpin i efikasnosti rtPA, već samo studije gena kandidata koje ana-

liziraju ulogu SNP varijanti unutar gena za neuroserpin i rizika za nastanak IMU kod osoba mlađe starosne dobi (52).

Pored faktora koji direktno učestvuju u koagulaciji, a koji se mogu dovesti u vezi sa efikasnošću rtPA terapije, ili pojavom neželjenih efekata nakon primene iste, postoje i drugi faktori koji nisu u direktnoj vezi sa koagulaciono/fibrinoliznim sistemom, a koji bi, takođe, mogli da utiču na ishod rtPA terapije.

Angiotenzin konvertujući enzim (ACE) katalizuje transformaciju angiotenzina I u angiotenzin II. Predstavlja značajan enzim u renin-angiotenzin-aldosteron (RAAS) i kinin-kalikrein sistemu (53). ACE ima značajnu ulogu u vaskularnom remodelovanju, aterosklerozi, razvoju hipertenzije i cerebrovaskularnih bolesti, uključujući IMU (54–56). U intronu 16 ACE gena, smešten je inserciono/delecioni (I/D) polimorfizam koji utiče na nivo ACE u krvi (57) budući da je D alel navedenog polimorfizma povezan sa višim nivoima ACE u plazmi. Alel D je takođe povezan sa višim nivoima PAI-1 u krvi (58,59), a posledično je povezan sa slabijim stepenom rekanalizacije nakon rtPA terapije (59). Fernández-Cadenas sa saradnicima ispitivao je I/D polimorfizam u odnosu na pojavu HT i stepenom rekanalizacije kod pacijenata sa IMU lečenih rtPA terapijom, ali nisu uočili povezanost ovog polimorfizma i pojave HT (29). Suprotno ovim rezultatima, u nešto skorijoj studiji koju su sprovedli Dusanovic Pjevic i saradnici uočena je povezanost I/D polimorfizma ACE gena i pojave HT kod pacijenata lečenih rtPA nakon AIMU (49).

Broderick sa saradnicima je u svojoj studiji ispitivao *ApoE* gen i uočio je da je efikasnost rtPA terapije bila bolja kod osoba sa *ApoE* E2 genotipom (60).

Del Rio-Espinola sa saradnicima je sproveo kompleksnu studiju u kojoj su korišćeni kliničko genetički podaci sa ciljem da se predvidi pojava HT kod pacijenata sa IMU nakon primene rtPA (61). U ovoj studiji autori su analizirali 140 SNP varijanti iz 97 gena kandidata kod 1172 pacijenata koji su lečeni rtPA terapijom. Među ovim polimorfizmima posebno se istakao Val1000Ile (rs669) polimorfizam unutar gena za alfa-2-makroglobulin koji je povezan sa nastankom HT, kao i rs1801020 polimorfizmom unutar gena koji kodira FXII. Autori su koristili genetičke informacije i kliničke podatke za generisanje rezultata za predviđanje HT. Koristeći logističku regresiju, odabrali su značajne i nezavisne varijable koje su uključili u rezultat. Ovaj rezultat nazvan i Genot-PA, povezan sa HT, nezavisno je ponovljen u drugoj studiji koja je koristila kohortu od 1324 pacijenta (61). Autori ove studije su ispitivali polimorfizme koje je studija Del Rio-Espinola izdvojila kao polimorfizme od interesa (rs669 i rs1801020) zajedno sa kliničkim varijablama za predikciju HT. Rezultat druge studije bio je u saglasnosti sa rezultatima studije Del Rio-Espinola i saradnika, a dodatno je urađena i predikcija za pojavu HT kod pacijenata lečenih trombektomijom. Ove poslednje dve studije su pokazale potencijalnu potrebu za upotrebom genetike u kombinaciji sa kliničkim podacima kako bi se predvideo efekat rtPA terapije. Međutim, zaključci autora obe navedene studije su da je potrebno da se dobijeni genetički rezultati poboljšaju i dodatno ispituju pre implementacije u kliničku praksu.

Ravnoteža između matriks metaloproteinaza (MMP) i njihovih tkivnih inhibitora (*engl.* Tissue inhibitor of metalloproteinases- TIMP) je veoma značajna. Narušavanje ove ravnoteže dovodi do nekontrolisane aktivnosti MMP i razgradnje proteina vanćelijskog matriksa u različitim patološkim stanjima (62), a kod IMU dovodi do narušavanja KMB što za posledicu može imati hemoragijske komplikacije (63).

Studija koju su sprovedli Inzitari i saradnici analizirala je povezanost nivoa MMP (1-3 i 7-9) i TIMP (1, 2, 4) u plazmi i oporavka pacijenata sa IMU lečenih rtPA terapijom. Studija je uključila 327 pacijenata sa IMU lečenih rtPA terapijom, dok su nivoi MMP i TIMP mereni pre terapije i 24h nakon njene primene. Jedino su se povišeni cirkulišući nivoi MMP-9 pokazali kao nezavisni prediktor lošeg oporavka pacijenata, pojave HT i smrtnog ishoda (64). Nekoliko studija je ukazalo na povezanost nivoa matriks metaloproteinaze 9 u plazmi

i HT nakon rtPA terapije (65,66). Unutar *MMP-9* gena opisano je nekoliko funkcionalnih polimorfizama koji utiču na ekspresiju *MMP-9* gena i posledično na nivo ovog enzima. Polimorfizam -1562 C/T nalazi se u promotorskom regionu *MMP-9* gena. Uočeno je da T alel ovog polimorfizma povećava aktivnost promotora i posledično povećava ekspresiju *MMP-9* gena (67). Imajući u vidu ulogu *MMP-9* nakon IMU sa jedne strane, i da se radi o funkcionalnom polimorfizmu koji utiče na različitu ekspresiju *MMP-9* gena sa druge strane, nekoliko studija je ispitivalo uticaj ovog polimorfizma i pojave neželjenih efekata nakon trombolitičke terapije. Iako većina literaturnih podataka ukazuju da je povećan nivo *MMP-9* povezan sa lošijom prognozom kod osoba sa IMU i javljanjem HT, kao i da je koncentracija iRNK *MMP-9* prediktor lošeg oporavka i većeg mortaliteta kod pacijenata sa IMU (68), podaci o povezanosti polimorfizma unutar *MMP-9* gena i funkcionalnog oporavka nakon IMU lečenog rtPA i dalje su nejasni, ali i nedovoljno istraženi (69). Najskorija studija koju su sprovedi Dusanovic Pjevic i saradnici nije otkrila povezanost između *MMP-9*-1562C/T polimorfizma i pojave HT (70) što je u saglasnosti sa rezultatima studija Montaner i saradnika (71) i Fernández-Cadenas i saradnika (72), koji, takođe, nisu uspeali da pronađu asocijaciju između genotipova pomenutog polimorfizma i javljanja HT kod pacijenata sa IMU lečenim rtPA. Dodatno, studija koju su sprovedi Fernández-Cadenas i saradnici, pored toga što je imala veći broj pacijenata u odnosu na prethodne dve pomenute studije, analizirala je sve funkcionalne polimorfizme unutar *MMP-9* gena i autori nisu uspeali da pronađu povezanost ispitivanih polimorfizama *MMP-9* gena i pojave HT, ili bilo koje HT podgrupe pojedinačno (72). Sa druge strane, Dusanovic Pjevic i saradnici (70) su u svojoj studiji daljom analizom unutar podgrupa hemoragijske transformacije, uočili da postoji statistički značajna razlika u učestalosti genotipova *MMP-9*-1562 C/T polimorfizma između pacijenata sa i bez parenhimskog hematoma tip 2 (PH-2). Osobe sa PH-2 statistički značajno češće su imale TT genotip ispitivanog polimorfizma. U istoj studiji je uočena statistički značajna razlika u učestalosti genotipova *MMP-9*-1562 C/T polimorfizma između pacijenata sa i bez neke druge intrakranijalne hemoragije. Osobe kod kojih se razvila neka druga intrakranijalna hemoragija (proširena iz ishemičnih hemoragija - intraventrikularna krvarenja ili SAH) nakon rtPA terapije statistički značajno češće su imale TT genotip ispitivanog polimorfizma. Međutim, potrebne su dodatne studije, na većem broju pacijenata u različitim etničkim grupama kako bi se pravi zaključak o uticaju ovog polimorfizma i pojave hemoragijskih komplikacija nakon rtPA terapije mogao doneti.

Sve navedene studije su se bavile ispitivanjem povezanosti gena kandidata koji bi potencijalno mogli da utiču na oporavak pacijenata nakon IMU lečenih rtPA terapijom. Međutim, uspeh ovih studija je bio veoma skroman. Bezbednost (javljanje HT) i efikasnost (rekanalizacija) rtPA terapije snažno je povezana sa dugoročnim ishodom (invaliditetom) nakon IMU. GWAS je ispitala dugoročni ishod nakon IMU, koristeći mRS skor tri i šest meseci nakon prvih simptoma IMU. Studija o genetičkom doprinosu u funkcionalnom oporavku i invaliditetu nakon moždanog udara (GODs), bila je prva GWAS koja je analizirala dugoročni ishod nakon IMU (73). U studiju je bilo uključeno 2482 pacijenata sa IMU, u koju su bili uključeni pacijenti lečeni sa i bez rtPA, i gde je uočena povezanost između genskih varijanti unutar *PATJ* gena i lošijeg oporavku nakon IMU. Protein kodiran *PATJ* genom povezan je sa integritetom KMB, čije narušavanje nakon IMU je blisko povezano sa pojavom HT nakon trombolize (73).

Jedina GWAS izvedena kod pacijenata sa IMU koji su primili rtPA terapiju objavljena je nedavno (74). Autori su analizirali parenhimske hematome prateći ECASS kriterijume u kohorti pacijenata sa AIMU lečenih rtPA, dok su pacijenti kojima je dodatno urađena trombektomija bili isključeni iz studije. Do danas, ova studija obuhvatila je najveću kohortu pacijenata lečenih rtPA i genetičkim podacima ($n=1904$). Polimorfna varijanta (rs76484331) unutar *ZBTB46* gena bila je povezana sa PH ($n=1324$, $p=1,61 \times 10^{-8}$), a zatim je potvrđena i u nezavisnom uzorku ($n=580$, $p=0,01$). Protein kodiran ovim genom predstavlja faktor transkripcije ekspri-

miran u moždanom tkivu. Zanimljivo je da je poligenski skor rizika generisan u kohorti otkrića sa 3506 genskih varijanti povezanih sa PH, takođe, povezan sa stepenom invaliditeta i mortaliteta u trećem mesecu nakon AIMU procenjeno mRS skorom. Najznačajnija povezanost bila je u odnosu na dugoročni oporavak (invaliditet u trećem mesecu, $p=1,51 \times 10^{-6}$) koji je ostao značajan nakon logističke regresije uključujući inicijalni skor neurološkog deficita (NIHSS), pol i starost ($p=0,01$) (74). Uzimajući u obzir rezultate GODs projekta i podatke o PH iz GWAS, primećeno je da pojava HT i oporavak nakon IMU zavise od određenih genskih faktora rizika i bioloških mehanizama na koje bi trebalo posebno obratiti pažnju i dodatno i detaljnije proučavati u budućim istraživanjima.

Zaključak

Farmakogenetičke studije koje se bave ispitivanjem uticaja rtPA terapije na oporavak pacijenata i pojavu neželjenih efekata nakon primene ove terapije kod pacijenata sa AIMU sprovode se unazad dve decenije. Većina ovih studija se bazirala na ispitivanju polimorfničkih varijanti unutar različitih gena, uglavnom koristeći strategije gena kandidata, dok je sprovedena samo jedna GWAS kojoj je ovo bio primarni cilj istraživanja, dok je druga GWAS sa istim ciljem još uvek u toku. Iako nema dovoljno podataka, GWAS su ukazale da bi genetička pozadina mogla da utiče na odgovor pacijenta na rtPA terapiju. Konkretno, cerebralna krvarenja nakon rtPA terapije mogu biti posledica genskih faktora rizika. Pored toga, stepen rekanalizacije/revaskularizacije bi, takođe, mogao biti povezan sa genskim faktorima rizika. Međutim, samo nekoliko studija, na nedovoljnom broju ispitanika, proučavale su genske faktore i upravo ovaj mali broj uključenih pacijenata predstavlja najveći problem i nedostatak svih rtPA farmakogenetičkih studija, ali treba uzeti u obzir da veoma mali broj pacijenata sa AIMU zadovoljava sve kriterijume za primenu rtPA terapije.

U perspektivi farmakogenetičkih rtPA studija potrebno je uključivanje što većeg broja istraživanja sa ciljem pronalaženja genskih modulatora rtPA terapije. Štaviše, podaci dobijeni GWAS, takođe, mogu se koristiti za razumevanje bioloških mehanizama povezanih sa odgovorom na rtPA terapiju. Dodatno, patofiziološki mehanizmi nastanka hemoragijske transformacije nakon trombolitičke terapije ili odsustvo rane revaskularizacije nakon rtPA još uvek nisu u potpunosti razjašnjeni. Analize signalnih puteva, genskih interakcija i Mendelova randomizacija su analize koje koriste podatke dobijene iz GWAS i koje bi mogle da razjasne biološke mehanizme povezane sa efektima rtPA terapije. Iako se čini da genetika može igrati značajnu ulogu u efikasnosti rtPA terapije kod pacijenata nakon AIMU, za implementaciju farmakogenetike u kliničku praksu potrebni su dosta bolji prediktivni modeli, ali i brzi uređaji i aparatura za određivanje genotipova polimorfizama od interesa.

Zahvalnica

Ovaj rad je podržalo Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Srbije (projekti br. 175087 i 175091).

Literatura

1. Feigin VL, Roth GA, Naghavi M, Parmar P, Krishnamurthi R, Chugh S, et al. Global burden of stroke and risk factors in 188 countries, during 1990–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet Neurol.* 2016;15(9):913–24.
2. Sacco RL, Kasner SE, Broderick JP, Caplan LR, Connors JJ, Culebras A, et al. An updated definition of stroke for the 21st century: A statement for healthcare professionals from the American heart association/American stroke association. *Stroke.* 2013;44(7):2064–89.
3. Astrup J. Energy-requiring cell functions in the ischemic brain. Their critical supply and possible inhibition in protective therapy. *J Neurosurg.* 1982;56(4):482–97.
4. Boehme AK, Esenwa C, Elkind MSV. Stroke Risk Factors, Genetics, and Prevention. *Circ Res.* 2017;120(3):472–95.
5. Rabinstein AA. Treatment of Acute Ischemic Stroke. *Contin Lifelong Learn Neurol.* 2017;23(1):62–81.
6. Whiteley WN, Emberson J, Lees KR, Blackwell L, Albers G, Bluhmki E, et al. Risk of intracerebral haemorrhage with alteplase after acute ischaemic stroke: a secondary analysis of an individual patient data meta-analysis. *Lancet Neurol.* 2016;15(9):925–33.
7. Powers WJ, Rabinstein AA, Ackerson T, Adeoye OM, Bambakidis NC, Becker K, et al. 2018 Guidelines for the Early Management of Patients With Acute Ischemic Stroke: A Guideline for Healthcare Professionals From the American Heart Association/American Stroke Association. Vol. 49, *Stroke.* 2018. 46–110 p.
8. Čovićković Šternić N, Beslač Bumbaširević L, Žarkov M, Raičević R, Tončev G, Živković M, et al. Nacionalni vodič dobre kliničke prakse- Ishemijski moždani udar. Agencija za akreditaciju zdravstvenih ustanova Srbije. 2012.
9. Del Zoppo GJ, Saver JL, Jauch EC, Adams HP. Expansion of the time window for treatment of acute ischemic stroke with intravenous tissue plasminogen activator: A science advisory from the American heart association/american stroke association. *Stroke.* 2009;40(8):2945–8.
10. Zaheer Z, Robinson T, Mistri AK. Thrombolysis in acute ischaemic stroke: An update. *Ther Adv Chronic Dis.* 2011;2(2):119–31.
11. Jickling GC, Liu D, Stamova B, Ander BP, Zhan X, Lu A, et al. Hemorrhagic transformation after ischemic stroke in animals and humans. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2014;34(2):185–99.
12. Kane I, Sandercock P. Alteplase: Thrombolysis for acute ischemic stroke. *Therapy.* 2005;2(5):709–16.
13. Larrue V, Von Kummer R, Müller A, Bluhmki E. Risk factors for severe hemorrhagic transformation in ischemic stroke patients treated with recombinant tissue plasminogen activator: A secondary analysis of the European-Australasian Acute Stroke Study (ECASS II). *Stroke.* 2001;32(2):438–41.
14. Strbian D, Sairanen T, Meretoja A, Pitkaniemi J, Putaala J, Salonen O, et al. Patient outcomes from symptomatic intracerebral hemorrhage after stroke thrombolysis. *Neurology.* 2011;77(4):341–8.
15. Muret W, Rudd A, Wolfe CDA, Douiri A. Long-term survival after intravenous thrombolysis for ischemic stroke: A propensity score-matched cohort with up to 10-year follow-up. *Stroke.* 2018;49(3):607–13.
16. Boudreau DM, Guzauskas GF, Chen E, Lalla D, Tayama D, Fagan SC, et al. Cost-effectiveness of recombinant tissue-type plasminogen activator within 3 hours of acute ischemic stroke: Current evidence. *Stroke.* 2014;45(10):3032–9.
17. Sheehan JJ, Tsirka SE. Fibrin-modifying serine proteases thrombin, tPA, and plasmin in ischemic stroke: a review. *Glia.* 2005;50(4):340–50.
18. Adams H, Bendixen B, Kappelle L, Biller J, Love B, Gordon D, et al. Classification of subtype of acute ischemic stroke. Definitions for use in a multicenter clinical trial. TOAST. Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment. *Stroke.* 1993;24(1):35–41.
19. Mican J, Toul M, Bednar D, Damborsky J. Structural Biology and Protein Engineering of Thrombolytics. *Comput Struct Biotechnol J.* 2019;17:917–38.
20. Malik R, Chauhan G, Traylor M, Sargurupremraj M, Okada Y, Mishra A, Rutten-Jacobs L, Giese AK, van der Laan SW, Gretarsdottir S, Anderson CD, Chong M, Adams HHH, Ago T, Almgren P, Amouyel P, Ay H, Bartz TM, Benavente OR, Bevan S, Boncoraglio GB, Brown RD YSAfgCC for H and AR in GE (CHARGE) C. Multiancestry genome-wide association study of 520,000 subjects identifies 32 loci associated with stroke and stroke subtypes. *Nat Genet.* 2018;50(4):524–37.
21. Relling M, Evans WE. Pharmacogenomics in the clinic. *Nature.* 2015;526(7573):343–50.
22. Billeci AM, Agnelli G, Caso V. Stroke pharmacogenomics. *Expert Opin Pharmacother.* 2009;10(18):2947–57.
23. Verbelen M, Weale ME, Lewis CM. Cost-effectiveness of pharmacogenetic-guided treatment: Are we there yet? *Pharmacogenomics J.* 2017;17(5):35–402.

24. Lansberg MG, Albers GW, Wijman CAC. Symptomatic intracerebral hemorrhage following thrombolytic therapy for acute ischemic stroke: A review of the risk factors. *Cerebrovasc Dis.* 2007;24(1):1–10.
25. National Institute of Neurological Disorders and Stroke rt-PA Stroke Study Group. Tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke. *N Engl J Med.* 1995;333(24):1581–7.
26. Brott T, Broderick J, Kothari R, O'Donoghue M, Barsan WG, Tomsick T, et al. Tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke. *N Engl J Med.* 1995;333:1581–8.
27. Zaleska MM, Mercado MLT, Chavez J, Feuerstein GZ, Pangalos MN, Wood A. The development of stroke therapeutics: Promising mechanisms and translational challenges. *Neuropharmacology.* 2009;56(2):329–41.
28. Pekna M, Pekny M, Nilsson M. Modulation of neural plasticity as a basis for stroke rehabilitation. *Stroke.* 2012;43(10):2819–28.
29. Fernández-Cadenas I, Molina CA, Álvarez-Sabín J, Ribó M, Penalba A, Ortega-Torres L, et al. ACE gene polymorphisms influence t-PA-induced brain vessel reopening following ischemic stroke. *Neurosci Lett.* 2006;398(3):167–71.
30. Valnickova, Zuzana Enghild JJ. Human procarboxypeptidase U, or thrombin-activable fibrinolysis inhibitor, is a substrate for transglutaminases: Evidence for transglutaminase-catalyzed cross-linking to fibrin. *J Biol Chem.* 1998;273(42).
31. Brouwers G-J, Vos HL LF. A novel, possibly functional, single nucleotide polymorphism in the coding region of the thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) gene is also associated with TAFI levels. 2001;98(6):1992–3.
32. Fernandez-Cadenas I, Alvarez-Sabin J, Ribo M, Rubiera M, Mendioroz M, Molina CA, et al. Influence of thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor and plasminogen activator inhibitor-1 gene polymorphisms on tissue-type plasminogen activator-induced recanalization in ischemic stroke patients. *J Thromb Haemost.* 2007;5(9):1862–8.
33. Fernández-Cadenas I, Del Río-Espínola A, Giralte D, Domingues-Montanari S, Quiroga A, Mendióroz M, et al. IL1B and VWF variants are associated with fibrinolytic early recanalization in patients with ischemic stroke. *Stroke.* 2012;
34. Hancer VS, Diz-Kucukkaya R, Bilge AK, Ozben B, Oncul A, Ergen G, et al. The association between factor XIII Val34Leu polymorphism and early myocardial infarction. *Circ J.* 2006;70(3):239–42.
35. Canavy I, Henry M, Morange PE, Tired L, Poirier O, Ebagosti A, et al. Genetic polymorphisms and coronary artery disease in the south of France. *Thromb Haemost.* 2000;83(2):212–6.
36. Catto AJ, Kohler HP, Bannan S, Stickland M, Carter A, Grant PJ. Factor XIII Val 34 Leu A Novel Association With Primary Intracerebral Hemorrhage. *Stroke.* 1998;29(4):813–6.
37. Slowik A, Dziedzic T, Pera J, Figlewicz DA, Szczudlik A. Coagulation factor XIII Val34Leu polymorphism in patients with small vessel disease or primary intracerebral hemorrhage. *Cerebrovasc Dis.* 2005;19(3):165–70.
38. González-Conejero R, Fernández-Cadenas I, Niesta JA, Marti-Fabregas J, Obach V, Alvarez-Sabín J, et al. Role of fibrinogen levels and factor XIII V34L polymorphism in thrombolytic therapy in stroke patients. *Stroke.* 2006;37(9):2288–93.
39. Székely EG, Czuriga-Kovács KR, Bereczky Z, Katona É, Mezei ZA, Nagy A, et al. Low factor XIII levels after intravenous thrombolysis predict short-term mortality in ischemic stroke patients. *Sci Rep.* 2018;8(1):1–9.
40. Lijnen HR. Pleiotropic functions of plasminogen activator inhibitor-1. *J Thromb Haemost.* 2005;3(1):35–45.
41. Vaughan DE. Plasminogen activator inhibitor-1 and the calculus of mortality after myocardial infarction. *Circulation.* 2003;108(4):376–7.
42. Abboud N, Ghazouani L, Saidi S, Ben-Hadj-Khalifa S, Addad F, Almawi WY, et al. Association of PAI-1 4G/5G and -844G/A gene polymorphisms and changes in PAI-1/tissue plasminogen activator levels in myocardial infarction: a case-control study. *Genet Test Mol Biomarkers.* 2010;14(1):23–7.
43. Sartori MT, Danesin C, Saggiorato G, Tormene D, Simioni P, Spiezia L, et al. The PAI-1 gene 4G/5G Polymorphism and Deep Vein Thrombosis in Patients with Inherited Thrombophilia. *Clin Appl Thromb.* 2003;9(4):299–307.
44. Goodman CS, Coulam CB, Jeyendran RS, Acosta VA, Roussev R. Which thrombophilic gene mutations are risk factors for recurrent pregnancy loss? *Am J Reprod Immunol.* 2006;56(4):230–6.
45. Vergouwen MD, Frijns CJ, Roos YB, Rinkel GJ, Baas F, Vermeulen M. Plasminogen activator inhibitor-1 4G allele in the 4G/5G promoter polymorphism increases the occurrence of cerebral ischemia after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Stroke.* 2004;35(6):1280–3.
46. Festa A, D'Agostino R, Rich SS, Jenny NS, Tracy RP, Haffner SM. Promoter (4G/5G) plasminogen activator inhibitor-1 genotype and plasminogen activator inhibitor-1 levels in blacks, hispanics, and non-hispanic whites: The Insulin Resistance Atherosclerosis Study. *Circulation.* 2003;107(19):2422–7.

47. Margaglione M, Di Minno G, Grandone E, Vecchione G, Celentano E, Cappucci G, et al. Abnormally high circulation levels of tissue plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor-1 in patients with a history of ischemic stroke. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1994;14(11):1741–5.
48. Fernandez-Cadenas I, Del Río-Espinola A, Rubiera M, Mendioroz M, Domingues-Montanari S, Cuadrado E, et al. PAI-1 4G/5G polymorphism is associated with brain vessel reocclusion after successful fibrinolytic therapy in ischemic stroke patients. *Int J Neurosci.* 2010;120(4):245–51.
49. Dušanović Pjević M, Beslac Bumbaširević L, Vojvodić L, Grk M, Maksimović N, Damjanović T, et al. Analysis of the Association Between Polymorphisms within PAI-1 and ACE genes and Ischemic Stroke Outcome After rt-PA Therapy. *J Pharm Pharm Sci.* 2019;22(1):142–9.
50. Szegedi I, Nagy A, Székely EG, Czuriga-Kovács KR, Sarkady F, Láncki LI, et al. PAI-1 5G/5G genotype is an independent risk of intracranial hemorrhage in post-lysis stroke patients. *Ann Clin Transl Neurol.* 2019;6(11):2240–50.
51. Rodríguez-González R, Millán M, Sobrino T, Miranda E, Brea D, de la Ossa NP, Blanco M, Perez J, Dorado L, Castellanos M, Lomas DA, Moro MA, Dávalos A CJ. The natural tissue plasminogen activator inhibitor neuroserpin and acute ischaemic stroke outcome. *Thromb Haemost.* 2011;105(3):421–9.
52. Cole JW, Naj AC, O'Connell JR, Stine OC, Sorkin JD, Wozniak MA, et al. Neuroserpin polymorphisms and stroke risk in a biracial population: The stroke prevention in young women study. *BMC Neurol.* 2007;7:1–7.
53. Nakai K, Itoh C, Miura Y, Hotta K, Musha T, Itoh T, et al. Deletion polymorphism of the angiotensin I-converting enzyme gene is associated with serum ACE concentration and increased risk for CAD in the Japanese. *Circulation.* 1994;90(5):2199–202.
54. Yuan H, Wang X, Xia Q, Ge P, Wang X, Cao X. Angiotensin converting enzyme (I/D) gene polymorphism contributes to ischemic stroke risk in Caucasian individuals: A meta-analysis based on 22 case-control studies. *Int J Neurosci.* 2016;126(6):488–98.
55. Morishita R, Gibbons GH, Ellison KE, Lee W, Zhang L, Yu H, et al. Evidence for direct local effect of angiotensin in vascular hypertrophy. In vivo gene transfer of angiotensin converting enzyme. *J Clin Invest.* 1994;94(3):978–84.
56. Raynolds M V., Bristow MR, Bush EW, Abraham WT, Lowes BD, Zisman LS, et al. Angiotensin-converting enzyme DD genotype in patients with ischaemic or idiopathic dilated cardiomyopathy. *Lancet.* 1993;342(8879):1073–5.
57. Rigat B, Hubert C, Alhenc-Gelas F, Cambien F, Corvol P, Soubrier F. An insertion/deletion polymorphism in the angiotensin I-converting enzyme gene accounting for half the variance of serum enzyme levels. *J Clin Invest.* 1990;86(4):1343–6.
58. Margaglione M, Grandone E, Vecchione G, Cappucci G, Giuliani N, Colaizzo D, et al. Plasminogen Activator Inhibitor-1 (PAI-1) Antigen Plasma Levels in Subjects Attending a Metabolic Ward: Relation to Polymorphisms of PAI-1 and Angiotensin Converting Enzyme (ACE) Genes. 1997;1:2082–7.
59. Kim DK, Kim JW, Kim S, Gwon HC, Ryu JC, Huh JE, et al. Polymorphism of angiotensin converting enzyme gene is associated with circulating levels of plasminogen activator inhibitor-1. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997;17(11):3242–7.
60. Broderick J, Lu M, Jackson C, Pancioli A, Tilley BC, Fagan SC, et al. Apolipoprotein E phenotype and the efficacy of intravenous tissue plasminogen activator in acute ischemic stroke. *Ann Neurol.* 2001;49(6):736–44.
61. Del Río-Espínola A, Fernández-Cadenas I, Giralto D, Quiroga A, Gutiérrez-Agulló M, Quintana M, et al. A predictive clinical-genetic model of tissue plasminogen activator response in acute ischemic stroke. *Ann Neurol.* 2012;72(5):716–29.
62. Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: Structure, function, and biochemistry. *Circ Res.* 2003;92(8):827–39.
63. Rosenberg GA, Estrada EY, Dencoff JE. Matrix metalloproteinases and TIMPs are associated with blood-brain barrier opening after reperfusion in rat brain. *Stroke.* 1998;29(10):2189–95.
64. Inzitari D, Giusti B, Nencini P, Gori AM, Nesi M, Palumbo V, et al. MMP9 variation after thrombolysis is associated with hemorrhagic transformation of lesion and death. *Stroke.* 2013;44(10):2901–3.
65. Castellanos M, Sobrino T, Millán M, García M, Arenillas J, Nombela F, et al. Serum cellular fibronectin and matrix metalloproteinase-9 as screening biomarkers for the prediction of parenchymal hematoma after thrombolytic therapy in acute ischemic stroke: A multicenter confirmatory study. *Stroke.* 2007;38(6):1855–9.
66. Montaner J, Molina CA, Monasterio J, Abilleira S, Arenillas JF, Ribó M, et al. Matrix metalloproteinase-9 pretreatment level predicts intracranial hemorrhagic complications after thrombolysis in human stroke. *Circulation.* 2003;107(4):598–603.
67. Zhang B, Ye S, Herrmann SM, Eriksson P, De Maat M, Evans A, et al. Functional polymorphism in the regulatory region of gelatinase B gene in relation to severity of coronary atherosclerosis. *Circulation.* 1999;99(14):1788–94.
68. Graham CA, Chan RW, Chan DY, Chan CP, Wong LK, Rainer TH. Matrix metalloproteinase 9 mRNA: An early prognostic marker for patients with acute stroke. *Clin Biochem.* 2012;45(4–5):352–5.

69. Manso H, Krug T, Sobral J, Albergaria I, Gaspar G, Ferro JM, et al. Variants of the Matrix Metalloproteinase-2 but not the Matrix Metalloproteinase-9 genes significantly influence functional outcome after stroke. *BMC Med Genet*. 2010;11:40.
70. Dusanovic Pjevic M, Jekic B, Beslac Bumbasirevic L, Vojvodic L, Damnjanovic T, Grk M, et al. TT genotype of the MMP-9-1562C/T polymorphism may be a risk factor for thrombolytic therapy-induced hemorrhagic complications after acute ischemic stroke. *Pharmacotherapy*. 2021;41(7):562–71.
71. Montaner J, Fernández-Cadenas I, Molina CA, Monasterio J, Arenillas JF, Ribó M, et al. Safety profile of tissue plasminogen activator treatment among stroke patients carrying a common polymorphism (C-1562T) in the promoter region of the matrix metalloproteinase-9 gene. *Stroke*. 2003;34(12):2851–5.
72. Fernández-Cadenas I, Del Río-Espínola A, Carrera C, Domingues-Montanari S, Mendióroz M, Delgado P, et al. Role of the MMP9 gene in hemorrhagic transformations after tissue-type plasminogen activator treatment in stroke patients. *Stroke*. 2012;43(5):1398–400.
73. Mola-Caminal M, Carrera C, Soriano-Tárraga C, Giralt-Steinhauer E, Díaz-Navarro RM, Tur S, et al. PATJ Low Frequency Variants Are Associated with Worse Ischemic Stroke Functional Outcome: A Genome-Wide Meta-Analysis. *Circ Res*. 2019;124(1):114–20.
74. Carrera C, Cárcel-Márquez J, Cullell N, Torres-Águila N, Muiño E, Castillo J, et al. Single nucleotide variations in ZBTB46 are associated with post-thrombolytic parenchymal haematoma. *Brain*. 2021;144(8):2416–26.

Beta-adrenergički receptori i kinaze uključene u proces njihove nishodne regulacije u eksperimentalnom modelu kardiomiopatije izazvane doksorubicinom

Marija Kosić, Zorica Nešić, Nina Žigon

Institut za farmakologiju, kliničku farmakologiju i toksikologiju, Medicinski fakultet

Univerziteta u Beogradu

Kontakt: marija.d.matic@med.bg.ac.rs

Apstrakt

Doksorubicin je efikasan lek u terapiji brojnih maligniteta. Međutim, njegovu upotrebu umnogome ograničava nastanak kardiotoksičnosti, koja može dovesti do kongestivne srčane insuficijencije. Mehanizmi doksorubinske kardiotoksičnosti nisu sasvim razjašnjeni, a kada dođe do kongestivne srčane insuficijencije, stopa smrtnosti je približno 50%. Iako specifična terapija ne postoji, efikasnost su pokazali antagonisti beta-adrenergičkih receptora (β -AR). U srčanoj insuficijenciji je pokazano da kompenzatorno povećan tonus simpatikusa i cirkulišućih kateholamina dovodi do selektivne nishodne regulacije β_1 -AR, što dalje smanjuje kontraktilnu snagu srca. U procesima desenzitizacije i nishodne regulacije β -AR, važnu ulogu imaju kinaze G protein-spregnutih receptora (GRK) i arestini. Utvrđeno je da je GRK2 ushodno regulisana u nekim eksperimentalnim modelima srčane insuficijencije i da njena inhibicija sprečava štetno remodelovanje srčanog tkiva. Ovaj rad daje pregled rezultata istraživanja β -AR i procesa njihove nishodne regulacije, kao i uticaja inhibicije GRK2 na remodelovanje srca u kardiomiopatiji izazvanoj doksorubicinom.

Ključne reči: doksorubicin, kardiotoksičnost, beta-adrenergički receptor, GRK2

Beta-adrenergic receptors and kinases involved in the process of their downregulation in experimental model of cardiomyopathy induced by doxorubicin

Marija Kosić, Zorica Nešić, Nina Žigon

Institute of Pharmacology, Clinical Pharmacology and Toxicology, Faculty of Medicine, University of Belgrade

Correspondence: marija.d.matic@med.bg.ac.rs

Abstract

Doxorubicin is an effective drug for the treatment of numerous malignancies. However, its use is greatly hampered by the occurrence of cardiotoxicity, which can lead to congestive heart failure. The mechanisms of doxorubicin cardiotoxicity are not fully understood, and when congestive heart failure occurs, the mortality rate is approximately 50%. Although there is no specific treatment for doxorubicin cardiotoxicity, beta-adrenergic receptor (β -AR) antagonists have limited efficacy. In heart failure, compensatory increased sympathetic tone and circulating catecholamines lead to selective downregulation of β_1 -AR, which further reduces the contractile force of the heart. G protein-coupled receptor kinases (GRKs) and arrestins play an important role in the processes of desensitization and downregulation of β -AR. GRK2 has been found to be up-regulated in some experimental models of heart failure and its inhibition prevents harmful remodeling of cardiac tissue. This paper provides the findings on β -AR and the process of their downregulation, as well as on the effects of GRK2 inhibition on cardiac remodeling in doxorubicin-induced cardiomyopathy.

Key words: doxorubicin, cardiotoxicity, beta-adrenergic receptor, GRK2

KARDIOMIOPATIJA IZAZVANA DOKSORUBICINOM

Sinteza doksorubicina iz bakterijskog soja *Streptomyces peucetius subsp. caesi*us šezdesetih godina prošlog veka smatra se prekretnicom u lečenju solidnih i hematoloških maligniteta i kod odraslih i kod dece [1]. Međutim, doksorubicin nije selektivan za tumorske i druge visokoproliferativne ćelije, već se velikim afinitetom vezuje i za srčane ćelije i dovodi do njihovog oštećenja [2]. Kardiotoksičnost predstavlja ozbiljno neželjeno dejstvo, koje umnogome ograničava onkološku primenu doksorubicina i može dovesti do kongestivne srčane insuficijencije [3].

Akutna kardiotoksičnost nastaje kod oko 11% pacijenata tokom primene doksorubicina ili nekoliko dana po prestanku primene leka [3]. Pretpostavlja se da je u osnovi njenog nastanka edem srca [3], a najčešće se manifestuje različitim poremećajima srčanog ritma [4]. Čini se da veći zdravstveni problem predstavlja hronična tzv. odložena kardiotoksičnost, koja se najčešće javlja tokom mesec dana od prestanka primene leka, ali je njena pojava moguća i 10 godina po prestanku terapije doksorubicinom [3]. Neke retrospektivne studije pokazuju da više od polovine tretiranih bolesnika razvija lakši oblik disfunkcije leve komore srca tokom šest godina nakon prekida terapije doksorubicinom [5]. Činjenica da često nema pravovremene dijagnoze ni adekvatne prevencije i terapije, čini doksorubicinsku kardiomiopatiju smrtonosnom bolešću. Kada se razvije kongestivna srčana insuficijencija, mortalitet je približno 50% [3].

Mehanizmi nastanka odložene doksorubicinske kardiomiopatije nisu sasvim razjašnjeni. U osnovi kardiotoksičnog delovanja su slični mehanizmi kojima doksorubicin ispoljava željeno antitumorsko dejstvo (Slika 1): inhibicija topoizomeraze II β i poremećaj replikacije DNK, geneza slobodnih radikala, stvaranje kompleksa sa gvožđem, oštećenje ćelijske membrane, poremećaj transporta unutarćelijskih jona i sledstvena aktivacija signalnih puteva koji dovode do ćelijske smrti [6]. U našem istraživanju iz 2021. godine ispitivali smo promene u ekspresiji gena važnih za strukturno remodelovanje srca i inflamatorni odgovor, a koji bi mogli biti pod uticajem toksičnih doza doksorubicina [7]. Bolje razumevanje fenotipske heterogenosti doksorubicinske kardiomiopatije, moglo bi dovesti do otkrića novih molekularnih meta kardioprotektivne terapije [7].

S obzirom da su terapijske mogućnosti doksorubicinske kardiomiopatije ograničene i često neefikasne, u prvi plan se stavlja prevencija toksičnih oštećenja srca. Deksraksozan je jedini kardioprotektivni agens odobren od strane Američke uprave za hranu i lekove (engl. *Food and drug administration* – FDA) za doksorubicinsku kardiotoksičnost [6]. Kao helator gvožđa, deksrazoksan sprečava stvaranje izuzetno reaktivnog hidroksil radikala, ali i vezivanje doksorubicina za topoizomerazu II β i na taj način dovodi do inhibicije replikacije DNK u srčanim ćelijama [8]. Ostale preventivne opcije nisu specifične i obuhvataju procenu srčane funkcije pre započinjanja terapije, ograničenje kumulativne doze doksorubicina [4] i primenu nano formulacija doksorubicina, čime se lek selektivnije doprema u tumorsko tkivo [9].

Ne postoji specifična terapija za doksorubicinsku kardiomiopatiju. U kliničkoj praksi najčešće se koriste kombinacije antagonista beta-adreneričkih receptora (β -AR) i inhibitora angiotenzin-konvertujućeg enzima, koje su se pokazale najefikasnijim u sprečavanju srčanog oštećenja [10]. Odavno se u pitanje dovodi neselektivna blokada β -AR koja, iako štiti srce od prekomerene kateholaminske stimulacije sprovednog sistema, smanjuje snagu kontrakcije već oslabljenog srčanog mišića [11]. Zbog toga je važno istraživati signalne puteve specifične za određeni podtip β -AR i njihove potencijalne kliničke implikacije [12].

BETA-ADRENERGIČKI RECEPTORI U ZDRAVOM SRCU I SRČANOJ INSUFICIJENCIJI

Efekti simpatičkog nervnog sistema na srce, povećanje snage srčane kontrakcije i sprovodljivosti, primarno su posredovani β_1 -AR, dok stimulacija β_2 -AR doprinosi dodatnom povećanju srčane frekvence i kontraktilnosti [13]. Odnos β_1 -AR: β_2 -AR u zdravom srcu iznosi približno 75:25% u korist β_1 -AR [14]. Ekspresija β_3 -AR neznatna je u fiziološkim uslovima, ali se smatra da može biti povećana kod oštećenja miokarda različite etiologije. Pokazano je da β_3 -AR manje podležu procesima desenzitizacije i nishodne regulacije i da njihova stimulacija dovodi do kardioprotektivnih efekata, poput antihipertrofičnog i antioksidativnog efekta [15].

Svi podtipovi β -AR strukturno su veoma slični i pripadaju G protein-spregnutim receptorima (engl. *G protein coupled receptors* – GPCR) [13]. Ovim receptorima veliku funkcionalnu raznolikost omogućuju različiti G proteini, preko kojih se pokreće mnoštvo signalnih puteva sa najrazličitijim efektima unutar ćelije [16]. Iako su u fiziološkim uslovima β -AR primarno vezani za stimulatorni G protein (G_s), pokazano je da β_2 -AR u patološkim stanjima mogu aktivirati inhibitorni G_i signalni put i dovesti do relaksacije srčane mišićne ćelije [17]. U srčanoj insuficijenciji, kompenzatorno povećana aktivnost simpatičkog nervnog sistema i kateholaminska stimulacija β -AR dovodi do selektivne nishodne regulacije β_1 -AR, pa se odnos β_1 -AR: β_2 -AR menja na približno 50:50% [11]. Međutim, pored ovoga, u srčanoj insuficijenciji favorizovana je inhibitorna G_i signalna kaskada preko β_2 -AR, što dodatno štiti srce od kardiotoksičnih efekata prevelike kateholaminske stimulacije [18].

Zanimljivo je da β_1 -AR i β_2 -AR učestvuju u signalnim putevima sa suprotnim efektima na sudbinu srčane mišićne ćelije (Slika 2). Naime, na neonatalnim kardiomiocitima pacova [19] i adultnim kardiomiocitima miševa [20], pokazano je da stimulacija β_1 -AR pokreće proapoptotske signalne puteve. Sa druge strane, stimulacija β_2 -AR spregnutih sa G_i štiti srčane ćelije od apoptoze [17]. Podela β -AR na „kardiotoksične“ β_1 -AR i „kardioprotektivne“ β_2 -AR u nastanku srčane insuficijencije smatra se kontroverznom i uprošćenom. Na ulogu β -AR u patofiziološkom procesu utiče, ne samo etiološki faktor koji je doveo do srčane insuficijencije (ishemija, opterećenje pritiskom, toksini), već i dužina trajanja patološkog procesa (akutni/hronični) [11]. Ipak, poznavanje signalnih puteva specifičnih za određeni podtip β -AR moglo bi otkriti potencijalne nove mete u terapiji srčane insuficijencije.

BETA-ADRENERGIČKI RECEPTORI U DOKSORUBICINSKOJ KARDIOMIOPATIJU

U različitim eksperimentalnim modelima kardiomiopatije izazvane doksorubicinom dobijeni su oprečni rezultati ekspresije β_1 -AR i β_2 -AR [21, 22, 23] što bismo mogli objasniti razlikama u eksperimentalnim životinjama, dozi doksorubicina, doznom režimu i načinu aplikacije leka. U našim prethodnim istraživanjima [7, 24] ekspresija gena za β_1 -AR i β_2 -AR nije bila promenjena, u skladu sa nalazom nepromenjene gustine ovih receptora iz istraživanja Robisona i Girija na subkutanom modelu doksorubicinske kardiomiopatije [23]. Međutim, iako je gustina β -AR ostala očuvana, pokazan je smanjen afinitet β -AR za kateholamine i posledično smanjena kontraktilna snaga srčanog mišića [23].

U našem istraživanju iz 2019. godine, na peritonealnom modelu doksorubicinske kardiomiopatije kod pacova *Wistar* soja, u kompenzovanoj fazi kardiomiopatije (35 dana nakon aplikacije doksorubicina) izmerena je povećana ekspresija gena za β_1 -AR, dok se ekspresija gena za β_2 -AR nije statistički značajno promenila [22]. U dekompenzovanoj fazi kardiomiopatije (70 dana nakon aplikacije doksorubicina) nismo izmerili značajne promene genske ekspresije β_1 -AR i β_2 -AR [22]. „Prolazno“ povećanje ekspresije gena za β_1 -AR moglo bi sugerisati da su oni odgovorni za povećanu osetljivost srčanog mišića na kateholamine i povećani varijabilitet srčane frekvencije, dobijen u ovom istraživanju [22]. Ovakvi nalazi u skladu su sa

rezultatima studija na β_1 -AR $-/-$ nokaut miševima, β_2 -AR $-/-$ nokaut miševima i dvostrukim β_1 -AR / β_2 -AR $-/-$ nokaut miševima [25, 26], koji pokazuju da β_1 -AR posreduju u kardiotoksičnim mehanizmima doksorubicina, dok β_2 -AR imaju zaštitnu ulogu. Takođe, povećana ekspresija β_1 -AR mogla bi biti ključna za razvoj hipertrofične kardiomiopatije [26, 27, 28], koja često prethodi sistolnoj disfunkciji srca tj. dilataciji [21].

Studija na *Sprague-Dawley* pacovima tretiranim sa 6 intraperitonealnih injekcija u dozi 2,5 mg/kg doksorubicina, pokazala je remodelovanje ekspresije i funkcije β -AR. Tri nedelje nakon poslednje injekcije doksorubicina, genska i proteinska ekspresija β_3 -AR bila je nepromenjena, dok je u kasnijoj fazi kardiomiopatije (nakon 70 dana) ekspresija β_3 -AR bila smanjena [21], što nije u skladu sa rezultatima Sun i saradnika [29]. Pokazana je povećana proteinska ekspresija β_2 -AR 35. dana nakon prve doksorubicinske injekcije, dok je proteinska ekspresija β_1 -AR bila smanjena i 35. i 70. dana nakon prve doksorubicinske injekcije [21], u skladu sa promenjenim odnosom β_1 -AR: β_2 -AR u srčanoj insuficijenciji [30]. Zanimljivo je da smanjena β_1 -AR ekspresija u ranoj fazi kardiomiopatije nije oštetila funkciju ovih receptora, što se može objasniti nepromenjenom ekspresijom Gsa i povećanom ekspresijom adenilat-ciklaze [21]. Ovakav rezultat je u kontrastu sa nalazima izmenjene signalne transdukcije preko β -AR sa smanjenom aktivnošću adenilat-ciklaze na različitim modelima doksorubicinske kardiomiopatije [31, 32]. Pojačana β_2 -AR/ G_s signalizacija povezana je sa očuvanom kontraktilnom funkcijom srca u studiji Merlet i saradnika, ali je i dalje nejasno da li ovo predstavlja koristan kompenzatorni ili štetni mehanizam [21].

S obzirom da i ekspresija gena za β -AR i njihova nishodna regulacija mogu menjati gustinu receptora na srčanim ćelijama, deo našeg istraživanja posvetili smo merenju ekspresije ključnih molekula uključenih u procese desenzitizacije i nishodne regulacije GPCR: kinaza GPCR (engl. *G protein-coupled receptor kinase* – GRK) i arestina [33].

KINAZE G PROTEIN-SPREGNUTIH RECEPTORA

GRK predstavljaju veliku porodicu serin/treonin-kinaza i, zajedno sa arestinima, učestvuju u procesu nishodne regulacije različitih GPCR [34]. Pored ove tzv. kanonske uloge u desenzitizaciji i internalizaciji GPCR, pokazano je da su ove kinaze uključene u brojne interakcije sa signalnim proteinima u ćeliji i da imaju mnogostruke efektorske uloge, nezavisno od GPCR [35].

Najzastupljenije GRK u srčanom tkivu su kinaze β -AR (GRK2 i GRK3) (Slika 3) i membranske kinaze GRK5 i GRK6 (Yi i saradnici, 2005). Citoplazmatski proteini GRK2 i GRK3 fosforilišu GPCR aktivirane agonistima, na reziduama serina i treonina i omogućavaju vezivanje arestina 2 (β -arestin 1) i arestina 3 (β -arestin 2) [36]. Arestini se velikim afinitetom vezuju jedino za receptore okupirane agonistima i fosforilisane ovim kinazama, i vrše sternu inhibiciju vezivanja G proteina [36]. Takođe, oni predstavljaju adapterske proteine za povezivanje sa elementima endocitotskog kompleksa i tako učestvuju u klatrinom posredovanoj internalizaciji fosforilisanog receptora [35] (Slika 4). Dalja sudbina receptora može biti njegova degradacija u lizozomima ili vraćanje na površinu ćelijske membrane – recikliranje receptora. Smatra se da upravo od jačine arestin-receptor interakcije zavisi u kom će smeru ići sudbina receptora (klasa A i klasa B GPCR) [37]. Receptori iz klase A (npr. β_2 -AR) internalizuju u ćeliju procesom endocitoze posredovane klatrinskim vezikulama, ali se brzo disociraju od arestina 2, „recikliraju“ i vraćaju na površinu ćelijske membrane. Sa druge strane, klasa B GPCR (npr. receptor za angiotenzin tip 1A, receptor za vazopresin tip V2) sa jednakim afinitetom aktivira arestin 1 i arestin 2 te dolazi do formiranja stabilnih kompleksa unutar endocitotske vezikule i degradacije receptora [37].

Membranske kinaze GRK5 i GRK6 fosforilišu receptore okupirane agonistom i, za razliku od GRK2 i GRK3, stimulišu arestinom-posredovanu signalnu transdukciju u ćeliji, pre nego arestinom-posredovanu desenzi-

tizaciju i internalizaciju receptora [38]. GRK2 se često označava kao interaktom jer moduliše različite efekte na nivou ćelije, nezavisno od fosforilacije GPCR [34] (Slika 5). Stupajući u interakcije sa mnogobrojnim proteinima uključenim u signalne kaskade, GRK2 kontroliše produkciju hemokina [39], učestvuje u procesima organizacije citoskeleta i migracije ćelija [40], ali i inhibira apoptozu posredovanu faktorom transformacije rasta beta (engl. *transforming growth factor beta* – TGF- β) [14]. Činjenica da je GRK2 „čvor“ signalne mreže u srčanoj ćeliji i da promene njene ekspresije i/ili aktivnosti mogu imati važne efekte na razvoj kardiovaskularnih bolesti kod ljudi, čini ovu kinazu potencijalno važnim dijagnostičkim markerom i terapijskom metom [34].

GRK2 i GRK3 U DOKSORUBICINSKOJ KARDIOMIOPATIJU

U tkivu srca citosolna GRK2 predstavlja najzastupljeniju izoformu i glavni je regulator srčane kontraktilnosti i frekvencije posredovane β -AR [41]. GRK3 izgleda ima veći afinitet za endotelinske receptore i alfa-adrenergički receptor 1 ($\alpha 1$ -AR), što ovu kinazu čini primarnim kontrolorom signalnih puteva rasta i preživljavanja kardiomiocita [42].

Pre našeg istraživanja, jedino su Sun i saradnici na modelu doksorubicinske kardiomiopatije ispitivali kako kastracija i terapija testosteronom utiču na β -AR i proces njihove nishodne regulacije [29]. Međutim, u drugim modelima srčane insuficijencije kod životinja [41, 43] i ljudi [44], signalni put nishodne regulacije β -AR više je izučavan i izmerena je povećana ekspresija GRK2. Smatra se da povećana aktivnost simpatičkog nervnog sistema u srčanoj insuficijenciji predstavlja rani okidač za porast GRK2, koji dovodi do desenzitizacije i nishodne regulacije β -AR i tako štiti srce od toksičnih efekata kateholamina [45]. Ovo predstavlja odbrambeni mehanizam samo u početnoj fazi bolesti, dok dugotrajna desenzitizacija β -AR i smanjenje njihovog broja na membrani kardiomiocita uzrokuju slabljenje kontraktilne snage srca i dalje propadanje srčanog mišića [46]. Kao regulator signalne transdukcije u ćeliji, nezavisno od fosforilacije β -AR, GRK2 može proizvesti dodatne štetne efekte u srčanoj insuficijenciji poput aktivacije proapoptotskih signalnih kaskada [47], poremećaja unutarćelijskog prometa Ca^{2+} [48] i smanjenog preuzimanja glukoze u kardiomiocite [49].

U našem istraživanju nismo izmerili promene u ekspresiji gena za GRK2, GRK3, arestin 2 i arestin 3 kod pacova tretiranih doksorubicinom koji su razvili dilatacionu kardiomiopatiju (engl. *dilated cardiomyopathy* – DCM) [24]. Međutim, kod pacova sa hipertrofičnom kardiomiopatijom (engl. *hypertrophic cardiomyopathy* – HCM), statistički je značajno bila povećana genska ekspresija i imunoreaktivnost GRK2 i GRK3 u srčanom tkivu [24]. Kako je u HCM ekspresija β -AR ostala nepromenjena, a srčana funkcija očuvana (nepromenjena ejekciona frakcija leve komore), može se pretpostaviti da porast genske ekspresije i sinteze GRK2 nije povezan sa nishodnom regulacijom β -AR, već da ima neke nekanonske funkcije u ćeliji [24]. Ovakav nalaz u skladu je sa otkrićem da GRK2 pokreće signalni put važan za nastanak hipertrofije kardiomiocita, potencijajući aktivnost ključnog hipertrofičnog faktora – nuklearnog faktora aktiviranih T ćelija (engl. *nuclear factor of activated T-cells* – NFAT) [41]. Pokazana snažna povezanost između ekspresije GRK2 i relativne debljine zida miokarda, merene ehokardiografski, u našem istraživanju dodatno govori u prilog da povećana ekspresija i sinteza GRK2 doprinose nastanku hipertrofične kardiomiopatije [24]. I povećana ekspresija GRK3 mogla bi imati ulogu u signalnim putevima rasta kardiomiocita, nezavisnim od β -AR, a u skladu sa prethodnim istraživanjem na transgenim miševima [42].

INHIBICIJA GRK2 KAO POTENCIJALNA TERAPIJSKA MOGUĆNOST U PREVENCIJI I LEČENJU DOKSORUBICINSKE KARDIOMIOPATIJE

Pored toga što se povećan nivo GRK2 smatra novim ranim biomarkerom srčane insuficijencije kod ljudi [50], inhibicija ove kinaze mogla bi predstavljati terapijsku metu sa potencijalno značajnim uticajem na progresiju i ishod ovog oboljenja [51]. Tome u prilog govore rezultati različitih istraživanja u kojima je primena GRK2 inhibitora sprečila štetno remodelovanje miokarda i povećala preživljavanje eksperimentalnih životinja [51, 52], poboljšala metaboličke funkcije, organizaciju i funkciju mitohondrija i kontraktilni odgovor srčane mišićne ćelije [53]. GRK2 se navodi i kao nova obećavajuća meta u terapiji srčane hipertrofije [41], koja često prethodi dilataciji i padu ejekcione frakcije leve komore srca [21].

Endogeni GRK2 inhibitor (β ARKct) sadrži poslednjih 194 aminokiselina C-terminusa GRK2 i takmiči se sa GRK2 u vezivanju za G $\beta\gamma$ subjedinicu [54]. Kako je GRK2 glavni negativni regulator prokontraktilne signalizacije u miokardu, njenom inhibicijom, obnavlja se srčana inotropna rezerva posredovana β -AR [55, 56]. Pokazano je da je kardiospecifična inhibicija GRK2 transferom gena za β ARKct uz pomoć virusnih vektora, efikasno oporavljala funkciju srca u ćelijskim i animalnim modelima srčane insuficijencije, te je za očekivati bilo da primena selektivnih GRK2 inhibitora potencijalno ima klinički značaj u terapiji kardiovaskularnih oboljenja [57].

Razvoj inhibitora određenih izoenzima GRK otežan je nedostatkom selektivnosti i nepovoljnim farmakokinetičkim osobinama ispitivanih supstanci [57]. Međutim, kristalografska analiza pokazala je da se paroksetin, antidepresiv iz grupe selektivnih inhibitora preuzimanja serotonina (engl. *selective serotonin reuptake inhibitor* – SSRI), vezuje za aktivno mesto GRK2 i inhibira ga sa oko 50 puta većom selektivnošću u odnosu na druge GRK izoforme [58]. Paroksetin je efikasan lek u terapiji depresije, ima dobru bioraspodobilnost nakon oralne primene i povoljna farmakokinetička svojstva [59]. S obzirom na relativno malu molekulska masu, predstavlja dobru polaznu tačku za racionalni dizajn sličnih GRK inhibitora [58]. Različita jedinjenja koja povećavaju tačku topljenja GRK2 i/ili GRK5 ispituju se od strane Konzorcijuma za strukturnu genomiku Univerziteta Oksford i razvijaju kao novi GRK inhibitori [57].

U našem istraživanju kao GRK2 inhibitor koristili smo paroksetin i davali ga pacovima peroralnim putem u dozi od 10mg/0,5 mL/kg/dan, 5 dana pre aplikacije doksorubicina i tokom celog perioda praćenja eksperimentalnih životinja. Doza paroksetina određena je u pilot eksperimentima u našoj laboratoriji, u kojima je pokazano da je paroksetin statistički značajno smanjio gensku ekspresiju GRK2 samo u dozi od 10 mg/kg/dan [24]. Pacovi kod kojih je istovremeno primenjen doksorubicin i GRK2 inhibitor bili su dobrog opšteg stanja, sa medijanom preživljavanja kao kod pacova iz kontrolne grupe, a ehokardiografski nalaz pokazao je očuvanu morfologiju i funkciju leve komore srca [24].

Pokazali smo da paroksetin smanjuje ekspresiju i sintezu GRK2 i GRK3 kod pacova tretiranih doksorubicinom, što bi moglo imati opisane povoljne efekte na progresiju srčane insuficijencije. Inhibicija GRK2 sprečava maladaptivnu desenzitizaciju β -AR, ali i pokretanje signalnog puta hipertrofije srca [41]. Pokazano je da paroksetin dodatno doprinosi smanjujući ekspresiju gena za srčani marker hipertrofije – miozinski teški lanac 7 (engl. *myosin heavy chain 7* – MYH7) i gena za markere fibroze poput faktora rasta vezivnog tkiva (engl. *connective tissue growth factor* – CTGF) i kolagena I [60]. I na izolovanim srčanim ćelijama izmerena je povećana amplituda kontrakcije i izoproterenolom-indukovano skraćanje u prisustvu paroksetina, a tretman paroksetinom pre davanja izoproterenola, značajno je povećao inotropnu rezervu leve komore srca miševa *in vivo* [58]. Smatra se da paroksetin smanjenjem internalizacije β -AR i stabilizacijom njihove aktivnosti poboljšava efekat antagonista β -AR u lečenju srčane insuficijencije kod osoba sa smanjenom osetljivošću na ovu terapiju [60].

U našem istraživanju, paroksetin je povećao gensku ekspresiju i sintezu β_1 -AR i β_2 -AR u srčanom tkivu pacova tretiranih doksorubicinom, što nije uočeno kod pacova tretiranih samo paroksetinom [24]. Ovakav nalaz mogao bi predstavljati zaštitni mehanizam u očuvanju kontraktilne rezerve srca. Ranije studije pokazale su da paroksetin smanjuje cirkulišuće nivoe kateholamina, renina i aldosterona kod spontano hipertenzivnih pacova, kao i da povećava odgovor β -AR na kateholamine [60]. Smanjenje nivoa cirkulišućih kateholamina paroksetinom predstavlja finu neuroendokrinu modulaciju bolesti, uz očuvanje inotropne rezerve srca posredovane β -AR [61].

Naši rezultati pokazuju da kod pacova kotretiranih paroksetinom i doksorubicinom postoji značajna povezanost između genske ekspresije β_1 -AR i GRK2, kao i između β_2 -AR i GRK2, u skladu sa rezultatom iz studije Monto i saradnika [62]. Na osnovu ovih korelacija, moglo bi se pretpostaviti da je GRK2 uglavnom odgovorna za fosforilaciju i posledičnu nishodnu regulaciju β -AR. Činjenica da genska ekspresija GRK3 nije povezana sa ekspresijom ni β_1 -AR ni β_2 -AR, može se tumačiti kao nedostatak zajedničkog regulatornog mehanizma [24].

Moguće je da paroksetin različitim mehanizmima od inhibicije nishodne regulacije β -AR dodatno doprinosi smanjenju doksorubinske kardiotoksičnosti. Na modelu endotelne disfunkcije pokazano je da smanjuje stvaranje superoksidnih radikala u mitohondrijama [63]. S obzirom da GRK2 često označavaju „kinazom smrti“ (engl. *pro-death kinase*) [47, 64] jer pokreće proapoptotske signalne puteve u ćeliji i da je nishodna regulacija GRK2 imala povoljne antiapoptotske efekte usled povećanja nivoa antiapoptotskih proteina poput Bcl-2 i Bcl-xl u srčanom tkivu [64], možemo pretpostaviti da inhibicija GRK2 pod uticajem paroksetina antioksidativnim mehanizmom doprinosi smanjenju kardiotoksičnosti doksorubicina.

ZAKLJUČAK

Kardiotoksičnost doksorubicina predstavlja veliki izazov jer umnogome ograničava njegovu primenu u lečenju maligniteta, a postojeće preventivne i terapijske opcije ograničene su, nespecifične i često neefikasne. Zbog toga je traganje za novim molekularnim metama jedna od strategija povećanja bezbednosti primene doksorubicina. Važna karakteristika kardiomiopatije izazvane doksorubicinom je remodelovanje ekspresije i funkcije β -AR. Selektivna nishodna regulacija β_1 -AR posredovana GRK2 doprinosi štetnom remodelovanju srca pa se inhibicija GRK2 nameće kao nova potencijalna meta sa značajnim uticajem na progresiju i ishod srčane insuficijencije. Primena antidepresiva paroksetina, selektivnog GRK2 inhibitora, ima potencijalne kardioprotektivne efekte kod doksorubinske kardiomiopatije i sugeriše repozicioniranje ovog leka za prevenciju/terapiju doksorubinske kardiomiopatije kod pacijenata sa malignitetima. Činjenica da je depresija čest komorbiditet kod obolelih od tumora, dodatno ohrabruje evaluaciju kardioprotektivnih efekata paroksetina kod onkoloških pacijenata izloženih velikim, kardiotoksičnim dozama doksorubicina.

ZAHVALNICA

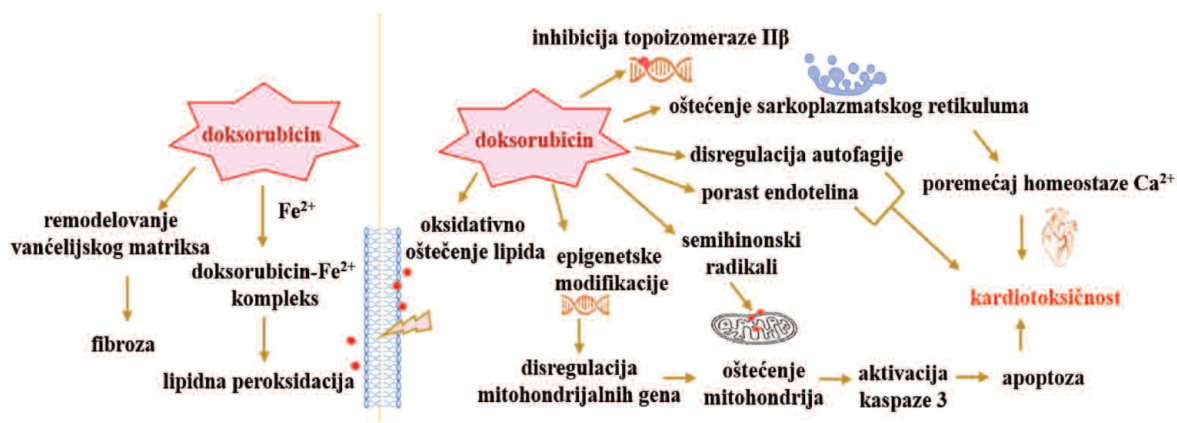
Izrada ovog rada je omogućena zahvaljujući projektu Ministarstva nauke, tehnološkog razvoja i inovacija Republike Srbije broj 200110.

LITERATURA

1. Arcamone F, Cassinelli G, Fantini G, Grein A, Orezzi P, Pol C, et al. Adriamycin, 14-hydroxydaunomycin, a new antitumor antibiotic from *S. peucetius* var. *caesius*. *Biotechnol Bioeng* 1969; 11(6):1101–1110.
2. Wang Y, Probin V, Zhou D. Cancer therapy-induced residual bone marrow injury-Mechanisms of induction and implication for therapy. *Curr Cancer Ther Rev* 2006; 2(3):271-279.
3. Chatterjee K, Zhang J, Honbo N and Karliner JS. Doxorubicin cardiomyopathy. *Cardiology* 2010; 115(2): 155–162.
4. Takemura G, Fujiwara H. Doxorubicin-Induced Cardiomyopathy: From the Cardiotoxic Mechanisms to Management. *Prog Cardiovasc Dis* 2007; 49(5):330-352.
5. Swain SM, Whaley FS, Ewer MS. Congestive heart failure in patients treated with doxorubicin: a retrospective analysis of three trials. *Cancer* 2003; 97(11):2869-2879.
6. Corremans R, Adão R, De Keulenaer GW, Leite-Moreira AF, Brás-Silva C. Update on pathophysiology and preventive strategies of anthracycline-induced cardiotoxicity. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2019; 46(3):204-215.
7. Pajović V, Kováčsházi C, Kosić M, Vasić M, Đukić Lj, Brenner GB, Giricz Z, Bajić D, Ferdinandy P, Japundžić-Žigon N. Phenomapping for classification of doxorubicin-induced cardiomyopathy in rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 2021; 423:115579.
8. Menna P, Salvatorelli E. Primary prevention strategies for anthracycline cardiotoxicity: a brief overview. *Chemotherapy* 2017; 62(3):159–168.
9. Salvatorelli E, Menna P, Cantalupo E, Chello M, Covino E, Wolf FI, et al. The concomitant management of cancer therapy and cardiac therapy. *Biochim Biophys Acta* 2015; 1848(10PtB):2727–2737.
10. Octavia Y, Tocchetti CG, Gabrielson KL, Janssens S, Crijns HJ, Moens AL. Doxorubicin-induced cardiomyopathy: from molecular mechanisms to therapeutic strategies. *J Mol Cell Cardiol* 2012; 52(6):1213-25.
11. Bristow M, Ginsburg R, Umans V, Fowler M, Minobe W, Rasmussen R et al. β 1- and β 2-adrenergic-receptor subpopulations in nonfailing and failing human ventricular myocardium: coupling of both receptor subtypes to muscle contraction and selective down-regulation in heart failure. *Circ Res* 1986; 59:297–309.
12. Xiao RP, Zhu W, Zheng M, Chakir K, Bond R, Lakatta EG, Cheng H. Subtype-specific beta-adrenoceptor signaling pathways in the heart and their potential clinical implications. *Trends Pharmacol Sci* 2004; 25(7):358-65.
13. Bernstein D, Fajardo G, Zhao M. The role of β -adrenergic receptors in heart failure: Differential regulation of cardiotoxicity and cardioprotection. *Prog Pediatr Cardiol* 2011; 31(1): 35–38.
14. Ho D, Yan L, Iwatsubo K, Vatner DE, Vatner SF. Modulation of β -Adrenergic Receptor Signaling in Heart Failure and Longevity: Targeting Adenylyl Cyclase Type 5. *Heart Fail Rev* 2010;15(5): 495–512.
15. Kayki-Mutlu G, Karaomerlioglu I, Arioglu-Inan E, Altan VM. Beta-3 adrenoceptors: A potential therapeutic target for heart disease. *Eur J Pharmacol* 2019; 858:172468.
16. Zhao J, Deng Y, Jiang Z, Qing H. G Protein-Coupled Receptors (GPCRs) in Alzheimer's Disease: A Focus on BACE1 Related GPCRs. *Front Aging Neurosci* 2016; 8:58.
17. Xiao RP, Zhu W, Zheng M, Chakir K, Bond R, Lakatta EG, et al. Subtype-specific beta-adrenoceptor signaling pathways in the heart and their potential clinical implications. *Trends Pharmacol Sci* 2004; 25(7):358-365.
18. Daaka Y, Luttrell LM, Lefkowitz RJ. Switching of the coupling of the beta2-adrenergic receptor to different G proteins by protein kinase A. *Nature* 1997; 390(6655):88-91.
19. Chesley A, Lundberg MS, Asai T, Xiao RP, Ohtani S, Lakatta EG, et al. The beta(2)-adrenergic receptor delivers an antiapoptotic signal to cardiac myocytes through G(i)-dependent coupling to phosphatidylinositol 3'-kinase. *Circ Res* 2000; 87(12):1172-1179.
20. Zhu WZ, Zheng M, Koch WJ, Lefkowitz RJ, Kobilka BK, Xiao RP. Dual modulation of cell survival and cell death by beta(2)-adrenergic signaling in adult mouse cardiac myocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98(4):1607-1612.
21. Merlet N, Piriou N, Rozec B, Grabherr A, Lauzier B, Trochu JN, et al. Increased beta2-adrenoceptors in doxorubicin-induced cardiomyopathy in rat. *Plos One* 8 2013; 8(5): e64711.
22. Vasić M, Lončar-Turukalo T, Tasić T, Matić M, Glumac S, Bajić D, et al. Cardiovascular variability and β -ARs gene expression at two stages of doxorubicin - Induced cardiomyopathy. *Toxicol Appl Pharmacol* 2019; 362:43-51.
23. Robison TW, Giri SN. Effects of chronic administration of doxorubicin on myocardial beta-adrenergic receptors. *Life Sci* 1986; 39(8):731-6.
24. Kosić M, Nešić Z, Glumac S, Vasić M, Pajović V, Savić B, et al. Paroxetine mitigates cardiac remodelling by doxorubicin and increases survival. *Biomed Pharmacother* 2022;145:112411.

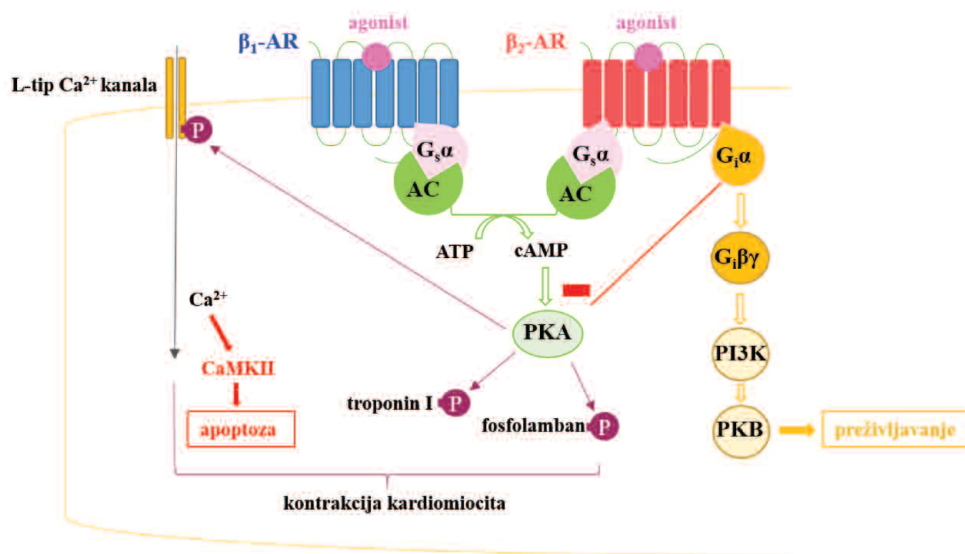
25. Bernstein D, Fajardo G, Zhao M, Urashima T, Powers J, Berry G, et al. Differential cardioprotective/cardiotoxic effects mediated by beta-adrenergic receptor subtypes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005; 289(6):H2441-9.
26. Fajardo G, Zhao M, Powers J, Bernstein D. Differential cardiotoxic/cardioprotective effects of beta-adrenergic receptor subtypes in myocytes and fibroblasts in doxorubicin cardiomyopathy. *J Mol Cell Cardiol* 2006; 40(3):375-83.
27. Milano CA, Allen LF, Rockman HA, Dolber PC, McMinn TR, Chien KR et al. Enhanced myocardial function in transgenic mice overexpressing the beta 2-adrenergic receptor. *Science* 1994; 264(5158):582-6.
28. Engelhardt S, Hein L, Dyachenkow V, Kranias EG, Isenberg G, Lohse MJ. Altered calcium handling is critically involved in the cardiotoxic effects of chronic beta-adrenergic stimulation. *Circulation* 2004; 109(9):1154-60.
29. Sun J, Fu L, Tang X, Han Y, Ma D, Cao J, Kang N, et al. Testosterone modulation of cardiac β -adrenergic signals in a rat model of heart failure. *Gen Comp Endocrinol* 2011; 172(3):518-25.
30. Kenk M, Thackeray JT, Thorn SL, Dhami K, Chow BJ, Ascah KJ, et al. Alterations of pre- and postsynaptic noradrenergic signaling in a rat model of adriamycin-induced cardiotoxicity. *J Nucl Cardiol* 2010; 17(2):254-63.
31. Calderone A, de Champlain J, Rouleau JL. Adriamycin-induced changes to the myocardial beta-adrenergic system in the rabbit. *J Mol Cell Cardiol* 1991; 23(3):333-42.
32. Nagami K, Yoshikawa T, Suzuki M, Wainai Y, Anzai T, Handa S. Abnormal beta-adrenergic transmembrane signaling in rabbits with adriamycin-induced cardiomyopathy. *Jpn Circ J* 1997; 61(3):249-55.
33. Najafi A, Sequeira V, Kuster DWD, van der Velden J. β -adrenergic receptor signalling and its functional consequences in the diseased heart. *Eur J Clin Invest* 2016; 46(4):362-7.
34. Penela P, Murga C, Ribas C, Lafarga V, Mayor Jr F. The complex G protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2) interactome unveils new physiopathological targets. *Br J Pharmacol* 2010; 160(4): 821–832.
35. Reiter E, Lefkowitz RJ. GRKs and beta-arrestins: roles in receptor silencing, trafficking and signaling. *Trends Endocrinol Metab* 2006; 17(4):159-165.
36. Shenoy SK, Lefkowitz RJ. Multifaceted roles of beta-arrestins in the regulation of seven-membrane-spanning receptor trafficking and signalling. *Biochem J* 2003; 375(Pt 3):503-515.
37. Oakley RH, Laporte SA, Holt JA, Caron MG, Barak LS. Differential affinities of visual arrestin, beta arrestin1, and beta arrestin2 for G protein-coupled receptors delineate two major classes of receptors. *J Biol Chem* 2000; 275(22):17201-17210.
38. Kim J, Ahn S, Ren XR, Whalen EJ, Reiter E, Wei H, et al. Functional antagonism of different G protein-coupled receptor kinases for beta-arrestin-mediated angiotensin II receptor signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102(5):1442-1447.
39. Jiménez-Sainz MC, Murga C, Kavelaars A, Jurado-Pueyo M, Krakstad BF, Heijnen CJ, et al. G protein-coupled receptor kinase 2 negatively regulates chemokine signaling at a level downstream from G protein subunits. *Mol Biol Cell* 2006;17(1):25-31.
40. Penela P, Ribas C, Aymerich I, Eijkelkamp N, Barreiro O, Heijnen CJ, et al. G protein-coupled receptor kinase 2 positively regulates epithelial cell migration *EMBO J* 2008; 27(8):1206-1218.
41. Schlegel P, Reinkober J, Meinhardt E, Tscheschner H, Gao E, Schumacher SM, et al. G protein-coupled receptor kinase 2 promotes cardiac hypertrophy. *PLoS One* 2017; 12(7):e0182110.
42. Eckhart AD, Duncan SJ, Penn RB, Benovic JL, Lefkowitz RJ, Koch WJ. Hybrid transgenic mice reveal in vivo specificity of G protein-coupled receptor kinases in the heart. *Circ Res* 2000; 86(1):43-50.
43. Yi XP, Gerdes AM, Li F. Myocyte redistribution of GRK2 and GRK5 in hypertensive, heart-failure-prone rats. *Hypertension* 2002; 39(6):1058-1063.
44. Ungerer M, Böhm M, Elce JS, Erdmann E, Lohse. Altered expression of β -adrenergic receptor kinase and β 1-adrenergic receptors in the failing human heart. *Circulation* 1993; 87(2):454–463.
45. Petrofski JA, Koch WJ. The beta-adrenergic receptor kinase in heart failure. *J Mol Cell Cardiol* 2003; 35(10):1167-1174.
46. Vasić M, Japundžić Žigon N. GRK-2 inhibitor lek kandidat u terapiji srčane insuficijencije. *Srce i krvni sudovi* 2013; 32(4): 304-308.
47. Chen M, Sato PY, Chuprun JK, Peroutka RJ, Otis NJ, Ibeti J, Pan S, et al. Prodeath signaling of G protein-coupled receptor kinase 2 in cardiac myocytes after ischemic stress occurs via extracellular signal-regulated kinase-dependent heat shock protein 90-mediated mitochondrial targeting. *Circ Res* 2013; 112(8):1121-1134.
48. Raake PW, Zhang X, Vinge LE, Brinks H, Gao E, Jaleel N, et al. Cardiac G-protein-coupled receptor kinase 2 ablation induces a novel Ca^{2+} handling phenotype resistant to adverse alterations and remodeling after myocardial infarction. *Circulation* 2012; 125(17):2108-18.
49. Ciccarelli M, Chuprun JK, Rengo G, Gao E, Wei Z, Peroutka RJ, et al. G protein-coupled receptor kinase 2 activity impairs cardiac glucose uptake and promotes insulin resistance after myocardial ischemia. *Circulation* 2001; 123(18):1953-62.

50. Iaccarino G, Barbato E, Cipolletta E, De Amicis V, Margulies KB, Leosco D, et al. Elevated myocardial and lymphocyte GRK2 expression and activity in human heart failure. *Eur Heart J* 2005; 26(17):1752-1758.
51. Rockman HA, Chien KR, Choi DJ, Iaccarino G, Hunter JJ, Ross J Jr, et al. Expression of a β -adrenergic receptor kinase 1 inhibitor prevents the development of myocardial failure in gene-targeted mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95(12):7000-7005.
52. Cannavo A, Komici K, Bencivenga L, D'amico ML, Gambino G, Liccardo D, et al. GRK2 as a therapeutic target for heart failure. *Expert Opin Ther Targets* 2018; 22(1):75-83.
53. Ciccarelli M, Sorriento D, Fiordelisi A, Gambardella J, Franco A, Del Giudice C, et al. Pharmacological inhibition of GRK2 improves cardiac metabolism and function in experimental heart failure. *ESC Heart Fail* 2020; 7(4):1571-1584.
54. Bledzka KM, Manaserh IH, Grondolsky J, Pfleger J, Roy R, Gao E, et al. A peptide of the amino-terminus of GRK2 induces hypertrophy and yet elicits cardioprotection after pressure overload. *J Mol Cell Cardiol* 2021; 154:137-153.
55. Rengo G, Lymperopoulos A, Koch WJ. Future G protein-coupled receptor targets for treatment of heart failure. *Curr Treat Options Cardiovasc Med* 2009; 11:328-338.
56. Salazar NC, Vallejos X, Stryk A, Rengo G, Cannavo A, Liccardo D, et al. GRK2 blockade with β ARKct is essential for cardiac β 2-adrenergic receptor signaling towards increased contractility. *Cell Commun Signal* 2013; 11:64.
57. Homan KT, Larimore KM, Elkins JM, Szklarz M, Knapp S, Tesmer JGG. Identification and structure-function analysis of subfamily selective G protein-coupled receptor kinase inhibitors. *ACS Chem Biol* 2015; 10(1):310-319.
58. Thal DM, Homan KT, Chen J, Wu EK, Hinkle PM, Huang ZM, et al. Paroxetine Is a Direct Inhibitor of G Protein-Coupled Receptor Kinase 2 and Increases Myocardial Contractility. *ACS Chem Biol* 2012; 7(11): 1830-1839.
59. Bourin M, Chue P, Guillon Y. Paroxetine: a review. *CNS Drug Rev* 2001; 7(1):25-47.
60. Sun X, Zhou M, Wen G, Huang Y, Wu J, Peng L, et al. Paroxetine Attenuates Cardiac Hypertrophy Via Blocking GRK2 and ADRB1 Interaction in Hypertension. *J Am Heart Assoc* 2021; 10(1):e016364.
61. Schumacher SM, Gao E, Zhu W, Chen X, Chuprun JK, Feldman AM, et al. Paroxetine-mediated GRK2 inhibition reverses cardiac dysfunction and remodeling after myocardial infarction. *Sci Transl Med* 2015; 7(277):277ra31.
62. Montó F, Oliver E, Vicente D, Buendía F, Rueda J, Agüero J, et al. β 2- and β 1-Adrenoceptor Expression Exhibits a Common Regulatory Pattern With GRK2 and GRK5 in Human and Animal Models of Cardiovascular Diseases. *J Cardiovasc Pharmacol* 2015; 66(5):478-486.
63. Gerö D, Szoleczky P, Suzuki K, Módos K, Oláh G, Coletta C, et al. Cell-based screening identifies paroxetine as an inhibitor of diabetic endothelial dysfunction. *Diabetes* 2013; 62(3):953-964.
64. Fan Q, Chen M, Zuo L, Shang X, Huang MZ, Ciccarelli M, et al. Myocardial Ablation of G Protein-Coupled Receptor Kinase 2 (GRK2) Decreases Ischemia/Reperfusion Injury through an Anti-Intrinsic Apoptotic Pathway. *PLoS One* 2013; 8(6):e66234.



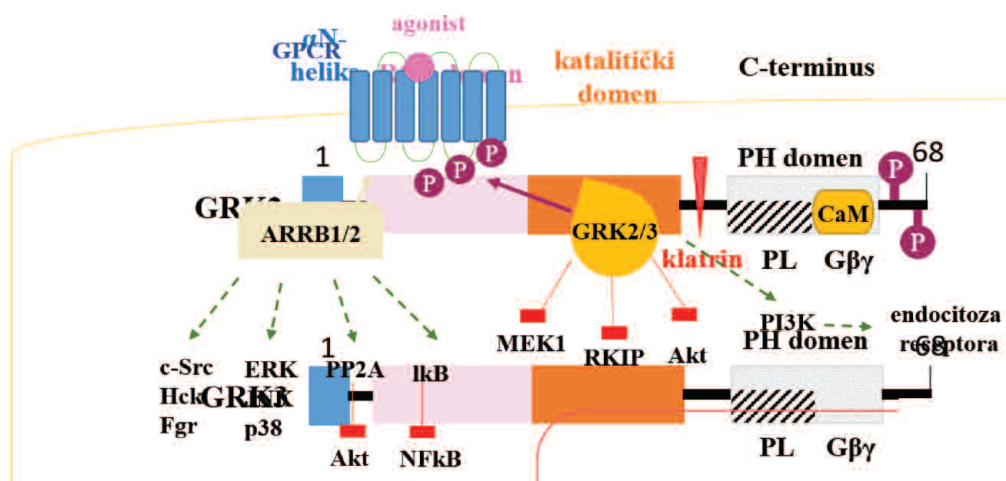
Slika 1. Shematski prikaz mehanizama doksorubicinske kardiotoksičnosti izvan i unutar ćelije.

Preuzeto iz doktorske disertacije Kosić, 2022; modifikovano iz Rawat i saradnici, 2021.

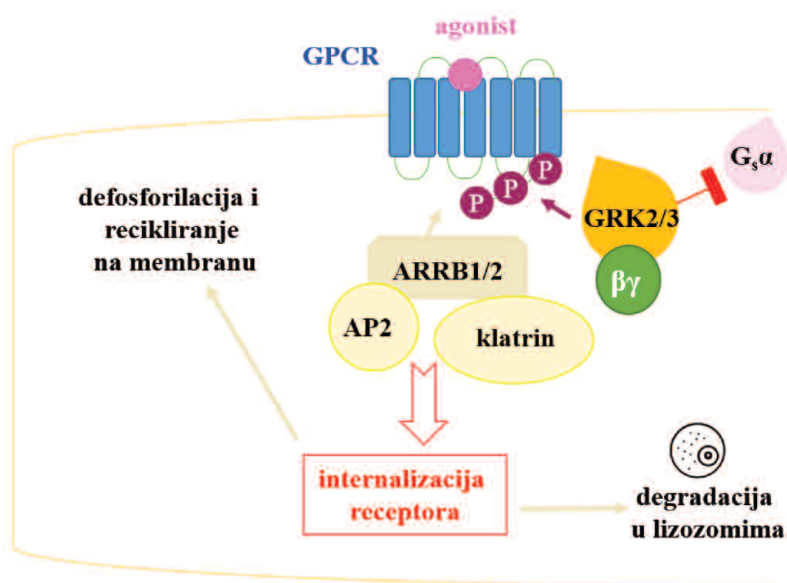


Slika 2. Signalni putevi β_1 -AR i β_2 -AR u zdravom srcu.

β -AR: beta-adrenergički receptor; Gs: stimulatorni G protein; Gi: inhibitorni G protein; AC: adenilat-ciklaza; ATP: adenosin trifosfat; cAMP: ciklični adenosin monofosfat; PKA: protein-kinaza A; CaMKII: Ca²⁺/kalmodulin-zavisna proteinska kinaza; PI3K: fosfatidilinozitol-3-kinaza; PKB: protein-kinaza B; P: fosforilacija; - : inhibicija. Preuzeto iz doktorske disertacije Kosić, 2022; modifikovano iz Ho i saradnici, 2010.

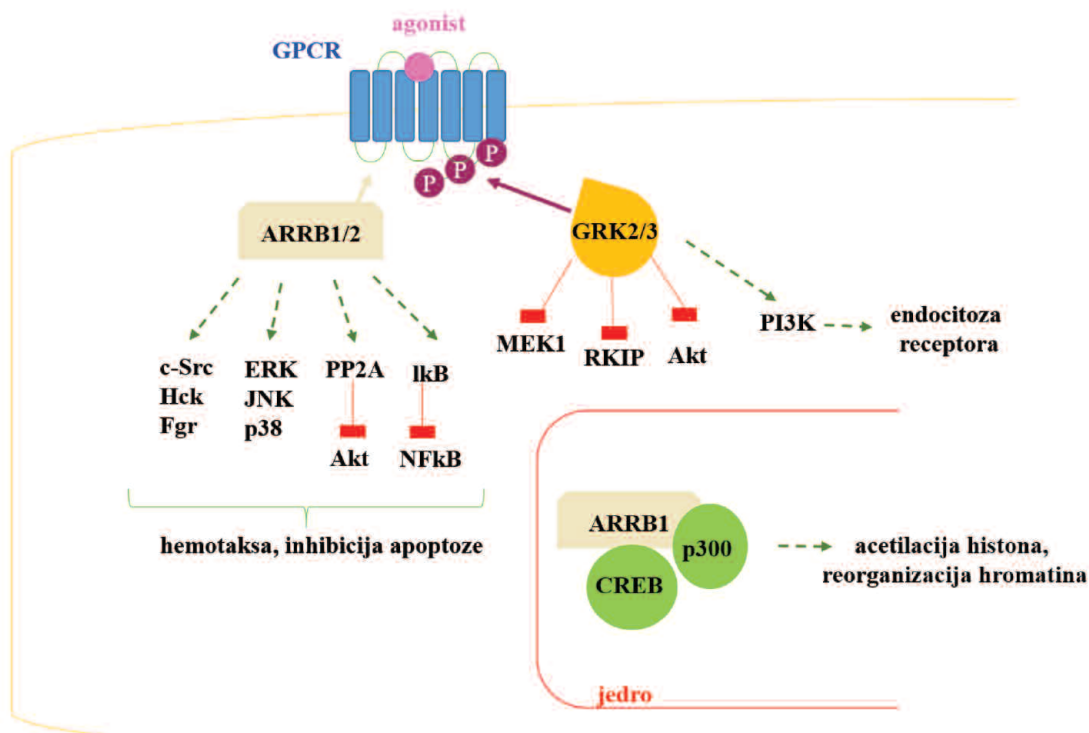


Slika 3. Struktura kinaza β -AR. GRK: kinaza G protein-spregnutog receptora; RGS: regulator funkcije G protein signalnog puta; PH: domen homolog plekstrinu; PL: fosfolipidi. CaM: Ca^{2+} kalmodulin; P: fosforilacija. Preuzeto iz doktorske disertacije Kosić, 2022; modifikovano iz Senarath i saradnici, 2018.



Slika 4. Uloga GRK u desenzitizaciji i prometu GPCR.

GPCR: G protein-spregnuti receptor; GRK: kinaza G protein-spregnutog receptora; ARR1: beta arestin; Gs: stimulativni G protein; AP2: adapter klatrina; – : inhibicija. Preuzeto iz doktorske disertacije Kosić, 2022; modifikovano iz Reiter i Lefkowitz, 2006.



Slika 5. Uloga GRK i ARRB u signalnim putevima GPCR.

GPCR: G protein-spregnuti receptor; GRK: kinaza G protein-spregnutog receptora; ARRB: beta arestin; c-Src: protoonkogen; Hck: tirozin-kinaza; Fgr: onkogen; ERK: kinaza regulisana ekstracelularnim signalom; JNK: Jun-kinaza; p38: mitogenom aktivirana kinaza; PP2A: protein-fosfataza 2A; Akt: protein-kinaza B; IκB: inhibitor nuklearnog faktora kapa beta; NFκB: nuklearni faktor kapa beta; MEK1: mitogenom aktivirana protein-kinaza 1; RKIP: inhibitor Raf kinaze; PI3K: fosfatidilinozitol-3-kinaza; CREB, p300: transkripcijski faktori; P: fosforilacija; zelene isprekidane linije: aktivacija, crvene linije: inhibicija. *Preuzeto iz doktorske disertacije Kosić, 2022; modificirano iz Reiter i Lefkowitz, 2006.*

Uticaj genetičkih faktora na efikasnost i toksičnost terapije metotreksatom kod pacijenata sa reumatoidnim artritisom

Milka Grk

Institut za humanu genetiku, Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu

Kontakt: milkagr@gmail.com

Apstrakt

Reumatoidni artritis (RA) je hronično, inflamatorno, autoimunska oboljenje koje se karakteriše bolom, otokom i destrukcijom sinovijalnih zglobova, što može da dovede do invaliditeta i prerane smrti obolelih. Terapija izbora na samom početku tretmana je monoterapija metotreksatom (MTX), koji je zbog svoje efikasnosti i dobrog bezbednosnog profila kao i zbog smanjivanja učestalosti komorbiditeta i mortaliteta obolelih osoba, i danas zlatni standard u terapiji RA. Međutim, studije su pokazale da odgovor na terapiju metotreksatom pokazuje 33-65% pacijenata, dok se tretman prekida kod 16% obolelih na monoterapiji zbog neželjenih efekata. Na ishod terapije, između ostalog, utiče i genetički profil pacijenata ali ova veza nije dovoljno objašnjena. Genske varijacije u vidu polimorfizama pojedinačnih nukleotida mogu da modifikuju odgovor osobe na različite faktore spoljašnje sredine, među njima i na odgovor na farmakološku terapiju. Ovaj rad će pokušati da obuhvati pregled uticaja pojedinačnih polimorfizama na efikasnost i toksičnost terapije metotreksatom kod obolelih od RA.

Ključne reči: polimorfizam, metotreksat, farmakogenetika, reumatoidni artritis

Genetic factors impacting the efficacy and toxicity of methotrexate therapy in rheumatoid arthritis patients

Milka Grk

Institute of Human Genetics, Faculty of Medicine, University of Belgrade

Correspondence: milkagr@gmail.com

Abstract

Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic, inflammatory, autoimmune disease characterized by impairment of synovial joints. Due to its efficacy, safety, and relatively low costs, MTX remains the cornerstone drug and a key part of the initial treatment strategy for RA patients. However, studies have shown that only 33-65% of patients respond to methotrexate therapy, and 16% of patients discontinue monotherapy due to side effects. The therapy outcome is influenced by the genetic profile of the patients, but this association is not yet fully understood. Gene variations in the form of single nucleotide polymorphisms can modify a person's response to various environmental factors, including their response to pharmacological therapy. This paper aims to provide an overview of the impact of individual polymorphisms on the efficacy and toxicity of methotrexate therapy in RA patients.

Keywords: polymorphism, methotrexate, pharmacogenetics, rheumatoid arthritis

Metotreksat u terapiji reumatoidnog artritisa

Reumatoidni artritis (RA) je hronično, sistemsko, autoimunsko, zapaljensko oboljenje čija je osnovna odlika progresivno oštećenje sinovijalnih zglobova, koje je praćeno pojavom mnogobrojnih vanzglobnih manifestacija (1,2). U Republici Srbiji prevalenca RA je među najnižima u Evropi i iznosi 0,34%. U našoj zemlji bolest je prisutna kod 0,16% muškaraca, dok je kod žena 3,18 puta češća (0,51%) (3).

Zlatni standard u terapiji RA je Metotreksat (MTX) (4,5). Istorija MTX-a počinje pedesetih godina dvadesetog veka (6). Pre razvoja MTX-a, RA je lečen simptomatski, terapijom bola. Tridesetih i četrdesetih godina dvadesetog veka uvedene su soli zlata i kortikosteroidna terapija (7,8). Prvi antimetabolit korišćen u terapiji RA bio je aminopterin. Gubner i saradnici su prvi pokazali njegovo povoljno dejstvo u terapiji artritisa kod osoba sa RA i psorijaznim artritisom, ali i u tretmanu kožnih promena kod psorijaze (6,9). Kako je aminopterin bio tehnički zahtevan za proizvodnju, pokrenuta su istraživanja sa ciljem da se aminopterin modifikuje radi lakše sinteze. Kao rezultat nastala je supstanca koja danas nosi naziv metotreksat (6). Prvu studiju koja je ispitivala efikasnost MTX-a sprovedli su Black i saradnici kod pacijenata sa psorijaznim artritisom 1964. godine (10). Reumatolog Rex Hoffmeister je na kongresu 1972. godine prikazao svoja pozitivna iskustva sa primenom MTX-a u terapiji RA. Nažalost, rezultati ovog istraživanja nikad nisu u celosti objavljeni usled negativnih reakcija na sažetak koji je prikazao ove rezultate. U to vreme nije bilo zainteresovanosti da se u redovnu terapiju RA uvede lek iz klase citostatika (6). Prve dvostruko slepe studije sa randomizacijom, u kojima se efikasnost MTX-a poredi sa placebom, sprovedene su tek osamdesetih godina prošlog veka (11–14). Nakon dokazane efikasnosti i dobrog bezbednosnog profila, 1988. godine Američka administracija za hranu i lekove (FDA) odobrila je primenu MTX-a u terapiji RA (15,16). Prema najnovijim preporukama Evropske lige za borbu protiv reumatizma (EULAR) iz 2022. godine MTX ostaje lek prvog izbora za započinjanje terapije RA (17). Mnogi faktori su doprineli ovakvom statusu MTX-a nakon više od 50 godina primene. MTX ima relativno dobru efikasnost i prihvatljiv bezbednosni profil. Terapiju je moguće prilagoditi svakom pacijentu i prema dozi i prema putu primene. Ne sme se zaboraviti ni niska cena samog leka (5). Uticaj na preporuke EULAR-a imale su i studije koje su pokazale da većina bioloških lekova primenjena kao monoterapija nije superiorna u odnosu na monoterapiju metotreksatom u ranim fazama artritisa (18–21).

Glavni cilj savremene terapije RA (*treat-to-target*) je postizanje smanjenja aktivnosti bolesti u prva 3 meseca terapije i postizanje remisije, odnosno niskog nivoa aktivnosti bolesti nakon 6 meseci od započinjanja terapije (17). Prospektivne studije su pokazale da pravovremena primena efikasne terapije značajno utiče na progresiju bolesti. Kada se terapija uvede u prvih tri do šest meseci od početka bolesti, oboljenje se sporije razvija i pokazano je da će kvalitet života obolelih biti značajno bolji i nakon 10 godina trajanja bolesti nego kod osoba kod kojih nije postignuta adekvatna kontrola RA u ovom kratkom terapijskom prozoru (22,23). Strategije u terapiji su različite, te se MTX može primenjivati kao monoterapija, kombinovana ili *step-up* terapija (4,24). Kombinovana terapija se za sada pokazala kao najbolji izbor tretmana, kojim se najbrže uspostavlja remisija, odnosno niska aktivnost bolesti (25). Uprkos svojoj efikasnosti, neželjene reakcije se javljaju kod oko 30% obolelih, dok se terapija prekida zbog neefikasnosti kod čak 20% bolesnika na terapiji MTX-om (26). Kada se terapija započne lekom koji se nakon tri do šest meseci ispostavi kao neefikasan, lečenje se najčešće nastavlja kombinovanom terapijom sa više bolest-modifikujućih lekova ili se tretman u potpunosti menja (4,17). Međutim, tada se zatvara terapijski prozor u lečenju i propušta prilika da se uspostavi brza kontrola bolesti i postignu dugoročni, pozitivni efekti na tok bolesti (22). Upravo bi ovde razvoj farmakogenetike, a sa njom i personalizovane medicine, pokazali svoj značaj. Predviđanje ishoda lečenja MTX-om omogućilo bi da izaberemo optimalnu i efikasnu terapiju za svakog obolelog u ovom kratkom terapijskom

prozoru na početku bolesti. Kao rezultat imali bismo dugoročno očuvanje i poboljšanje kvaliteta života i funkcionalnosti (4,22,27).

Metabolički put metotreksata

Metotreksat je analog folne kiseline koji svoje dejstvo ostvaruje neposrednom ili posrednom inhibicijom enzima folatnog, metioninskog i adenoinskog puta, kao i uticajem na *de novo* sintezu purina i pirimidina (28,29).

Najčešći način primene MTX-a je oralni, mada danas postoje oblici koji se primenjuju potkožno i u mišić. Kako je MTX folatni analog, on prati put preuzimanja folne kiseline. Kada se primenjuje *per os* metotreksat iz creva preuzimaju enterociti (30,31). Bioraspoloživost MTX-a nakon oralne primene je visoka i kreće se u širokom rasponu između 64% i 90%, sugerišući na postojanje individualnih razlika u farmakokinetici kod pacijenata i potencijalno može uticati i na ishod terapije (32). Osnovni mehanizam preuzimanja MTX-a je preko proton-kuplovanih folatnih transportera (PCFT; SLC46A1) koji su locirani u apikalnoj membrani enterocita. Iz enterocita, MTX ulazi u cirkulaciju (30,31). Maksimalna koncentracija metotreksata u krvi postiže se nakon jednog do dva sata od primene, dok je poluživot leka u plazmi oko 4,5-10 časova. Nakon 24 časa lek se u potpunosti odstranjuje iz cirkulacije (30,33,34). Najvećim delom, (65–80%) lek se izlučuje, neizmenjen, preko bubrega. Oko 3% MTX-a izlučenog urinom nalazi se u obliku 7-hidroksi MTX-a, sintetisanog u jetri (32,35).

Prateći put folne kiseline, MTX ulazi u ćelije preko redukovanih folatnih nosača (SLC19A1; RFC1) (36). Istraživanja su pokazala da, bar delimično, ćelije preuzimaju MTX i putem folatnih receptora. Folatni receptor β , koji je lokalizovan na sinoviocitima, ima visok afinitet za MTX. Međutim, ovo verovatno nije primarni put kojim MTX ulazi u sinoviocite zbog kompeticije sa 5-metil tetrahidrofolatom koji ima visok afinitet za isti receptor, a koji se u plazmi nalazi u velikoj koncentraciji (32).

Nakon ulaska u ćeliju MTX je izložen dejstvu enzima folipoliglutamat sintaze (FPGS) koji vrši njegovu poliglutamaciju. Poliglutamacijom se MTX zarobljava u citoplazmi. MTX-poliglutamat, za razliku od slobodne forme leka, ne podleže izlučivanju iz ćelije preko ABC transportera (ATP-vezujući kasetni transporteri). Na taj način poliglutamacija omogućava održavanje visoke koncentracije MTX-a u ćelijama čak i nakon njegovog potpunog odstranjivanja iz cirkulacije (34,36). Kako bi napustio ćeliju, MTX-poliglutamat mora podleći procesu deglutamacije koju katališe enzim γ -glutamil hidrolaza (GGH). MTX-poliglutamat se prvo prevodi u kraće poliglutamatne oblike i na kraju u MTX. Sam MTX podleže vezivanju za ABC transportere i izlučuje se iz ćelija (34,36,37). Stabilna koncentracija MTX-poliglutamata u ćelijama rezultat je balansa aktivnosti FPGS i GGH i uspostavlja se nakon nekoliko nedelja od početka tretmana, što odgovara i prvim vidljivim efektima metotreksata na smanjivanje aktivnosti RA kod obolelih (38,39).

MTX-poliglutamat svoje dejstvo prevashodno ostvaruje uticajem na odvijanje folatnog ciklusa. Njegov primarni cilj je inhibicija enzima dihidrofolat reduktaze (DHFR). Inhibicija DHFR vodi ka smanjenom prevođenju dihidrofolata u tetrahidrofolat. Kao rezultat smanjuje se sinteza 5-metil tetrahidrofolata. Interesantno je da MTX ne utiče na funkciju metilen tetrahidrofolat reduktaze (MTHFR), ali smanjena funkcija MTHFR vodi do usporenog prevođenja 5,10-metilen tetrahidrofolata u 5-metil tetrahidrofolat, što dodatno smanjuje njegovu dostupnost u ćeliji. 5-metil tetrahidrofolat je neophodan za reakciju transmetilacije kojom se homocistein prevodi u metionin, pri čemu metil grupa potiče sa 5-metil tetrahidrofolata. U ovoj reakciji demetilacijom 5-metil tetrahidrofolat se vraća u formu tetrahidrofolata. MTX-poliglutamat takođe inhibira i enzim timidilat sintazu (TYMS) koji je uključen u metabolički put sinteze pirimidina. Smanjena aktivnost ovog enzima uz relativni nedostatak THF vodi ka usporenoj biosintezi pirimidina (40).

Poznato je da je MTX primarno dizajniran kao kompetitivni inhibitor folne kiseline, i da se sa većim afinitetom vezuje za DHFR nego dihidrofolat (36,41). Istovremeno aktivna folatna jedinjenja su neophodna i za *de novo* sintezu purina, koja je dodatno usporena i zbog vezivanja MTX-poliglutamata za enzim 5-aminoimidazol 4-karboksamid ribonukleotid (AICAR) formiltransferazu, koja je deo ovog puta (34,42). AICAR formiltransferazu kodira gen *ATIC* (43). Kao posledica inhibicije AICAR formiltransferaze dolazi do nakupljanja AICAR-a u ćelijama. Sam AICAR je kompetitivni inhibitor enzima adenzin monofosfat deaminaze 1 (AMPD1) i adenzin deaminaze (ADA). AMPD1 i ADA su deo adenzinskog puta. Inhibicijom AMPD1 dolazi do blokade puta kojim se AMP prevodi u IMP, i dalje usmerava metabolizam IMP-a ka prevođenju u inozin i na kraju u hipoksantin. AMP ima mogućnost da u slučaju blokade metaboličkog puta preko AMPD1 enzima podlegne transformaciji u adenzin, a zatim dejstvom enzima ADA dalje u inozin. Međutim, u prisustvu MTX i ovaj put je usporen, te se kao posledica adenzin ne metaboliše u inozin, već se nakuplja u ćelijama. U ovakvim uslovima ćelija oslobađa veću količinu adenzina. Ovaj purinski nukleozid, dalje, ostvaruje svoje dejstvo vezivanjem za adenzinske receptore (34,44). Smatra se da bar deo svog dejstva MTX ostvaruje, posredno, preko antiinflamatornog adenzinskog puta (34,44,45).

Uticaj genskih varijanti na ishod terapije metotreksatom

Brojne farmakogenetičke studije su se bavile ispitivanjem uticaja polimorfizama pojedinačnih nukleotida (SNP) u genima koji kodiraju enzime folatnog, adenzinskog puta, kao i enzime koji kontrolišu *de novo* sintezu purina i pirimidina na efikasnost i toksičnost MTX-a kod obolelih od RA (46,47).

Polimorfizam rs1051266 (G80A) *SLC19A1* gena dovodi do *missense* mutacije (His>Arg) (48). Pokazano je da kod nosilaca AA genotipa postoji brži influks MTX-a u ćelije nego kod nosilaca G alela ovog polimorfizma (49). Najveći broj studija se slaže da prisustvo G alela povećava rizik od nastanka neželjenih efekata kod nosilaca (50–53). Ovakav uticaj G alela potvrđuju i meta-analize koje su uključile veliki broj do sada sprovedenih studija (52,54). Istovremeno Takori i saradnici nisu pronašli ovakvu povezanost u studiji na japanskim bolesnicima (55). Iako su podaci o uticaju ovog polimorfizma na efikasnost oprečni, pojedine studije su pronašle vezu rs1051266 sa efikasnošću MTX-a ili je ona bila prisutna samo kod pacijenata koji su koristili suplemente folata (50,54,56). Owen i saradnici su prijavili povezanost šest polimorfizama ovoga gena sa efikasnošću MTX terapije (rs11702425, rs2838956, rs7499, rs2274808, rs9977268 i rs7279445), dok se sam rs1051266 nije pokazao kao značajan (48).

Ispitivanje polimorfizama *FPGS* gena pokazala su oprečne rezultate. Moya i saradnici su pokazali da pacijenti koji su nosioci rs10987742 AA genotipa imaju bolji odgovor na terapiju MTX-om. Zanimljivo je i da prema ovom istraživanju nosioci TT genotipa za rs10106 imaju bolji odgovor na terapiju ali i učestalije neželjene efekte od nosilaca C alela (57). Polimorfizmi ovog gena (rs10987742, rs10760502, rs10106) u drugim istraživanjima nisu bili povezani sa ishodom terapije kod obolelih od RA (39,57,58). Sa druge strane na nivo MTX-poliglutamata utiče raspoloživost i aktivnost GGH. Promotorski polimorfizam rs1800909 (C>T) povećava ekspresiju *GGH* gena, dok je rs11545078 (C>T) *missense* varijanta koja dovodi do smanjene aktivnosti enzima i posledično do povećanja koncentracije MTX-poliglutamata u ćeliji (39). Straaten i saradnici su primetili da je među osobama sa dobrim odgovorom veća učestalost C alela rs1800909 polimorfizma. Jekić i saradnici su u svojoj studiji uočili da su svi RA pacijenti sa mijelosupresijom nosioci GG genotipa za rs11545078 polimorfizam (39,59). Druge studije nisu pokazale povezanost polimorfizama ovog gena sa ishodom terapije MTX-om (39,48,60,61).

Najviše istraživača se ipak bavilo uticajem polimorfizama u genima koji kodiraju enzime folatnog ciklusa na ishod terapije MTX-om (29). Najveću pažnju istraživača su privukle varijante u genima koji kodi-

raju enzime DHFR i MTHFR (29,62). DHFR je ciljani enzim za vezivanje MTX-poliglutamata. Najčešće ispitivane varijante ovoga gena su rs70991108, rs6151599, rs1650697, rs3045983, rs12517451, rs10072026 i rs1643657 (48,63–65). U našoj populaciji ispitan je uticaj promotorskih polimorfizama koji potencijalno mogu promeniti ekspresiju gena. Genotip AA rs70991108 polimorfizma u populaciji RA bolesnika iz Srbije povezan je sa lošim odgovorom na terapiju MTX-om (64). Takođe, alel T rs1650697 (C35T) polimorfizma je povezan sa protekcijom od razvoja hepatotoksičnosti (65). Polimorfizam rs3045983 (63/91) je kompleksna inserciono/deleciona varijacija. Alel koji nosi deleciju (GGGAGCTGG) na poziciji 63 i inserciju jedne kopije motiva dugog 9 bp (GCCGCTGCG) na poziciji 91 gena ima protektivan efekat i nosioci ovog alela ređe ispoljavaju neželjene efekte pri lečenju RA MTX-om (41,63). Iako se MTX ne vezuje direktno za enzim MTHFR, stepen aktivnosti ovog enzima utiče na brzinu samog folatnog ciklusa, a time potencijalno utiče na efikasnost i toksičnost MTX-a. Dva najznačajnija i najčešće proučavana polimorfizma u *MTHFR* genu su rs1801133 (C677T) i rs1801131 (A1298C) (29). rs1801133 (C677T) dovodi do zamene citozina timinom na poziciji 677, što dalje vodi ka zameni alanina valinom na poziciji 222 proteinskog produkta (28). Aktivnost enzima MTHFR kod heterozigota smanjena je za oko 35%, dok je kod osoba sa TT genotipom smanjena za oko 70% (66). Osobe koje su nosioci TT genotipa stoga imaju manje dostupnog 5-metil tetrahidrofolat koji je neophodan za prevođenje homocisteina u metionin. Blago povećani nivoi homocisteina u krvi ovih osoba mogu se uspešno regulisati adekvatnim unosom folata (66,67). Mišljenja autora o značaju ovog polimorfizma su podeljena. Većina autora koji su povezali ovu varijantu sa ishodom terapije se slaže da prisustvo T alela povećava verovatnoću za pojavu neželjenih efekata i smanjuje efikasnost leka (62). Polimorfizam rs1801131 *MTHFR* gena je *missense* varijanta koja uzrokuje zamenu glutamata sa alaninom u enzimu na poziciji 429 (28). Iako je aktivnost enzima narušena ovom genskom varijantom, uticaj ovog polimorfizma na aktivnost enzima je značajno manji (68,69).

U putu *de novo* sinteze purina MTX-poliglutamat inhibira AICAR transformilazu, kodiranu genom *ATIC* (29). U našoj populaciji nije pronađena povezanost *ATIC* -129T>G (rs4535042) polimorfizma i ishoda terapije (70). Najčešće ispitivan polimorfizam *ATIC* gena je rs2372536 (46,47). Među brojnim studijama koje su ispitivale povezanost ovog polimorfizma sa ishodom terapije izdvajaju se Lima i saradnici. Lima i saradnici su povezali C alel sa rizikom od neuspeha terapije, što je u potpunoj suprotnosti sa studijom Wessels i saradnika koji su CC genotip povezali sa dobrim uspehom terapije (29,60). Salazar i saradnici su povezali rs16853826 polimorfizam *ATIC* gena sa toksičnošću MTX-a i značaj ovog intronskog polimorfizma objasnili su mogućom pozicijom u splajsing regionu (71). Owen i saradnici povezali su rs12995526, rs3821353, rs7563206 i rs16853834 varijante ovog gena sa efikasnošću MTX-a (48). Iako su enzimi adenzinskog ciklusa, ADA i AMPD1 su samo posredno pogođeni prisustvom MTX-poliglutamata. Prisustvo G alela rs244076 polimorfizma *ADA* gena vodio je ka lošem odgovoru, dok rs1799880 nije imao uticaj na ishod lečenja MTX-om u indijskoj populaciji (72). Iako *missense* varijanta *AMPD1* rs17602729 (C34T) dovodi do smanjene aktivnosti enzima kod nosilaca, njen uticaj na efikasnost MTX-a još uvek nije razjašnjen. Dok pojedini autori povezuju T alel sa dobrim kliničkim odgovorom, u slovenačkoj populaciji nosioci ovog alela imaju veće vrednosti DAS28 nakon šest meseci terapije (29,48,72–74). *Missense* varijanta *ITPA* rs1127354 (Pro32Thr) dovodi do smanjenja aktivnosti ITPA. Heterozigoti za rs1127354 (CA) imaju smanjenje enzimске aktivnosti za 75%, dok osobe sa AA genotipom imaju očuvano svega 1% od normalne aktivnosti enzima (75). Ovaj polimorfizam je povezan sa neželjenim efektima azatioprina ali nije pokazao značajan uticaj na ishod terapije MTX-om kod obolelih od RA. Po jedna studija je opisala dobar odgovor na MTX kod nosilaca CC genotipa, odnosno češću pojavu neželjenih efekata kod nosilaca A alela (48,73,76,77). Kako adenzin svoje antiinflamatorno dejstvo ostvaruje vezivanjem za adenzinske receptore, ispitan je i potencijalni uticaj polimorfizama u genima koji ih kodiraju na ishod terapije MTX-om (78–81). Uticaj genskih varijanti *ADORA2A* gena

bio je češće predmet istraživanja u farmakogenetici MTX-a nego polimorfizmi *ADORA3* gena. Iako je pokazano da osobe nosioci T alela rs2298383 polimorfizma *ADORA2A* gena imaju manju ekspresiju receptora na površini ćelija od osoba sa CC genotipom, najveći broj studija nije povezao uticaj ovog polimorfizma sa efikasnošću MTX-a u terapiji RA (29,72,82,83). Polimorfizam rs5751876 predstavlja tihu mutaciju i uticaj ove varijante bi mogao biti objašnjen uticajem na brzinu prepisivanja iRNK. U indijskoj populaciji T alel je povezan sa većim rizikom za loš odgovor na terapiju, dok ostali istraživači ovu povezanost nisu potvrdili u svojim studijama (45,72,81,82). U okviru *ADORA3* gena ispitivani su rs2298191, rs1544223, rs78594984, rs35511654, rs2229155, rs3393 i rs3394 polimorfizmi. Iako pojedinačni polimorfizmi nisu povezani sa efikasnošću i toksičnošću MTX, haplotipovi TATCAC i TGTCGC (rs2298191, rs1544223, rs78594984, rs35511654, rs2229155, rs3393 i rs3394) i TAA (rs2298191, rs1544223, rs3393) su pokazali povezanost sa češćom pojavom neželjenih reakcija, odnosno sa pojavom erozija (45,82).

U pokušaju da se predvidi odgovor na terapiju MTX-om u terapiji RA razvijeni su brojni prediktivni modeli. Pojedini modeli su bili bazirani isključivo na kliničkim i demografskim podacima, dok su drugi bili bazirani na varijacijama u genomu. Oni koji su se bazirali na genskim varijacijama najčešće su u obzir uzimali enzime koji pripadaju istom metaboličkom putu, najčešće folatnom ciklusu. Međutim ni jedan od prediktivnih modela nije se pokazao kao pouzdan i prihvaćen u kliničkoj praksi (27,74,77,84,85). Postojali su pokušaji da se objedine klinički podaci i najznačajniji polimorfizmi iz različitih metaboličkih puteva. Problemi su nastajali kada bi se ovakvi modeli, razvijeni na jednoj populaciji bolesnika, primenili na obolelima iz drugih populacija. Tako, prediktivni model koji je razvijen na slovenačkoj kohorti nije imao dobru prediktivnu vrednost u populaciji obolelih iz Srbije (74,85). Sprovođenje kvalitetnih meta-analiza takođe predstavlja izazov. Najznačajniji razlog je heterogenost podataka. Najbolji primer za to je određivanje efikasnosti MTX-a. Iako se većina studija bazirala na EULAR-ovim preporukama i promeni DAS28 skora tokom perioda praćenja obolelih, mnogi istraživači su koristili promenu DAS44 skora, sedimentacije eritrocita, broj bolnih ili otečenih zglobova (26,48,60,81).

Premda su istraživanja u oblasti farmakogenetike brojna, još uvek je dug put pred nama. Nastavak istraživanja, saradnje i ulaganja u oblasti farmakogenetike su neophodni da bi se dosegao njen pun potencijal i kako bi se unapredilo lečenje ne samo RA, već i drugih multifaktorskih bolesti (18,86-91). Tek tada možemo zaista utrti put ka efikasnom, personalizovanom pristupu zdravstvenoj zaštiti koji je usredsređen na pacijenta.

Zahvalnica

Ovaj rad je podržalo Ministarstvo prosvete nauke i tehnološkog razvoja Srbije (175091) i Istraživačka agencija Slovenije (P1-0170)

Literatura

1. Aletaha D, Neogi T, Silman AJ, Funovits J, Felson DT, Bingham CO et al. 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: An American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Arthritis Rheum.* 2010;62(9):2569–81.
2. Gibofsky A. Overview of epidemiology, pathophysiology, and diagnosis of rheumatoid arthritis. *The American journal of managed care.* 2012;18:S295–302.
3. Zlatković-Švenda MI, Stojanović RM, Šipetić-Grujić SB, Guillemin F. Prevalence of rheumatoid arthritis in Serbia. *Rheumatol Int.* 2014;34(5):649–58.

4. Smolen JS, Landewé R, Bijlsma JWW, Burmester G, Chatzidionysiou K, Dougados M et al. EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs: 2016 update. *Ann Rheum Dis.* 2017;76(6):960–77.
5. Combe B, Landewe R, Daien CI, Hua C, Aletaha D, Álvaro-Gracia JM et al. 2016 update of the EULAR recommendations for the management of early arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2017;76(6):948–59.
6. Weinblatt ME. Methotrexate in rheumatoid arthritis: a quarter century of development. *Trans Am Clin Climatol Assoc.* 2013;124:16–25.
7. Forestier J. Treatment of Rheumatoid Arthritis With Gold Salts. *Lancet.* 1934;224:441–4.
8. Hench PS, Kendall EC, Slocumb CH, Polley HF. The effect of a hormone of the adrenal cortex (17-hydroxy-11-dehydrocorticosterone: compound E) and of pituitary adrenocortical hormone in arthritis: preliminary report. *Annals of the rheumatic diseases.* 1949;8(2):97–104.
9. Gubner R, August S, Ginsberg V. Therapeutic suppression of tissue reactivity. 2. Effect of aminopterin in rheumatoid arthritis and psoriasis. *American Journal of Medical Sciences.* 1951;221:176–82.
10. Black RL, O'Brien WM, Van Scott EJ, Auerbach R, Eisen AZ, Bunim JJ. Methotrexate therapy in psoriatic arthritis: double-blind study on 21 patients. *Jama.* 1964 Sep 7;189(10):743–7.
11. Williams HJ, Willkens RF, Samuelson CO, Alarcón GS, Guttadauria M, Yarboro C et al. Comparison of low-dose oral pulse methotrexate and placebo in the treatment of rheumatoid arthritis. A Controlled Clinical Trial. *Arthritis Rheum.* 1985;28(7):721–30.
12. Weinblatt ME, Coblyn JS, Fox DA, Fraser PA, Holdsworth DE, Glass DN et al. Efficacy of low-dose methotrexate in rheumatoid arthritis. *N Engl J Med.* 1985;312(13):818–22.
13. Andersen PA, West SG, O'Dell JR, Via CS, Claypool RG, Kotzin BL. Weekly pulse methotrexate in rheumatoid arthritis: clinical and immunologic effects in a randomized, double-blind study. *Annals of internal medicine.* 1985;103(4):489–96.
14. Thompson RN, Watts C, Edelman J, Esdaile J, Russell AS. A controlled two-centre trial of parenteral methotrexate therapy for refractory rheumatoid arthritis. *The Journal of rheumatology.* 1984;11(6):760–3.
15. Upchurch KS, Kay J. Evolution of treatment for rheumatoid arthritis. *Rheumatology.* 2012;51:vi28–36.
16. Weinblatt ME. Methotrexate: Who would have predicted its importance in rheumatoid arthritis? *Arthritis Res Ther.* 2018;20(1):4–5.
17. Smolen JS, Landewé RBM, Bergstra SA, Kerschbaumer A, Sepriano A, Aletaha D et al. EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs: 2022 update. *Ann Rheum Dis.* 2022;82(1):3–18.
18. Szekanecz Z, Meskó B, Poliska S, Váncsa A, Szamosi S, Végh E et al. Pharmacogenetics and pharmacogenomics in rheumatology. *Immunologic research.* 2013;56:325–33.
19. Donahue KE, Schulman ER, Gartlehner G, Jonas BL, Coker-Schwimmer E, Patel SV et al. Comparative effectiveness of combining MTX with biologic drug therapy versus either MTX or biologics alone for early rheumatoid arthritis in adults: a systematic review and network meta-analysis. *Journal of General Internal Medicine.* 2019;34:2232–45.
20. Breedveld FC, Weisman MH, Kavanaugh AF, Cohen SB, Pavelka K, Vollenhoven RV et al. The PREMIER study: a multicenter, randomized, double-blind clinical trial of combination therapy with adalimumab plus methotrexate versus methotrexate alone or adalimumab alone in patients with early, aggressive rheumatoid arthritis who had not had previous methotrexate treatment. *Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology.* 2006;54(1):26–37.
21. Emery P, Burmester GR, Bykerk VP, Combe BG, Furst DE, Barré E et al. Evaluating drug-free remission with abatacept in early rheumatoid arthritis: results from the phase 3b, multicentre, randomised, active-controlled AVERT study of 24 months, with a 12-month, double-blind treatment period. *Annals of the rheumatic diseases.* 2015;74(1):19–26.
22. Tm F, Lunt M, Fu B, Bunn D, Symmons D. Early treatment with and time on first disease modifying anti-rheumatic drug predicts long-term function in patients with inflammatory polyarthritis. *Ann Rheum Dis.* 2009;69:689–95.
23. Aletaha D, Alasti F, Smolen JS. Optimisation of a treat-to-target approach in rheumatoid arthritis: strategies for the 3-month time point. *Annals of the rheumatic diseases.* 2016;75(8):1479–85.
24. Goekoop-Ruiterman YD, de Vries-Bouwstra JK, Allaart CF, Van Zeben D, Kerstens PJ, Hazes JM et al. Clinical and radiographic outcomes of four different treatment strategies in patients with early rheumatoid arthritis (the BeSt study): a randomized, controlled trial. *Arthritis & Rheumatism.* 2005;52(11):3381–90.
25. Steunebrink LM, Versteeg GA, Vonkeman HE, Ten Klooster PM, Kuper HH, Zijlstra TR et al. Initial combination therapy versus step-up therapy in treatment to the target of remission in daily clinical practice in early rheumatoid arthritis patients: results from the DREAM registry. *Arthritis research & therapy.* 2016;18:1–9.

26. Ling SF, Bluett J. Pharmacogenetics of methotrexate response in rheumatoid arthritis: An update. *Pharmacogenomics*. 2020;21(1):3-6.
27. Klak A, Paradowska-Gorycka A, Kwiatkowska B, Raciborski F. Personalized medicine in rheumatology. *Reumatologia/Rheumatology*. 2016;54(4):177-86.
28. Dervieux T, Greenstein N, Kremer J. Pharmacogenomic and metabolic biomarkers in the folate pathway and their association with methotrexate effects during dosage escalation in rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology*. 2006;54(10):3095-103.
29. Lima A, Bernardes M, Azevedo R, Seabra V, Medeiros R. Moving toward personalized medicine in rheumatoid arthritis: SNPs in methotrexate intracellular pathways are associated with methotrexate therapeutic outcome. *Pharmacogenomics*. 2016;17(15):1649-74.
30. Friedman B, Cronstein B. Methotrexate mechanism in treatment of rheumatoid arthritis. *Joint Bone Spine*. 2019;86(3):301-7.
31. Desmoulin SK, Hou Z, Gangjee A, Matherly LH. The human proton-coupled folate transporter: Biology and therapeutic applications to cancer. *Cancer biology & therapy*. 2012;13(14):1355-73.
32. Inoue K, Yuasa H. Molecular basis for pharmacokinetics and pharmacodynamics of methotrexate in rheumatoid arthritis therapy. *Drug metabolism and pharmacokinetics*. 2014;29(1):12-9.
33. Godfrey C, Sweeney K, Miller K, Hamilton R, Kremer J. The population pharmacokinetics of long-term methotrexate in rheumatoid arthritis. *British journal of clinical pharmacology*. 1998;46(4):369-76.
34. Brown PM, Pratt AG, Isaacs JD. Mechanism of action of methotrexate in rheumatoid arthritis, and the search for biomarkers. *Nature Reviews Rheumatology*. 2016;12(12):731-42.
35. Chan ES, Fernandez P, Cronstein BN. Methotrexate in rheumatoid arthritis. *Expert Review of Clinical Immunology*. 2007;3(1):27-33.
36. Yamamoto T, Shikano K, Nanki T, Kawai S. Polyglutamate synthase is a major determinant of intracellular methotrexate polyglutamates in patients with rheumatoid arthritis. *Scientific reports*. 2016;6(1):35615.
37. Restrepo LF, Giraldo R, Londoño J, Pinzón C, Cortes A, Ballesteros G et al. Pharmacogenetics of methotrexate in rheumatoid arthritis: a systematic review. *Revista Colombiana de Reumatología (English Edition)*. 2016;23(2):102-14.
38. Dalrymple JM, Stamp LK, O'Donnell JL, Chapman PT, Zhang M, Barclay ML. Pharmacokinetics of oral methotrexate in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology*. 2008;58(11):3299-308.
39. Van der Straaten RJ, Wessels JA, de Vries-Bouwstra JK, Goekoop-Ruiterman YP, Allaart CF, Bogaartz J et al. Exploratory analysis of four polymorphisms in human GGH and FPGS genes and their effect in methotrexate-treated rheumatoid arthritis patients. *Pharmacogenomics*. 2007;8(2):141-50.
40. Schmeling H, Horneff G, Benseler SM, Fritzler MJ. Pharmacogenetics: can genes determine treatment efficacy and safety in JIA?. *Nature Reviews Rheumatology*. 2014;10(11):682-90.
41. Askari BhS, Krajcinovic M. Dihydrofolate reductase gene variations in susceptibility to disease and treatment outcomes. *Current genomics*. 2010;11(8):578-83.
42. Baggott JE, Morgan SL, Sams WM, Linden J. Urinary adenosine and aminoimidazolecarboxamide excretion in methotrexate-treated patients with psoriasis. *Archives of dermatology*. 1999;135(7):813-7.
43. Dai H, Charnigo RJ, Becker ML, Leeder JS, Motsinger-Reif AA. Risk score modeling of multiple gene to gene interactions using aggregated-multifactor dimensionality reduction. *BioData mining*. 2013;6(1):1-6.
44. Riksen NP, Barrera P, Van Den Broek PHH, Van Riel PLCM, Smits P, Rongen GA. Methotrexate modulates the kinetics of adenosine in humans in vivo. *Annals of the rheumatic diseases*. 2006;65(4):465-70.
45. Grk M, Milic V, Dolzan V, Maksimovic N, Damjanovic T, Pjevic MD et al. Analysis of association of ADORA 2 A and ADORA 3 polymorphisms genotypes/haplotypes with efficacy and toxicity of methotrexate in patients with Rheumatoid arthritis. *The Pharmacogenomics Journal*. 2020;20(6):784-91..
46. Eektimmerman F, Swen JJ, Madhar MB, Allaart CF, Guchelaar HJ. Predictive genetic biomarkers for the efficacy of methotrexate in rheumatoid arthritis: a systematic review. *The pharmacogenomics journal*. 2020;20(2):159-68.
47. Qiu Q, Huang J, Shu X, Fan H, Zhou Y, Xiao C. Polymorphisms and pharmacogenomics for the clinical efficacy of methotrexate in patients with rheumatoid arthritis: a systematic review and meta-analysis. *Scientific Reports*. 2017;7(1):44015.
48. Owen SA, Hider SL, Martin P, Bruce IN, Barton A, Thomson W. Genetic polymorphisms in key methotrexate pathway genes are associated with response to treatment in rheumatoid arthritis patients. *The pharmacogenomics journal*. 2013;13(3):227-34.
49. Lima A, Bernardes M, Azevedo R, Monteiro J, Sousa H, Medeiros R et al. SLC19A1, SLC46A1 and SLC01B1 polymorphisms as predictors of methotrexate-related toxicity in Portuguese rheumatoid arthritis patients. *Toxicological Sciences*. 2014;142(1):196-209..

50. Bohanec Grabar P, Logar D, Lestan B, Dolžan V. Genetic determinants of methotrexate toxicity in rheumatoid arthritis patients: a study of polymorphisms affecting methotrexate transport and folate metabolism. *European journal of clinical pharmacology*. 2008;64:1057-68.
51. Samara SA, Irshaid YM, Mustafa KN. Association of MDR1 C3435T and RFC1 G80A polymorphisms with methotrexate toxicity and response in Jordanian rheumatoid arthritis patients. *International journal of clinical pharmacology and therapeutics*. 2014;52(9):746-55.
52. Huang J, Fan H, Qiu Q, Liu K, Lv S, Li J et al. Are gene polymorphisms related to adverse events of methotrexate in patients with rheumatoid arthritis? A retrospective cohort study based on an updated meta-analysis. *Therapeutic Advances in Chronic Disease*. 2020;11:2040622320916026.
53. Świerkot J, Ślęzak R, Karpiński P, Pawłowska J, Noga L, Szechiński J et al. Associations between single-nucleotide polymorphisms of RFC-1, GGH, MTHFR, TYMS, and TCII genes and the efficacy and toxicity of methotrexate treatment in patients with rheumatoid arthritis. *Pol Arch Med Wewn*. 2015;125(3):152-61.
54. Naushad SM, Alrokayan SA, Almajhdi FN, Hussain T. Influence of RFC1 c. 80A> G polymorphism on methotrexate-mediated toxicity and therapeutic efficacy in rheumatoid arthritis: a meta-analysis. *Annals of Pharmacotherapy*. 2021;55(12):1429-38.
55. Takatori R, Takahashi KA, Tokunaga D, Hojo T, Fujioka M, Asano T et al. ABCB1 C3435T polymorphism influences methotrexate sensitivity in rheumatoid arthritis patients. *Clin Exp Rheumatol*. 2006;24(5):546-54.
56. Kung TN, Dennis J, Ma Y, Xie G, Bykerk V, Pope J T et al. RFC1 80G> A is a genetic determinant of methotrexate efficacy in rheumatoid arthritis: a human genome epidemiologic review and meta-analysis of observational studies. *Arthritis & Rheumatology*. 2014;66(5):1111-20.
57. Moya P, Salazar J, Arranz MJ, Díaz-Torné C, Del Río E, Casademont J et al. Methotrexate pharmacokinetic genetic variants are associated with outcome in rheumatoid arthritis patients. *Pharmacogenomics*. 2016;17(11):25-9.
58. Muralidharan N, Sundaram R, Kodidela S, Chengappa KG, Mariaselvam CM, Misra DP et al. Folyl polyglutamate synthetase (FPGS) gene polymorphisms may influence methotrexate adverse events in South Indian Tamil Rheumatoid Arthritis patients. *The Pharmacogenomics Journal*. 2020;20(2):342-9.
59. Jekic B, Lukovic L, Bunjevacki V, Milic V, Novakovic I, Damjanovic T et al. Association of the TYMS 3G/3G genotype with poor response and GGH 354GG genotype with the bone marrow toxicity of the methotrexate in RA patients. *Eur J Clin Pharmacol*. 2013;69(3):377-83.
60. Wessels JA, de Vries-Bouwstra JK, Heijmans BT, Slagboom PE, Goekoop-Ruiterman YP, Allaart CF et al. Efficacy and toxicity of methotrexate in early rheumatoid arthritis are associated with single-nucleotide polymorphisms in genes coding for folate pathway enzymes. *Arthritis & Rheumatism*. 2006;54(4):1087-95.
61. Senapati S, Singh S, Das M, Kumar A, Gupta R, Kumar U et al. Genome-wide analysis of methotrexate pharmacogenomics in rheumatoid arthritis shows multiple novel risk variants and leads for TYMS regulation. *Pharmacogenet Genomics*. 2014;24(4):211-9.
62. Malik F, Ranganathan P. Methotrexate pharmacogenetics in rheumatoid arthritis: A status report. *Pharmacogenomics*. 2013;14(3):305-14.
63. Jekic B, Vejnovic D, Milic V, Maksimovic N, Damjanovic T, Bunjevacki V et al. Association of 63/91 length polymorphism in the DHFR gene major promoter with toxicity of methotrexate in patients with rheumatoid arthritis. *Pharmacogenomics*. 2016;17(15):1687-91.
64. Milic V, Jekic B, Lukovic L, Bunjevacki V, Milasin J, Novakovic I et al. Association of dihydrofolate reductase (DHFR)-317AA genotype with poor response to methotrexate in patients with rheumatoid arthritis. *Clinical and Experimental Rheumatology-Incl Supplements*. 2012;30(2):178.
65. Vejnović D, Milić V, Popović B, Damjanović T, Maksimović N, Bunjevački V et al. Association of C35T polymorphism in dihydrofolate reductase gene with toxicity of methotrexate in rheumatoid arthritis patients. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*. 2019;15(3):253-7.
66. Rozen R. Genetic predisposition to hyperhomocysteinemia: deficiency of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR). *Thrombosis and haemostasis*. 1997;78(07):523-6.
67. Blom HJ, Smulders Y. Overview of homocysteine and folate metabolism. With special references to cardiovascular disease and neural tube defects. *Journal of inherited metabolic disease*. 2011;34:75-81.
68. Van der Put NM, Gabreëls F, Stevens EM, Smeitink JA, Trijbels FJ, Eskes TK et al. A second common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: an additional risk factor for neural-tube defects?. *The American Journal of Human Genetics*. 1998;62(5):1044-51.

69. 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;64(3):169–72.
70. Milic V, Jekic B, Lukovic L, Bunjevacki V, Milasin J, Novakovic I et al. Association of dihydrofolate reductase (DHFR) -317AA genotype with poor response to methotrexate in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol*. 2012;30(2):178.
71. Salazar J, Moya P, Altes A, Diaz-Torne C, Casademont J, Cerda-Gabaro D et al. Polymorphisms in genes involved in the mechanism of action of methotrexate: are they associated with outcome in rheumatoid arthritis patients?. *Pharmacogenomics*. 2014;15(8):1079–90.
72. Sharma S, Das M, Kumar A, Marwaha V, Shankar S, Singh P et al. Purine biosynthetic pathway genes and methotrexate response in rheumatoid arthritis patients among north Indians. *Pharmacogenet Genomics*. 2009;19(10):823–8.
73. Wessels JAM, Kooloos WM, De Jonge R, De Vries-Bouwstra JK, Allaart CF, Linssen A et al. Relationship between genetic variants in the adenosine pathway and outcome of methotrexate treatment in patients with recent-onset rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2006;54(9):2830–9.
74. Jenko B, Lusa L, Tomsic M, Praprotnik S, Dolzan V. Clinical–pharmacogenetic predictive models for MTX discontinuation due to adverse events in rheumatoid arthritis. *The Pharmacogenomics Journal*. 2017;17(5):412–8.
75. Burgis NE. A disease spectrum for ITPA variation: advances in biochemical and clinical research. *Journal of Biomedical Science*. 2016;23:1–3.
76. Dervieux T, Wessels JA, van der Straaten T, Penrod N, Moore JH, Guchelaar HJ et al. Gene–gene interactions in folate and adenosine biosynthesis pathways affect methotrexate efficacy and tolerability in rheumatoid arthritis. *Pharmacogenetics and genomics*. 2009;19(12):935–44.
77. Fransen J, Kooloos WM, Wessels JA, Huizinga TW, Guchelaar HJ, Van Riel PL et al. Clinical pharmacogenetic model to predict response of MTX monotherapy in patients with established rheumatoid arthritis after DMARD failure. *Pharmacogenomics*. 2012;13(9):1087–94.
78. Haskó G, Antonioli L, Cronstein BN. Adenosine metabolism, immunity and joint health. *Biochemical pharmacology*. 2018;151:307–13.
79. Montesinos MC, Desai A, Delano D, Chen JF, Fink JS, Jacobson MA et al. Adenosine A2A or A3 receptors are required for inhibition of inflammation by methotrexate and its analog MX68. *Arthritis & Rheumatism*. 2003;48(1):240–7.
80. Varani K, Padovan M, Vincenzi F, Targa M, Trotta F, Govoni M et al. A2A and A3 adenosine receptor expression in rheumatoid arthritis: upregulation, inverse correlation with disease activity score and suppression of inflammatory cytokine and metalloproteinase release. *Arthritis research & therapy*. 2011;13(6):1–3.
81. Hider SL, Thomson W, Mack LF, Armstrong DJ, Shadforth M, Bruce IN. Polymorphisms within the adenosine receptor 2a gene are associated with adverse events in RA patients treated with MTX. *Rheumatology*. 2008;47(8):1156–9.
82. Kobold N, Jenko B, Tomšič M, Dolžan V, Praprotnik S. ADORA2A Polymorphisms Influence Methotrexate Adverse Events in Rheumatoid Arthritis. *The Israel Medical Association Journal: IMAJ*. 2019;21(5):333–8.
83. Soukup T, Dosedel M, Nekvindova J, Antonin Kubena A, Tacheci I, Duintjer Tebbens J et al. The plausible association of MTHFR and ADORA2A polymorphisms with nodules in rheumatoid arthritis patients treated with methotrexate. *Pharmacogenetics and Genomics*. 2017;27(2):43–50.
84. Collins JE, Johansson FD, Gale S, Kim S, Shrestha S, Sontag D et al. Predicting remission among patients with rheumatoid arthritis starting tocilizumab monotherapy: model derivation and remission score development. *ACR Open Rheumatology*. 2020;2(2):65–73.
85. Jenko B, Tomšič M, Jekić B, Milić V, Dolžan V, Praprotnik S. Clinical pharmacogenetic models of treatment response to methotrexate monotherapy in Slovenian and Serbian rheumatoid arthritis patients: differences in patient’s management may preclude generalization of the models. *Frontiers in pharmacology*. 2018;9:20.
86. Pjevic MD, Bumbasirevic LB, Vojvodic L, Grk M, Maksimovic N, Damjanovic T et al. Analysis of the association between polymorphisms within PAI-1 and ACE genes and ischemic stroke outcome after rt-PA therapy. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*. 2019;22:142–9.
87. Dusanovic Pjevic M, Jekic B, Beslac Bumbasirevic L, Vojvodic L, Damjanovic T, Grk M et al. TT genotype of the MMP-9-1562C/T polymorphism may be a risk factor for thrombolytic therapy-induced hemorrhagic complications after acute ischemic stroke. *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy*. 2021;41(7):562–71.
88. Berlacher M, Mastouri R, Philips S, Skaar TC, Kreutz RP. Common genetic polymorphisms of adenosine A2A receptor do not influence response to regadenoson. *Pharmacogenomics*. 2017;18(6):523–9.

89. Turčin A, Dolžan V, Porcelli S, Serretti A, Plesničar BK. Adenosine hypothesis of antipsychotic drugs revisited: pharmacogenomics variation in nonacute schizophrenia. *Omics: A Journal of Integrative Biology*. 2016;20(5):283-9.
90. Relling MV, Schwab M, Whirl-Carrillo M, Suarez-Kurtz G, Pui CH, Stein CM et al. Clinical pharmacogenetics implementation consortium guideline for thiopurine dosing based on TPMT and NUDT 15 genotypes: 2018 update. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. 2019;105(5):1095-105.
91. Lima JJ, Thomas CD, Barbarino J, Desta Z, Van Driest SL, El Rouby N et al. Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC) guideline for CYP2C19 and proton pump inhibitor dosing. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. 2021;109(6):1417-23.

MOLEKULARNA BIOLOGIJA BILJAKA

MOLECULAR BIOLOGY OF PLANTS



Ekstrakti briofita kao imunomodulatori

Tanja Lunić, Bojan Božić, Biljana Božić Nedeljković

Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet, Institut za Fiziologiju i Biohemiju „Ivan Đaja“, Beograd

Kontakt: tanja.lunic@bio.bg.ac.rs

Apstrakt

Briofite (mahovine, jetrenjače i rožnjače) predstavljaju drugu najveću grupu kopnenih biljaka posle cvetnica, sa više od 20 000 vrsta rasprostranjenih širom sveta. Iako se od davnina koriste u tradicionalnoj medicini, tek je u skorije vreme počelo intenzivnije istraživanje njihovog hemijskog sastava, kao i potencijalnih bioloških aktivnosti. Među mnogobrojnim aktivnim komponentama briofita, polifenoli i triterpeni predstavljaju najvažnije grupe jedinjenja, koja su ujedno i nosioci njihove biološke aktivnosti. Antioksidativni, anti-inflamatorni, antitumorski, antineurodegenerativni, antimikrobni, antidijabetični i proregenerativni potencijal ekstrakata različitih briofita dokazan je u velikom broju studija. Ovaj pregledni rad ima za cilj da predstavi najnovija istraživanja o hemijskom sastavu i biološkim aktivnostima ekstrakata briofita sa posebnim osvrtom na mahovine *Hypnum cupressiforme* i *Hedwigia ciliata* i njihovoj potencijalnoj upotrebi kao imunomodulatora u prevenciji i/ili terapiji različitih bolesti čoveka.

Ključne reči: ekstrakti briofita, anti-inflamatorna aktivnost, antitumorska aktivnost, antimikrobna aktivnost, antidijabetična aktivnost, proregenerativna aktivnost

Bryophyte extracts as immunomodulators

Tanja Lunić, Bojan Božić, Biljana Božić Nedeljković

University of Belgrade, Faculty of Biology, Institute of Physiology and Biochemistry "Ivan Đaja", Belgrade

Correspondence: tanja.lunic@bio.bg.ac.rs

Abstract

Bryophytes (mosses, liverworts, and hornworts) are the second largest group of land plants after flowering plants, with more than 20,000 species distributed worldwide. Although they have been used in traditional medicine since ancient times, their chemical composition and potential biological activities have only recently begun to be studied more intensively. Among the numerous bioactive constituents of moss plants, polyphenols and triterpenes represent the most important groups of compounds, which are also carriers of their biological activity. The antioxidant, anti-inflammatory, antitumor, antineurodegenerative, antimicrobial, antidiabetic, and proregenerative potential of various moss extracts have been confirmed in a large number of studies. This review presents the latest research on the chemical composition and biological activity of bryophyte extracts with special reference to the mosses *Hypnum cupressiforme* and *Hedwigia ciliata* and their potential use as immunomodulators in the prevention and/or therapy of various human diseases.

Keywords: bryophyte extracts, anti-inflammatory activity, antitumor activity, antimicrobial activity, antidiabetic activity, proregenerative activity

Briofite

Briofite ili mahovine u širem smislu reči (podcarstvo Bryobiotina) predstavljaju drugu najzastupljeniju grupu kopnenih biljaka koja objedinjuje tri razdela: rožnjače (Anthocerotophyta), jetrenjače (Marchantiophyta) i mahovine u užem smislu (Bryophyta). Izraz „bryophyta” vodi poreklo iz grčkog jezika, i opisuje biljke koje nakon hidratacije imaju sposobnost da „nabubre”. Briofite su prve kopnene biljke koje su bile sposobne da žive van vodenih staništa, ali im je za razviće i dalje bila potrebna voda. Iako njihov životni ciklus zavisi od prisustva vode, postoje vrste koje su otporne na sušu i mogu da prežive visoke temperature [1]. Prve vrste briofita (precisno talusnih jetrenjača) su se pojavile pre oko 472 miliona godina, što ih svrstava među evolutivno najstarije biljke na Zemlji, te se za njih veruje da su precisno današnjih kopnenih biljaka [2].

Briofite se po svojim karakteristikama izdvajaju od ostalih viših biljaka; one nemaju diferencirana provodna tkiva (vaskularne elemente) zbog čega se smatraju „nižim višim biljkama”. Zbog nedostatka provodnih elemenata, usvajanje vode i hranljivih supstanci odvija se preko čitave površine biljke pomoću osmoze i difuzije. Osim toga, briofite nemaju prava pokrovna niti mehanička tkiva. Opseg veličina im je u rasponu od svega nekoliko milimetara do nešto manje od metra. Jedan od razloga njihove male veličine jeste nemogućnost sinteze lignina, koji omogućava biljkama da sprovode vodu i minerale, kao i da stoje uspravno. Ipak, utvrđeno je da u ćelijskim zidovima nekih vrsta briofita postoje jedinjenja koja su slična ligninu [3].

Jedna od glavnih karakteristika briofita je dominacija haploidnog gametofita u životnom ciklusu. Kod odraslih briofita uočavaju se dve strukture: zeleni deo koji može biti listasti ili talusni (*gametofit*) i spora, odnosno kapsula sa osnovom (*sporofit*) (Slika 1). Gametofit briofita je specifičan, obično je uspravan i ima fotosintetsku funkciju, za razliku od gametofita cvetnica, koji učestvuje samo u procesu reprodukcije. Briofite nemaju razvijene vegetativne organe – koren, stablo i list kao vaskularne biljke, već strukture koje su nalik ovim organima, a koje se nazivaju rizoidi, kauloidi i filoidi. Sa druge strane, sporofit generacija je diploidna faza u razvoju, koja ima ulogu u donošenju i disperziji spora [4].

Procenjuje se da postoji više od 20 000 vrsta briofita, iako njihov tačan broj nije jasno utvrđen [5]. Zastupljene su u gotovo svim delovima sveta, na najrazličitijim staništima i svim klimatskim zonama, a često su dominantne na mestima gde vaskularne biljke ne rastu. Mogu se naći na zemljištu, kamenju, stenama, drveću, planinskim liticama, trulim deblima i krovovima. U gotovo svim ekosistemima u kojima su prisutne, briofite imaju veliki značaj i doprinose pravilnom funkcionisanju životne sredine. Između ostalog, njihova uloga se ogleda u povećanju biomase, proizvodnji različitih organskih supstanci, kontrolisanju erozivnih procesa, kao i zadržavanju i filtraciji sedimenta i vode. Osim toga, briofite predstavljaju pogodno stanište za mnoge alge, gljivice, beskičmenjake i vodozemce. Poznate su i kao hiperakumulatori teških metala i organskih zagađivača pa se koriste u biomonitoringu ovih polutanata [1].

Predstavnici briofita se od davnina koriste u tradicionalnoj medicini širom sveta, a posebno u Kini, Evropi, Severnoj Americi i Indiji [3]. Njihov antimikrobni potencijal bio je dobro poznat, te su se koristile za lečenje različitih patoloških stanja, posebno onih izazvanih bakterijskim infekcijama. Takođe, koristile su se za lečenje kardiovaskularnih bolesti, bronhitisa, kožnih infekcija, rana i opekotina, kao i različitih stanja povezanih sa inflamacijom [6]. Iako je njihov potencijal bio prepoznat i tada, briofite nisu bile dovoljno proučavane u prošlosti. Neki od razloga za to su mala veličina ovih biljaka koja otežava sakupljanje veće količine čistog uzorka, kao i teška identifikacija vrsta [3]. Međutim, u poslednje vreme, sa razvojem novih analitičkih metoda, interesovanje za hemijski sastav i biološku aktivnost briofita sve više raste. Brojna jedinjenja, uključujući polisaharide, flavonoide, masne kiseline, alifatična jedinjenja, kao i aromatična i fenolna

jedinjenja identifikovana u briofitama predstavljaju nosioce imunomodulatorne aktivnosti koju ekstrakti ovih biljaka ispoljavaju [1].

Imunomodulacija

Imunomodulacija predstavlja terapijski pristup koji ima za cilj izazivanje promena u postojećem imunskom odgovoru u organizmu, bilo da to podrazumeva njegovu stimulaciju ili supresiju [7]. Supstance koje utiču na imunski sistem se nazivaju imunomodulatori, a u zavisnosti od efekta koji ostvaruju, mogu se svrstati u dve glavne grupe: imunostimulatori i imunosupresori [8]. Modulacija imunskog odgovora se pokazala kao efikasna terapija za mnoga oboljenja, a u zavisnosti od toga koje oboljenje je u pitanju, u upotrebi su različiti imunomodulatori. Na primer, *imunostimulacija* je važna u borbi protiv različitih infekcija i tumora, kao i kod imunodeficijencija, gde je neophodno da se imunski sistem aktivira kako bi se efikasno odbranio. Sa druge strane, *imunosupresija* je značajna u terapiji autoimunskih bolesti, hroničnih inflamatornih procesa, a veoma važnu ulogu ima i u prevenciji odbacivanja organa nakon transplatacije i u gotovo svim slučajevima kada treba ograničiti delovanje imunskog sistema [9].

Već dugi niz godina biljke se koriste kao terapijski resursi u obliku čajeva, kao sirovi ekstrakti ili kao obogaćene frakcije u farmaceutskim preparatima poput tinktura, tečnih ekstrakata, praškova, pilula i kapsula. Ova drevna praksa korišćenja biljaka u medicinske svrhe i danas je značajna u mnogim kulturama i oblastima zdravstva, pa tako čak i danas jedinjenja prirodnog (biljnog) porekla i dalje igraju važnu ulogu u razvoju novih lekova [10]. Naime, Svetska zdravstvena organizacija procenila je da se čak 80% ljudi u zemljama u razvoju (65% svetske populacije) i dalje u velikoj meri oslanja na tradicionalnu medicinu u lečenju različitih patoloških stanja [11]. Biljke su oduvek predstavljale značajan izvor lekova jer proizvode širok spektar bioaktivnih molekula, od kojih je većina nastala kao hemijska odbrana od nepovoljnih uslova u spoljašnjoj sredini.

Među ostalim biljkama, ekstrakti briofita su pokazali imunomodulatorni potencijal, zbog čega se sve više ispituju u poslednje vreme. Veliki broj biološki aktivnih jedinjenja otkriven je u ovim vrstama, a mnoga jedinjenja koja su izolovana iz briofita pokazala su izuzetne biološke aktivnosti kao što su antibakterijska, antifungalna i antivirusna, zatim antioksidativna, antitumorska, anti-inflamatorna, antidijabetična, kao i mnoge druge. Stoga su briofite postale predmet istraživanja velikog broja savremenih studija u kojima se ispituje njihov imunomodulatorni potencijal i moguća upotreba za razvoj novih lekova [1, 12-14]. Neke od dokazanih imunomodulatornih aktivnosti briofita koje su prikazane u ovom radu su antitumorska, antimikrobna i proregenerativna u sklopu imunostimulatornog potencijala briofita, ali i anti-inflamatorna, antineurodegenerativna i antidijabetična u sklopu njihovog imunosupresivnog potencijala (Slika 2).

Briofite kao imunostimulatori

Antitumorski potencijal

Tumorska oboljenja spadaju u najčešće i najopasnije bolesti današnjice koje oduzimaju milione ljudskih života godišnje [15]. Tumore karakteriše nekontrolisani rast ćelija, invazija i uništavanje susednih tkiva, a mogu biti maligni i benigni u zavisnosti od agresivnosti i sposobnosti metastaziranja. Osim klasičnih modaliteta lečenja (hirurgija, zračenje i hemoterapija) kao oblika borbe protiv različitih vrsta tumora, potreba za alternativnim terapeutima sve je veća. Poslednjih godina raste interesovanje za upotrebu prirodnih imunomodulatora, uglavnom imunostimulatora, kao suplemenata u kombinaciji sa uobičajenim terapi-

jaskim modalitetima u tretmanu osoba sa tumorom, kako bi se poboljšao imunski odgovor protiv tumora i smanjio efekat supresije do kog dovodi hemoterapija zajedno sa samim imunosupresivnim mehanizmima tumora [16]. Zbog raznovrsnog sadržaja sekundarnih metabolita (fenoli, fenolne kiseline, flavonoidi, terpeni, lipidi), briofite i generalno biljke predstavljaju dobre kandidate za nova, manje toksična i selektivnija terapijska sredstva u borbi protiv tumora [2, 13]. Antitumorski lekovi dobijeni iz biljaka mogu da deluju različitim mehanizmima pri čemu je jedan od najčešćih efekat na inhibiciju proliferacije tumorskih ćelija, a to se može postići indirektnim uticajem na ćelijski ciklus ili direktnim citotoksičnim efektom.

Iako mehanizmi antitumorske aktivnosti briofita nisu u potpunosti razjašnjeni, pokazano je da njihovi ekstrakti mogu aktivirati različite biohemijske puteve i izazvati apoptozu i/ili nekrozu tumorskih ćelija [17]. Brojne studije su pokazale da fenolna i flavonoidna jedinjenja, zajedno sa terpenoidima, predstavljaju neke od glavnih sekundarnih metabolita prisutnih u briofitama koji su odgovorni za njihova antiproliferativna svojstva [13, 18-20]. Sposobnost fenolnih i flavonoidnih jedinjenja da spreče i/ili usporu rast tumorskih ćelija zasnovana je na njihovoj interakciji sa osnovnim ćelijskim procesima povezanim sa proliferacijom ćelija, diferencijacijom, inflamacijom, apoptozom i angiogeneom [13, 17, 21, 22]. Jedan od mehanizama uključenih u inhibiciju rasta tumorskih ćelija je indukcija različitih apoptotskih puteva, pa je tako pokazano da se apoptoza nekih tumorskih ćelija podstiče prekomernom produkcijom reaktivnih vrsta kiseonika (RVK) i azot oksida (NO) u ovim ćelijama [23, 24]. RVK i NO deluju kao sekundarni glasnici u ćelijskoj signalizaciji i neophodni su za različite biološke procese u normalnim ćelijama, ali takođe mogu biti uključeni u razvoj mnogih patologija. Iako je uloga RVK i NO u tumorima nedovoljno razjašnjena, pokazano je da tumorske ćelije obično proizvode RVK i NO u višku, što ih zauzvrat čini osetljivijim na dalji oksidativni stres, te je upravo ovo jedna od strategija koje se koriste u borbi protiv tumora.

Vodeni, vodeno-etanolni i etil-acetatni ekstrakti mahovine *Hypnum cupressiforme* dobijeni ekstrakcijom pomoću Sokslet aparature pokazali su značajan antiproliferativni potencijal prema ćelijama tumora dojke ljudi (MDA-MB-231). Ekstrakti su pri koncentraciji od 10 µg/mL značajno smanjili metaboličku aktivnost ovih tumorskih ćelija (približno za 50%) [13]. Slični rezultati (~50% smanjenje metaboličke aktivnosti ćelija) dobijeni su za vodeno-etanolne i etil-acetatne ekstrakte mahovine *Hedwigia ciliata* dobijene istom procedurom ekstrakcije, pri istoj koncentraciji ekstrakata, na MDA-MB-231 ćelijama [14]. Ekstrakti obe vrste značajno su povećali produkciju kako RVK tako i NO u MDA-MB-231 ćelijama, što se može povezati sa značajnim antiproliferativnim potencijalom koji su ekstrakti *H. cupressiforme* i *H. ciliata* pokazali. Dakle, ovi rezultati ukazuju na to da antiproliferativni efekti ekstrakata mahovine *H. ciliata* i *H. cupressiforme* prema MDA-MB-231 ćelijama mogu biti posredovani povećanom proizvodnjom RVK i NO od strane samih tumorskih ćelija; međutim tačan mehanizam još uvek nije dovoljno razjašnjen, te su neophodna dalja istraživanja u ovom smeru. Sa druge strane, isti ekstrakti mahovine *H. cupressiforme* i *H. ciliata* nisu ispoljili značajan antiproliferativni efekat ka ćelijskoj liniji tumora debelog creva ljudi (HCT-116) [13, 14]. U drugoj studiji, metanolni ekstrakt mahovine *H. cupressiforme* je inhibirao proliferaciju HeLa ćelija (ćelije karcinoma grlića materice) za 11,92% pri dozi od 25 µg/mL, 18,73% u dozi od 50 µg/mL, 38% u dozi od 100 µg/mL, i 54,47% u dozi od 200 µg/mL, pokazujućina taj način snažan antiproliferativni efekat. U istoj studiji dobijen je umeren antiproliferativni efekat ekstrakata ove mahovine ka epitelnim ćelijama karcinoma pluća (A549) [12].

Antimikrobni potencijal

Poslednjih godina, usled rastućeg razvoja otpornosti patogena na neke od često korišćenih antibiotika, kao i povećanja stope mortaliteta od bakterijskih i gljivičnih infekcija, postoji velika potreba za novim, efikasnijim i selektivnijim antimikrobnim agensima. Briofite su od davnina korišćene kao antimikrobni agensi, u

tradicionalnoj kineskoj i indijskoj medicini u obliku hirurških zavoja, obloga i pelena, kao i za druge primene kod čoveka [6]. Iako briofite normalno rastu u vlažnim staništima, u odnosu na ostale biljke, one su manje podložne gljivičnim infekcijama, a takođe su i relativno otporne na bakterijske infekcije. Odsustvo infekcija kod ovih vrsta ukazuje su na to da briofite imaju sposobnost konstitutivne ili inducibilne proizvodnje antimikrobnih jedinjenja širokog spektra [25]. Ova jedinjenja se sintetišu kao odbrambeni mehanizam protiv različitih vrsta patogena i štite ove inače delikatne biljke ne samo od bakterija i gljivica, već i od raznih insekata i puževa [26]. Terpeni, bibenzili, polifenoli i flavonoidi identifikovani u briofitama predstavljaju neke od antimikrobnih jedinjenja koji su efikasni protiv širokog spektra mikroorganizama. Danas je sve već broj studija koje ispituju antibakterijski, antifungalni i antivirusni potencijal ovih vrsta sekundarnih metabolita. Na primer, otkriveno je da biflavonoidi (hipnogenol B1 i hipnumflavonoid A) identifikovani u mahovini *H. cupressiforme* poseduju antibakterijsku aktivnost protiv nekoliko različitih vrsta mikroorganizama [27].

Proregenerativni potencijal

Lekovite biljke i njihovi ekstrakti se od davnina koriste kao sredstva za poboljšanje zarastanja rana, a njihov proregenerativni potencijal je pokazan u mnogim *in vitro* i *in vivo* studijama. Pokazano je da različiti biljni ekstrakti povećavaju proliferaciju, migraciju, diferencijaciju i sekretornu aktivnost fibroblasta i keratinocita, ključnih ćelija za proces zarastanja rane. Takođe, u prisustvu različitih proizvoda biljnog porekla podstiču se angiogeneza, depozicija ekstracelularnog matriksa, kao i epitelizacija [28-31]. Briofite i njihovi ekstrakti su se tradicionalno koristili u Kini, Evropi i Severnoj Americi za lečenje posekotina, modrica, opekotina, spoljašnjih rana i generalno povreda kože, a njihov proregenerativni potencijal pokazan je u nekoliko studija. Etanolni ekstrakt mahovine *Brachymenium exile* pokazao je potencijal u zarastanju rane u *in vitro* uslovima [32], a ekstrakti mahovina *Tortula muralis* i *Grimmia pulvinata* ispitani u *in vitro* uslovima na fibroblastima čoveka (HFF-1 ćelijska linija) doveli su do povećane proliferacije i poboljšanog zatvaranja rane u takozvanom „scratch“ testu [33]. Ekstrakti jetrenja *Reboulia hemisphaerica*, *Plagiochasma rupestre* i *Targionia hypophylla* su takođe ispoljili dobar proregenerativni potencijal.

Briofite kao imunosupresori

Anti-inflamatorni i antineurodegenerativni potencijal

Inflamacija (lat. *inflammatio* – zapaliti) je složena, multikomponentna reakcija imunskog sistema na različita oštećenja izazvana fizičkom povredom, infekcijom, toksinima i mnogim drugim agensima. Neke od karakteristika inflamacije su crvenilo, toplota, otok i bol na mestu povrede. U ovaj proces uključene su ćelije imunskog sistema i signalni molekuli, pri čemu veoma važnu ulogu ima kontrolisana migracija leukocita na mesto povrede/infekcije [9]. U oštećenom tkivu se od prvobitne povrede do konačnog oporavka dešavaju progresivne promene koje za cilj imaju uklanjanje izazivača inflamacije i reparaciju tkiva. Međutim, i sam imunski odgovor može da izazove oštećenja i dovede do stanja akutne ili hronične inflamacije, što se dešava kod bolesti poput astme, reumatoidnog artritisa ili ateroskleroze [9, 34]. U ovakvim slučajevima, kada imunski odgovor postaje neadekvatan i nekontrolisan, koriste se anti-inflamatorni ili imunosupresivni lekovi. Brojna istraživanja ukazuju na prisustvo anti-inflamatornih jedinjenja u različitim biljnim ekstraktima, pri čemu se posebno ističu briofite kao bogati izvori novih biološki aktivnih jedinjenja [2, 35, 36].

Ekstrakti dobijeni iz biljaka, uključujući briofite, korišćeni su za ublažavanje i lečenje različitih poremećaja povezanih sa inflamacijom u tradicionalnoj medicini mnogih civilizacija [6]. Brojna jedinjenja, uključujući polisaharide, flavonoide, masne kiseline, alifatična jedinjenja, kao i aromatična i fenolna jedinjenja koja

su detektovana u briofitama, povezana su sa efektima koje ove biljke ispoljavaju [37]. Briofite su se koristile u tradicionalnoj medicini za lečenje posekotina, opekotina, rana, zapaljenja urinarnog trakta, groznice i drugih inflamatornih stanja [6, 37]. Kada je u pitanju anti-inflamatorni i neuroprotektivni potencijal ovih biljaka, briofite imaju sposobnost da smanje proizvodnju RVK, NO i proinflamatornih citokina od strane ćelija aktivirane mikroglije, da inhibiraju različite enzime povezane sa inflamacijom (inducibilnu azot oksid sintazu (iNOS), acetilholinesterazu (AChE) i tirozinazu), kao i da smanje neurocitotoksičnost solubilnih medijatora oslobođenih iz lipopolisaharidom aktivirane mikroglije prema SH-SY5Y neuronima čoveka [13, 14, 38].

Mikroglija predstavlja specijalizovanu populaciju makrofaga široko rasprostranjenih u mozgu. Ćelije mikroglije posreduju u imunskom odgovoru u centralnom nervnom sistemu gde uklanjaju oštećene neurone i ćelijske ostatke procesom fagocitoze [9]. Kada se ove ćelije aktiviraju, u odgovoru na patogene ili različite povrede, one proizvode niz različitih inflamatornih medijatora, uključujući RVK, NO i citokine, čija prekomerna produkcija može dovesti do neuroinflamacije, koja se nalazi u osnovi mnogih neurodegenerativnih bolesti, kao što su Alchajmerova i Parkinsonova bolest, multipla skleroza i cerebralna ishemija [39]. Azot oksid je važan signalni molekul koji ima ulogu kako u fiziološkim tako i u različitim patološkim procesima. Prekomerna proizvodnja RVK i NO može nastati kao posledica povrede tkiva. Velike količine NO se sintetiše delovanjem iNOS nakon stimulacije ćelija različitim endotoksinima i citokinima [9]. Dakle, prekomerna produkcija NO nastala indukcijom aktivnosti iNOS može dovesti do razvoja neurodegenerativnih oboljenja. Kako bi terapija ovakvih stanja bila efikasnija bitno je pronalaženje novih, prirodnih jedinjenja koja sprečavaju prekomernu produkciju NO i tako smanjuju inflamaciju.

S druge strane, inhibicija enzima kao što su AChE i tirozinaza, koji su povezani sa razvojem neurodegenerativnih poremećaja u čijoj se osnovi nalazi inflamacija, predstavlja jednu od strategija za pronalaženje novih i efikasnijih tretmana. AChE je enzim čija je primarna funkcija razgradnja neurotransmitera acetilholina (ACh), čime se njegova količina u sinapsama smanjuje. S obzirom na to da je jedna od glavnih karakteristika Alchajmerove bolesti gubitak pamćenja uzrokovan upravo smanjenom količinom ACh, inhibicija AChE predstavlja efikasan terapijski pristup u lečenju Alchajmerove bolesti [40]. Tirozinaza je enzim uključen u proizvodnju melanina u koži i kosi, a takođe doprinosi proizvodnji neuromelanina u centralnom nervnom sistemu. Proizvodnja i akumulacija neuromelanina kao i posledično oštećenje neurona povezani su sa nastankom Parkinsonove bolesti. Inhibicija tirozinaze stoga predstavlja važnu metu u razvoju lekova za Parkinsonovu bolest [41].

Etanolni, etil-acetatni, vodeno-etanolni i vodeni ekstrakti mahovine *H. cupressiforme* i *H. ciliata* dobijeni ekstrakcijom pomoću Sokslet aparature pokazali su značajnu anti-inflamatornu aktivnost značajnim smanjenjem produkcije NO od strane lipopolisaharidom aktiviranih BV2 ćelija mikroglije, a doveli su i do povećanja metaboličke aktivnosti ovih ćelija [13, 14]. Isti ekstrakti ove dve vrste mahovine su ispoljili i značajnu inhibitornu aktivnost prema AChE i tirozinazi [13, 14].

Nedavno je pokazano da tretman etil-acetatnim ekstraktima mahovine *H. cupressiforme* dobijenim ekstrakcijom uz pomoć Sokslet aparature smanjuje koncentraciju citokina interleukina 6 i faktora tumorske nekroze α u supernatantima lipopolisaharidom stimuliranih BV2 ćelija mikroglije u poređenju sa njihovim nivoima u supernatantima kontrolnih nestimuliranih ćelija [38]. Ispitivani ekstrakti su takođe značajno smanjili proizvodnju RVK i NO u ćelijama mikroglije skoro do nivoa nestimuliranih kontrolnih ćelija, čime su ublažili inflamaciju indukovanu lipopolisaharidom [38]. Korišćenjem model sistema prenosa supernatanta lipopolisaharidom stimuliranih BV2 ćelija u kulturu SH-SY5Y neurona otkriveno je da tretman BV2 ćelija ekstraktima mahovine *H. cupressiforme* smanjuje neurocitotoksični efekat solubilnih molekula oslobođenih nakon stimulacije lipopolisaharidom, tj. metabolička aktivnost neurona ostaje na nivou kontrolnih netretiranih ćelija, obezbeđujući taj način indirektnu neuroprotekciju [38].

Antidijabetični potencijal

Reakcija na sopstvene molekule koja rezultuje infiltracijom inflamatornih ćelija i posledičnom destrukcijom tkiva može dovesti do pokretanja različitih autoimunskih bolesti. Autoimunske bolesti predstavljaju grupu hroničnih bolesti koje su zastupljene u relativno visokom procentu i među mlađom populacijom, te kao takve imaju značajan uticaj na troškove zdravstvene zaštite. Autoimunske bolesti se razlikuju prema prema ciljnom tkivu/organu na koje su autoimunski procesi usmereni, ali i po svojim kliničkim simptomima i znacima. U nekim slučajevima, imunski odgovor je usmeren na određeni tip ćelija (na primer oligodendrociti kod multiple skleroze ili β ćelije pankreasa kod dijabetesa tipa 1) i to su organ specifične bolesti, a mogu biti i sistemske kada je autoimunski odgovor usmeren prema antigenima koji se nalaze u većem broju tkiva ili organa. Kao što je slučaj i sa mnogim drugim kompleksnim poremećajima, genetski faktori i faktori životne sredine igraju važnu ulogu u razvoju autoimunskih bolesti [42].

Jedna od organ specifičnih autoimunskih bolesti je i dijabetes melitus. To je hronična bolest koju karakteriše nedostatak insulina i/ili insulinska rezistencija što dovodi do hronične hiperglikemije i poremećaja metabolizma ugljenih hidrata, lipida i proteina. Jedan od terapijskih pristupa u terapiji dijabetesa je inhibicija enzima koji hidrolizuju ugljene hidrate, α -amilaze i α -glukozidaze [43]. Iako se sintetički inhibitori enzima koji hidrolizuju ugljene hidrate veoma često koriste u terapiji dijabetesa, ova jedinjenja obično pokazuju različite neželjene efekte, a njihove cene su pritom često veoma visoke. Sa druge strane, inhibitori izolovani iz biljaka predstavljaju dobru alternativu jer pokazuju manje neželjenih efekata, a sa druge strane veoma su efikasni i dosta isplativiji u odnosu na sintetske inhibitore. Neka od jedinjenja za koje je utvrđena antidijabetična aktivnost su fenolna jedinjenja, među kojima se posebno izdvajaju fenolne kiseline i tanini. Iako se zna da su briofite bogate ovim sekundarnim metabolitima, u literaturi ne postoji mnogo radova o antidijabetičnoj aktivnosti briofita. Svega par istraživanja je sprovedeno na ovu temu, gde su ekstrakti mahovina *H. cupressiforme* i *H. ciliata* [13, 14] ili pojedinačne komponente izolovane iz različitih vrsta briofita [2] pokazale značajnu antidijabetičnu aktivnost, uglavnom efikasnom inhibicijom enzima α -glukozidaze i/ili α -amilaze.

Zaključak

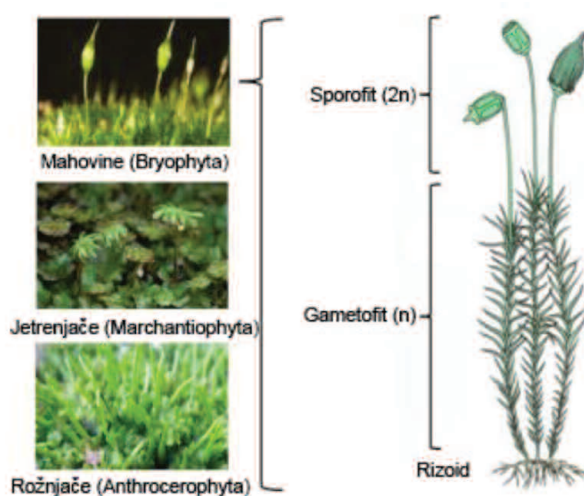
U poslednjih nekoliko decenija, došlo je do značajnog napretka u izolovanju i identifikaciji različitih biološki aktivnih jedinjenja iz biljnih izvora. Briofite, kao biljke koje su zastupljene u gotovo svim delovima sveta i koje čine drugu najveću grupu u biljnom carstvu, poseduju ogroman potencijal za otkrivanje i razvoj novih terapeutika. Briofite predstavljaju dobar izvor biološki aktivnih jedinjenja (fenoli, fenolne kiseline, flavonoidi i triterpeni) sa velikim značajem u prevenciji i/ili lečenju različitih patoloških stanja kao što su tumori, neurodegenerativne bolesti (Alchajmerova i Parkinsonova bolest) ili hronične infekcije. Ipak, kako bismo bolje razumeli mehanizme koji stoje u osnovi aktivnosti briofita, neophodno je sprovesti dodatne studije, posebno u *in vivo* eksperimentalnim uslovima. Sve u svemu, ekstrakti briofita mogli bi pružiti potpuno nove izvore za razvoj novih, efikasnijih i prirodnih lekova za sprečavanje i lečenje različitih patoloških procesa kod čoveka.

Literatura

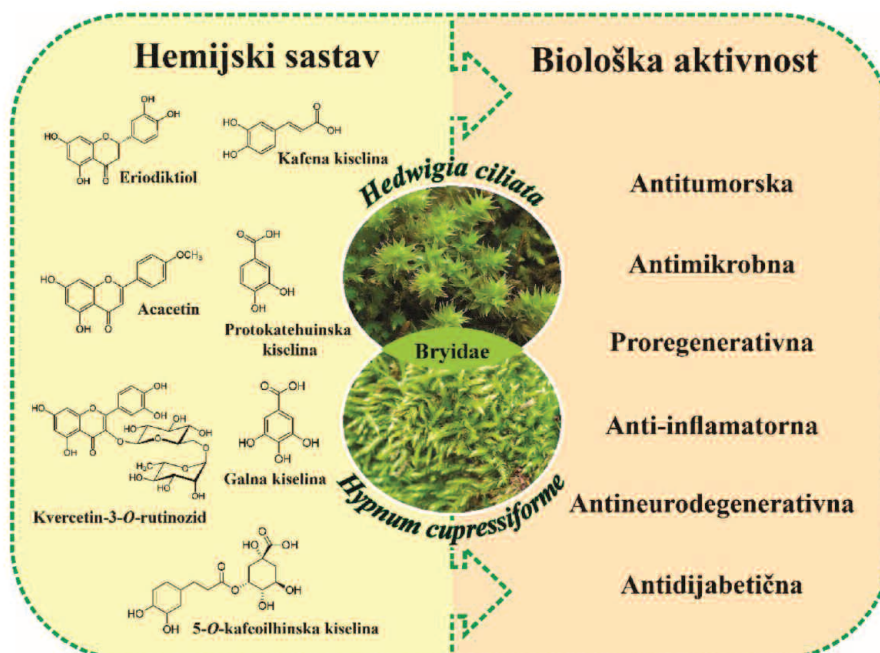
1. S. Marko, B. Aneta, G. Dragoljub, Bryophytes as a potential source of medicinal compounds, *Pregl Rev* 21(1) (2001) 17-29.
2. Y. Asakawa, A. Ludwiczuk, Chemical constituents of bryophytes: structures and biological activity, *Journal of natural products* 81(3) (2017) 641-660.
3. M.S. Sabovljević, A.D. Sabovljević, N.K.K. Ikram, A. Peramuna, H. Bae, H.T. Simonsen, Bryophytes—an emerging source for herbal remedies and chemical production, *Plant genetic resources* 14(4) (2016) 314-327.

4. A.J. Shaw, P. Szövényi, B. Shaw, Bryophyte diversity and evolution: windows into the early evolution of land plants, *American journal of botany* 98(3) (2011) 352-369.
5. M. Dziwak, K. Wróblewska, A. Szumny, R. Galek, Modern Use of Bryophytes as a Source of Secondary Metabolites, *Agronomy* 12(6) (2022) 1456.
6. J. Glime, Medical uses: medical conditions, *Bryophyte Ecology* 5 (2017).
7. N.S. Radulović, S.I. Filipović, D.B. Zlatković, M.R. Đorđević, N.M. Stojanović, P.J. Randjelović, K.V. Mitić, T.M. Jevtović-Stoimenov, V.N. Randelović, Immunomodulatory pinguicane-type sesquiterpenes from the liverwort *Porella cordaeana* (Porellaceae): the "new old" furanopinguicanol and its oxidation product exert mutually different effects on rat splenocytes, *RSC advances* 6(48) (2016) 41847-41860.
8. S. Zhao, Q. Gao, C. Rong, S. Wang, Z. Zhao, Y. Liu, J. Xu, Immunomodulatory effects of edible and medicinal mushrooms and their bioactive immunoregulatory products, *Journal of Fungi* 6(4) (2020) 269.
9. A. Abbas, A. Lichtman, S. Pillai, *Cellular and molecular immunology E-book: Elsevier Health Sciences*, (2014).
10. J. Shi, J.-H. Weng, T.J. Mitchison, Immunomodulatory drug discovery from herbal medicines: Insights from organ-specific activity and xenobiotic defenses, *Elife* 10 (2021) e73673.
11. F.P. Karakaş, A. Yildirim, A. Türker, Biological screening of various medicinal plant extracts for antibacterial and antitumor activities, *Turkish Journal of Biology* 36(6) (2012) 641-652.
12. O.T. Yayintaş, S. Yılmaz, M. Sökmen, Determination of antioxidant, antimicrobial and antitumor activity of bryophytes from Mount Ida (Canakkale, Turkey), (2019).
13. T.M. Lunić, M.M. Oalde, M.R. Mandić, A.D. Sabovljević, M.S. Sabovljević, U.M. Gašić, S.N. Duletić-Laušević, B.D. Božić, B.D. Božić Nedeljković, Extracts Characterization and In Vitro Evaluation of Potential Immunomodulatory Activities of the Moss *Hypnum cupressiforme* Hedw, *Molecules* 25(15) (2020) 3343.
14. M.R. Mandić, M.M. Oalde, T.M. Lunić, A.D. Sabovljević, M.S. Sabovljević, U.M. Gašić, S.N. Duletić-Laušević, B.D. Božić, B.D. Božić Nedeljković, Chemical characterization and in vitro immunomodulatory effects of different extracts of moss *Hedwigia ciliata* (Hedw.) P. Beauv. from the Vršacke Planine Mts., Serbia, *Plos one* 16(2) (2021) e0246810.
15. P. Cianciullo, F. Cimmino, V. Maresca, S. Sorbo, P. Bontempo, A. Basile, Anti-Tumour Activities from Secondary Metabolites and Their Derivatives in Bryophytes: A Brief Review, *Applied Biosciences* 1(1) (2022) 73-94.
16. S.I.A. Mohamed, I. Jantan, M.A. Haque, Naturally occurring immunomodulators with antitumor activity: an insight on their mechanisms of action, *International immunopharmacology* 50 (2017) 291-304.
17. A. Dey, A. Mukherjee, Therapeutic potential of bryophytes and derived compounds against cancer, *Journal of acute disease* 4(3) (2015) 236-248.
18. J. Wang, X. Fang, L. Ge, F. Cao, L. Zhao, Z. Wang, W. Xiao, Antitumor, antioxidant and anti-inflammatory activities of kaempferol and its corresponding glycosides and the enzymatic preparation of kaempferol, *PLoS One* 13(5) (2018) e0197563.
19. X. Shi, X. Luo, T. Chen, W. Guo, C. Liang, S. Tang, J. Mo, Naringenin inhibits migration, invasion, induces apoptosis in human lung cancer cells and arrests tumour progression in vitro, *Journal of cellular and molecular medicine* 25(5) (2021) 2563-2571.
20. L.P. Pelinson, C.E. Assmann, T.V. Palma, I.B.M. da Cruz, M.M. Pillat, A. Mânica, N. Stefanello, G.C.C. Weis, A. de Oliveira Alves, C.M. de Andrade, Antiproliferative and apoptotic effects of caffeic acid on SK-Mel-28 human melanoma cancer cells, *Molecular biology reports* 46 (2019) 2085-2092.
21. B.-s. Teng, Y.-H. Lu, Z.-T. Wang, X.-Y. Tao, D.-Z. Wei, In vitro anti-tumor activity of isorhamnetin isolated from *Hippophae rhamnoides* L. against BEL-7402 cells, *Pharmacological research* 54(3) (2006) 186-194.
22. X. Hu, Z. Yang, W. Liu, Z. Pan, X. Zhang, M. Li, X. Liu, Q. Zheng, D. Li, The anti-tumor effects of p-coumaric acid on melanoma A375 and B16 cells, *Frontiers in Oncology* 10 (2020) 558414.
23. M.Y. Kim, E.O. Choi, H. HwangBo, D.H. Kwon, K. Im Ahn, H.J. Kim, S.Y. Ji, S.-H. Hong, J.-W. Jeong, G.Y. Kim, Reactive oxygen species-dependent apoptosis induction by water extract of *Citrus unshiu* peel in MDA-MB-231 human breast carcinoma cells, *Nutrition Research and Practice* 12(2) (2018) 129-134.
24. B. Brüne, A. von Knethen, K.B. Sandau, Nitric oxide and its role in apoptosis, *European journal of pharmacology* 351(3) (1998) 261-272.
25. F. Savaroglu, S. Ilhan, C. Filik-Isçen, An evaluation of the antimicrobial activity of some Turkish mosses, *Journal of Medicinal Plants Research* 5(14) (2011) 3286-3292.
26. y.E.M. Altuner, K. Canli, I. Akata, Antimicrobial screening of *Calliergonella cuspidata*, *Dicranum polysetum* and *Hypnum cupressiforme*, *Journal of Pure and Applied Microbiology* 8(1) (2014) 539-545.

27. H. Sievers, G. Burkhardt, H. Becker, H.D. Zinsmeister, Further biflavonoids and 3-phenylflavonoids from *Hypnum cupressiforme*, *Phytochemistry* 35(3) (1994) 795-798.
28. T. Ozcan, A. Akpınar-Bayazit, L. Yılmaz-Ersan, B. Delikanlı, Phenolics in human health, *International Journal of chemical engineering and applications* 5(5) (2014) 393.
29. P.V. Habbu, H. Joshi, B. Patil, Ph. cog Rev.: Review Article potential wound healers from plant origin, *Pharmacognosy reviews* 1(2) (2007) 14-28.
30. N. Gupta, U. Jain, Investigation of wound healing activity of methanolic extract of stem bark of *Mimusops elengi* Linn, *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines* 8(2) (2011).
31. R.F. Pereira, P.J. Bartolo, Traditional therapies for skin wound healing, *Advances in wound care* 5(5) (2016) 208-229.
32. G.C. Quintão, G.M. Cavalcante, L.A. Lins, Investigation of wound healing in vitro of specie *Brachymenium exile* (Dozy & Molk.) Bosch & Sande Lac, *Research, Society and Development* 11(4) (2022) e6311427057-e6311427057.
33. G.J. Wolski, B. Sadowska, M. Fol, A. Podsek, D. Kajszyk, A. Kobylńska, Cytotoxicity, antimicrobial and antioxidant activities of mosses obtained from open habitats, *Plos one* 16(9) (2021) e0257479.
34. R. Medzhitov, Origin and physiological roles of inflammation, *Nature* 454(7203) (2008) 428-435.
35. R. Mishra, V.K. Pandey, R. Chandra, Potential of bryophytes as therapeutics, *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research* 5(9) (2014) 3584-3593.
36. A. Tosun, E. Küpeli Akkol, I. Süntar, H. Özenoğlu Kiremit, Y. Asakawa, Phytochemical investigations and bioactivity evaluation of liverworts as a function of anti-inflammatory and antinociceptive properties in animal models, *Pharmaceutical Biology* 51(8) (2013) 1008-1013.
37. J.M. Glime, Volume 5, Chapter 2-2: Medical Uses: Biologically Active Substances, (2017).
38. T.M. Lunić, M.R. Mandić, M.M. Oalđe Pavlović, A.D. Sabovljević, M.S. Sabovljević, B.Đ. Božić Nedeljković, B.Đ. Božić, The influence of seasonality on secondary metabolite profiles and neuroprotective activities of moss *Hypnum cupressiforme* extracts: in vitro and in silico study, *Plants* 11(1) (2022) 123.
39. Q. Alam, M. Zubair Alam, G. Mushtaq, G. A Damanhour, M. Rasool, M. Amjad Kamal, A. Haque, Inflammatory process in Alzheimer's and Parkinson's diseases: central role of cytokines, *Current pharmaceutical design* 22(5) (2016) 541-548.
40. F. Ahmed, R. Ghalib, P. Sasikala, K.M. Ahmed, Cholinesterase inhibitors from botanicals, *Pharmacognosy reviews* 7(14) (2013) 121.
41. I. Carballo-Carbajal, A. Laguna, J. Romero-Giménez, T. Cuadros, J. Bové, M. Martínez-Vicente, A. Parent, M. Gonzalez-Sepulveda, N. Peñuelas, A. Torra, Brain tyrosinase overexpression implicates age-dependent neuromelanin production in Parkinson's disease pathogenesis, *Nature communications* 10(1) (2019) 973.
42. S. Korani, M. Korani, T. Sathyapalan, A. Sahebkar, Therapeutic effects of Crocin in autoimmune diseases: A review, *BioFactors* 45(6) (2019) 835-843.
43. M.O. Pavlović, T. Lunić, S. Graovac, M. Mandić, J. Repac, U. Gašić, B.B. Nedeljković, B. Božić, Extracts of selected Lamiaceae species as promising antidiabetics: Chemical profiling, in vitro and in silico approach combined with dynamical modeling, *Industrial Crops and Products* 186 (2022) 115200.



Slika 1. Podela i opšti izgled briofita.



Slika 2. Hemijski sastav i biološka aktivnost mahovina *Hypnum cupressiforme* i *Hedwigia ciliata*.

Struktura, funkcija i regulacija ekspresije gena za akvaporine pri suši kod biljaka

Marija Đurić

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

Kontakt: marija.djuric@ibiss.bg.ac.rs

Apstrakt

Povećanje prosečnih godišnjih temperatura iz godine u godinu za posledicu ostavlja sve izraženije sušne sezone. Suša nepovoljno utiče na rastenje i razviće biljaka, uzrokujući velike ekonomske gubitke na globalnom nivou. Efekti suše ispoljavaju se kako na morfološkom, tako i na fiziološkom, biohemijskom i molekularnom nivou organizacije biljaka. Izlaganje biljaka suši narušava normalan transport vode kroz ćelije što se odražava i na zastupljenost i funkciju kanala za vodu – akvaporina, na membranama. Akvaporini su transmembranski proteini koji formiraju kanale za prolazak vode i drugih molekula kroz ćelijske membrane. Ispoljavaju veoma značajnu ulogu u prilagođavanju protoka vode kroz ćelije shodno fiziološkom stanju. S obzirom na to, poslednjih godina velika pažnja posvećena je ulozi akvaporina pri odgovorima biljaka na dejstvo suše i drugih abiotičkih stresogenih faktora koji utiču na narušavanje vodnog režima biljaka. Istraživanja su usmerena ka praćenju promena u ekspresiji gena za akvaporine, zastupljenosti akvaporina na membranama i uticaju na usvajanje, transport i odavanje vode u atmosferu. U ovom radu predstavljene su analize strukture i regulacije ekspresije gena za akvaporine, kao i naučna istraživanja u proteklih deset godina o promenama u ekspresiji gena za akvaporine kod biljaka izlaganih suši. Poseban akcenat stavljen je na rezultate bioinformatičkih analiza akvaporina kod hortikulturne vrste *Impatiens walleriana*, i njihovu ekspresiju pri suši i rehidraciji.

Ključne reči: *Impatiens walleriana*, suša, akvaporini, genska ekspresija

Structure, function and regulation of aquaporin gene expression during drought in plants

Marija Đurić

Institute for biological research „Siniša Stanković“, National institute of Republic of Serbia,

University of Belgrade

Correspondence: marija.djuric@ibiss.bg.ac.rs

Abstract

The increase in average annual temperatures from year to year results in pronounced dry seasons. Drought adversely affects the plants growth and development, causing large economic losses on a global scale. The effects of drought are manifested both at the plant morphological, as well at the physiological, biochemical and molecular levels. Exposure of plants to drought disrupts the normal water transport through the cells, which is reflected in the presence and function of water channels - aquaporins, on the membranes. Aquaporins are transmembrane proteins that form channels for the water, and other molecules flow through cell membranes. They play a very important role in adjusting the water flow through the cells according to the physiological state. In view of this, in recent years much attention has been paid to the role of aquaporins in plant responses to drought and other abiotic stress factors, which affect the disruption of the water regime of plants. Researches are aimed at monitoring changes in the expression of genes for aquaporins, the presence of aquaporins on membranes and the influence on the absorption, transport and release of water into the atmosphere. This paper presents analyzes of the structure and regulation of aquaporin gene expression, as well as scientific research over the past ten years on changes in aquaporin gene expression in plants exposed to drought. Special emphasis was placed on the results of bioinformatic analyzes of aquaporins in the horticultural species *Impatiens walleriana*, and their expression during drought and rehydration.

Key words: *Impatiens walleriana*, drought, aquaporins, gene expression

Uvod

U početku, nakon otkrića strukture ćelijske membrane 1920-ih godina, smatralo se da je protok vode između ćelija i tkiva posredovan jednostavnom difuzijom. Međutim, difuzija kroz membrane sa lipidnim dvoslojem je fiziološki vrlo spor proces i ne može podržati brzi transport većih količina vode. Stoga je predložena ideja o prisustvu specijalizovanih pora, odnosno kanala za transport vode. Pretpostavka je najpre potvrđena otkrićem transmembranskog proteina u humanim eritrocitima 80-ih godina prošlog veka [1], dok su malo kasnije slični proteini otkriveni i kod biljaka [2]. Danas je struktura i funkcija ovih proteina u velikoj meri proučena, a zajednički naziv za grupu proteina sa sličnom strukturom i funkcijom u transportu vode i drugih manjih molekula je akvaporini (eng. *Aquaporins* – AQP). Akvaporini predstavljaju najveću grupu proteina uključenih u transport vode i drugih molekula u skoro svim živim organizmima. Često se nazivaju i “kanali za vodu” [3].

Regulisanje transporta vode u biljakama i između biljaka i spoljašne sredine je od vitalnog značaja kako u optimalnim, tako i u stresnim uslovima [4]. S obzirom na to da biljke nemaju specijalizovan cirkulatorni sistem, oslanjaju se u potpunosti na funkciju akvaporina. Posebno je značajno adekvatno regulisanje transporta vode prilikom izlaganja biljaka abiotičkim stresogenim faktorima koji izazivaju dehidraciju tkiva, poput suše. Povećanje prosečnih godišnjih temperatura i sve izraženije sušne sezone iz godine u godinu, rezultuju u velikom broju istraživanja o uticaju ovog stresogenog faktora na rastenje i razviće biljaka [5, 6, 7]. Može se reći da je suša (vodni deficit) jedan od najznačajnijih i najčešće istraživanih abiotičkih stresogenih faktora u fiziologiji stresa kod biljaka. Suša neminovno utiče na usvajanje vode korenovim sistemom, transport vode kroz ćelije i tkiva, kao i na odavanje vode u atmosferu. Ovakve promene posredovane su promenama u ekspresiji gena za akvaporine i njihovoj zastupljenosti i funkciji na biološkim membranama.

Struktura akvaporina i rasprostranjenost kod biljaka

Akvaporini su članovi velike familije membranskih proteina – MIP (eng. Major Intrinsic Proteins) i zastupljeni su u skoro svim živim organizmima izuzev termofilnih arhea i intracelularnih bakterija [8]. Najveći broj akvaporina u svojoj strukturi sadrži šest transmembranskih domena koji imaju sekundarnu strukturu α -heliksa (**Slika 1**) [9], ali identifikovani su i akvaporini sa manje od 5, 5 ili 7 transmembranskih domena [10, 11]. Međutim, ovakvi rezultati proističu iz bioinformatičkih *in silico* analiza struktura akvaporina i nisu potvrđeni eksperimentalno. Petlje A-E povezuju transmembranske domene u okviru jednog monomera akvaporina. U okviru strukture akvaporina, NPA motivi (ponovci aminokiselina asparagin-prolin-alanin na petljama B i E) su najvažniji delovi jer formiraju centralnu poru za prolazak vode i različitih molekula. Pored NPA motiva, važne segmente za protok vode predstavljaju i a/R regioni formirani od po jednog aminokiselinskog ostatka heliksa 2 i 5 i dva aminokiselinska ostatka petlje E. Varijabilnost na a/R filteru, NPA motivima, kao i razmaku između NPA motiva utiče na supstratnu specifičnost biljnih akvaporina. Pored navedenih filtera i NPA motiva, postoje dodatni regioni koji takođe igraju važnu ulogu u specifičnost akvaporina za transport, poznati kao Frogerovi ostaci. Frogerovi ostaci razlikuju akvagliceroporine koji transportuju glicerol i akvaporine koji transportuju vodu [12]. Funkcionalni akvaporin predstavlja tetramernu strukturu koju čine četiri ujedinjena monomera stabilizovana interakcijama preko vodoničnih veza i interakcijama između petlji monomera (**Slika 1**).

Raznolikost akvaporina u biljkama je toliko izražena da se ovi proteini mogu klasifikovati u sedam podfamilija na osnovu njihove lokalizacije i strukture: PIPs (eng. *Plasma membrane Intrinsic Proteins*) – akvaporini zastupljeni na plazma membranama, TIPs (eng. *Tonoplast Intrinsic Proteins*) – akvaporini

zastupljeni na tonoplastu, NIPs (eng. *Noduline like Intrinsic Proteins*) – nodulinu-26 slični akvaporini, GIPs (eng. *GlpF-like proteins*) – akvaporini koji transportuju glicerol, HIPs – hibridni akvaporini (eng. *Hybrid Intrinsic Proteins*), SIPs (eng. *Small basic Intrinsic Proteins*) – mali akvaporini, XIPs (eng. *X Intrinsic Proteins*) – nedovoljno okarakterisani akvaporini [4]. Članovi GIPs podfamilije i hibridni akvaporini su pronađeni kod mahovina i prečica dok ih kod viših biljaka nema, ukazujući na verovatni gubitak tokom evolucije [13, 14]. Svaka podfamilija akvaporina dalje se deli na različite podgrupe koje obuhvataju različite izoforme. Akvaporini su lokalizovani u gotovo svim unutarćelijskim membranama biljaka, uključujući plazma membranu, tonoplast, membranu endoplazmatičnog retikuluma, Goldžijevog aparata i hloroplasta [15]. Takođe, iste izoforme mogu biti zastupljene na više različitih membrana [16].

Podfamilija PIPs je podeljena u dve podgrupe - PIP1 i PIP2 i generalno predstavljaju najveću podfamiliju akvaporina [17, 9]. Razlike između PIP1 i PIP2 podgrupa ogledaju se u dužem N-terminalnom regionu PIP1 izoformi, dok članovi PIP2 podgrupe pokazuju izduženiji C-terminalni domen [18]. Ovi akvaporini se nalaze isključivo na plazma membranama i imaju molekulsku masu od približno 30 kDa. Članovi PIP1 podgrupe mogu transportovati manje molekule ili gasove, a takođe imaju i aktivnost kanala za vodu koja je uglavnom posredovana interakcijama sa drugim akvaporinima, prvenstveno članovima PIP2 podgrupe [19, 20]. Članovi PIP2 podgrupe su zapravo glavni kanali za transport vode što je verovatno povezano sa njihovom strukturnom razlikom u odnosu na izoforme PIP1 podgrupe [21]. Članovi TIPs podfamilije mogu se grupisati u pet podgrupa (TIP1, TIP2, TIP3, TIP4 i TIP5) [17, 4, 9]. Izoforme se nalaze prvenstveno na membrani vakuole (tonoplast) i učestvuju u transportu vode i manjih molekula (glicerol, urea, amonijak) kroz tonoplast, deluju na osmotsko prilagođavanje i regulaciju turgora u ćelijama. Molekulska masa izoformi TIPs podfamilije se kreće između 25 i 28 kDa. Akvaporini podfamilije TIPs su zapravo najzastupljeniji proteini na membranama vakuola [22], što objašnjava zašto je propustljivost tonoplasta za vodu i druge molekule veća od plazma membranske, omogućavajući na taj način brzo osmotsko prilagođavanje i održavanje turgora ćelija. U podfamiliji NIPs okarakterisano je sedam podgrupa (NIP1, NIP2, NIP3, NIP4, NIP5, NIP6, NIP7) [23, 9], čije su izoforme zastupljene na plazma membranama i membranama endoplazmatičnog retikuluma. Pokazano je da mogu da transportuju vodu i glicerol, s tim što je permeabilnost za vodu manja [17]. Podfamilija sa najmanjim brojem članova je SIPs podfamilija, koja obuhvata dve podgrupe – SIP1 i SIP2 [21, 17, 9]. Istraživanja ukazuju da SIPs izoforme učestvuju u transportu vode kroz endoplazmatični retikulum [24]. Najskorije otkrivena podfamilija akvaporina je XIPs koja obuhvata četiri podgrupe - XIP1, XIP2, XIP3, i XIP4 [25, 9]. Izoforme XIPs podfamilije identifikovane su kod mahovina, prečica i skrivenosemenica, ali je zanimljivo da je u okviru skrivenosemenica prisustvo potvrđeno samo kod dikotiledonih biljaka, isključujući monokotile i model biljku *Arabidopsis thaliana* [26, 27]. Locirani su na plazma membranama i učestvuju u transportu manjih molekula uključujući glicerol, ureu, bornu kiselinu, ali ne i u transportu vode [28].

Funkcija i regulacija ekspresije i aktivnosti akvaporina

Sa funkcionalne tačke gledišta, postoji veliki broj istraživanja o višestrukim ulogama biljnih akvaporina. Pored svoje funkcije kanala za transport vode, neki akvaporini takođe mogu olakšati transport drugih molekula od značajne fiziološke važnosti. Dakle, pokazano je da pored vode, akvaporini mogu da transportuju i CO₂, glicerol, ureu, amonijak, metale i metaloide, O₂, čak i reaktivne forme kiseonika – ROS (eng. *Reactive Oxygen Species*) [29, 9]. Regulacija transporta kroz kanale akvaporina je kompleksna i obuhvata različite mehanizme i faktore. Prvi podaci o funkciji akvaporina u biljkama proizlaze iz studija ekspresije gena u različitim ćelijama, tkivima i organima nakon izlaganja različitim uslovima fizičkih faktora [30]. Funkcija akvaporina zavisi od dejstva abiotičkih (suša, temperaturni stres, salinitet, teški metali) i biotičkih stresor-

genih faktora (patogene infekcije, napadi herbivora), genotipa, tipa organa i razvojne faze, te je shodno tome i njihova regulacija ekspresije regulisana različito [9]. Osim toga, jedna izoforma može imati više funkcija zavisno od njene tkivne ili subćelijske lokalizacije [31, 32]. Ekspresija gena za akvaporina regulisana je različitim signalnim putevima i kroz komplikovane procese regulacije transkripcije, translacije i post-translacionih modifikacija, rezultuje u teškom sagledavanju standardnog obrasca ekspresije za svaki pojedinačni gen. Mehanizam otvaranja i zatvaranja akvaporina regulisan je transkripcionim i post-translacionim modifikacijama poput fosforilacije, metilacije, acetilacije, deaminacije i glikozilacije [33]. Na primer, pokazano je da je fosforilacija akvaporina na određenim aminokiselinskim ostacima odgovorna za pojačanu aktivnost, odnosno otvaranje kanala za transport [34, 35, 36]. Navedene modifikacije koje regulišu aktivnost akvaporina su pod direktnom kontrolom biljnih fitohormona [37]. Biljni hormoni su endogeni produkti male molekulske mase i odgovorni su generalno za sve procese rastenja i razvića biljaka, kao i za reakcije biljaka na dejstva različitih stresogenih faktora. Uopšteno, na aktivnost akvaporina utiču fitohormoni giberelini, apscisinska kiselina, citokinini, brasinosteroidi, jasmonati, auksini, etilen i salicilna kiselina [38, 39, 40]. Pored toga, pokazano je da na aktivnost akvaporina može da utiče i promena u pH vrednosti ćelije kao i delovanje određenih hemijskih supstanci [21, 30]. Interakcije između spoljašnjih i unutrašnjih signala menjaju aktivnost gena za akvaporine i vode ka fiziološkom odgovoru koji biljci u datom momentu obezbeđuje maksimalnu adaptiranost na uslove spoljašne sredine.

Ekspresija gena za akvaporine kod biljaka izlaganih suši

S obzirom da većina abiotičkih stresogenih faktora vodi ka dehidraciji tkiva, velika pažnja posvećena je promenama u ekspresiji gena za akvaporine. Najveći broj radova u poslednjih deset godina vezan je za istraživanja na vrstama koje se komercijalno uzgajaju ili na neki način imaju značaj za život ljudi i ishranu životinja. Istraživanja su u najvećoj meri obuhvatala analize ekspresije gena za akvaporine iz podfamilija PIP i TIP, u korenovima ili izdancima.

Kod leguminoze *Galega orientalis* je pokazano da je *PIP1* gen povezan sa tolerancijom na sušu [41]. Naime, gen *GoPIP1* je ispoljavao povećanu ekspresiju u korenovima vrste pri natrijum hloridom (NaCl)- i polietilen glikolom (PEG)- om indukovanoj dehidraciji. Promene u ekspresiji šest gena za akvaporine ispitivane su kod osetljivih i tolerantnih kultivara leblebije (*Cicer arietinum*) izlaganih stresu suše [42]. Rezultati su ukazali da se ekspresija analiziranih gena razlikuje između kultivara u optimalnim uslovima, a takođe i prilikom izlaganja biljaka suši. Naime, ekspresija nekih gena je bila nepromenjena pri suši, dok su određeni geni ispoljavali tendenciju porasta ekspresije, ali i njene redukcije kod oba tipa kultivara. U sličnom istraživanju, autori Hussain i sar. [43] ukazuju na pozitivnu korelaciju između povećane ekspresije *CaPIP2;4* i *CaNIP3;1* izoformi i tolerancije prema suši tolerantnog genotipa leblebije. Takođe, ekspresija *PIP1;1* i *PIP2;1* kod šumske jagode (*Fragaria vesca*) bila je pod uticajem suše i menjala se sa promenom količine vlažnosti u supstratu [44]. U sličnom istraživanju na hibridu jagode (*Fragaria x ananassa*), kod tolerantnijeg kultivara ispoljena je povećana ekspresija određenih TIP izoformi u korenu u odnosu na osetljiviji kultivar tokom suše [45]. Promene u ekspresiji deset gena za akvaporine podgrupa PIP1 i PIP2 analizirane su kod različitih kultivara pirinča (*Oryza sativa*), a uočene su značajne razlike u ekspresiji među kultivarima kako u optimalnim tako i u stresnim uslovima [46]. Autori Hasan i sar. [47] ispitivali su povezanost ekspresije gena za akvaporine i efikasnost korišćenja vode (eng. *Water Use Efficiency* - WUE) u uslovima suše kod manje tolerantnog kukuruza (*Zea mays*) i tolerantnog sirka (*Sorgum bicolor*). Uočeno je da su morfološki (sveža masa, suva masa) i fiziološki parametri (relativni sadržaj vode u listovima, razmena gasova) više redukovani kod kukuruza u odnosu na sirak. Takođe, kod kukuruza WUE je značajno fluktuirao tokom dana u uslovima suše, dok je kod sirka

ispoljavao relativno konstantne vrednosti. Takođe analizirana je ekspresija četiri izoforme akvaporina kod obe vrste (*PIP1;5*, *PIP1;6*, *PIP2;3* i *TIP1;2*). Autori su zaključili da povećana ekspresija gena za akvaporine *PIP1;5* u listovima i *PIP2;3* u korenovima sirka u uslovima suše verovatno doprinosi i konstatnom WUE, a samim tim i većoj toleranciji prema suši u poređenju sa kukuruzom. Na osnovu promena u ekspresiji šest gena za akvaporine kod dve vrste jabuke (tolerantan genotip - *Malus prunifolia* i osetljiv genotip - *Malus hupehensis*), uočena je veća ekspresija skoro svih gena u korenovima i određenih gena za akvaporine u listovima osetljivog genotipa *M. hupehensis* u poređenju sa tolerantnim. Zaključeno je da osetljiviji genotip na taj način kompenzuje veći gubitak vode u cilju bolje apsorpcije i protoka između ćelija i tkiva [48]. Kod biljaka kafe (*Coffea arabica*), povećana ekspresija *CaTIP1;2* u korenu bila je korelisana sa povećanom hidrauličnom provodljivošću korena pri umerenom vodnom deficitu [49]. U istraživanju na kultivarima pirinča pokazano je da nebalansirana ekspresija akvaporina u listovima i korenovima redukuje WUE u optimalnim i sušnim uslovima [50]. Ekspresija većine analiziranih akvaporina bila je veća u listovima, a sušom je dodatno indukovana, bez korelacije sa promenama ekspresije u korenu. Naime, nakon odsecanja korenova 3 cm od vrha, povećan je intenzitet fotosinteze kao i WUE posle 4 h ukazujući da je WUE kod pirinča limitiran neadekvatnom ekspresijom gena za akvaporine u korenu. Razlike u toleranciji prema suši između kultivisanih sorti i divljih srodnika kruške (*Pyrus sp.*) između ostalog su i posledica različite ekspresije gena za akvaporine podgrupa PIP1 i PIP2 [51].

Uloga akvaporina u odgovorima biljaka na sušu ispitivana je i kod hortikulturnih vrsta, mada su literaturni podaci jako oskudni. Pokazano je da akvaporin RhPIP2;1 kod ruže (*Rosa harvensis*) interaguje sa transkripcionim faktorom RhPTM i utiče na njegovu translokaciju pri suši, pospešujući na taj način toleranciju biljaka na ovaj stress [52]. Sa druge strane, promene u ekspresiji gena za akvaporine kod hortikultutnih vrsta su slabo proučavane. U jednom istraživanju autora Wei i sar. [53] uočeno je da je veliki broj gena za akvaporine ispoljavao transkripcione promene kao odgovor na sušu kod hortikulturne vrste *Citrus sinensis*, a mnogi od ovih gena su pokazivali i kontrastne profile ekspresije između tolerantnih i osetljivih kultivara. Posebno je značajna uloga ovih proteina kod hortikulturnih vrsta veoma osetljivih i na male nedostatke vode u podlozi, kao što je *Impatiens walleriana*. Pomenuta biljna vrsta se komercijalno uzgaja u Srbiji dugi niz godina, a njen značaj u hortikulturi se ogleda i na globalnom nivou. S obzirom da vrstu odlikuju brze fluktuacije u vodnom režimu pri suši, istraživanja u našoj laboratoriji godinama su usmerena ka razjašnjavanju fizioloških, biohemijskih i odgovora na molekularnom nivou, kao i pronalaženju načina za povećanje tolerancije biljaka prema suši [54, 55, 56, 57, 58, 59]. U tom kontekstu, akvaporini su nedvosmisleno ušli u razmatranje za analizu ekspresije njihovih gena prilikom izlaganja *I. walleriana* suši, u cilju definisanja veze između njihove ekspresije i morfo-fizioloških odgovora biljaka. Na osnovu sekvenciranog transkriptoma *I. walleriana* (RNaseq) izabrane su genske sekvence akvaporina koji pripadaju PIP i TIP podfamilijama, za čije članove je pokazano da su funkcionalni kanali za vodu kod drugih biljnih vrsta. Nakon provere funkcionalnosti prajmera za izabrane sekvence u najuži izbor ušle su tri plazma-membranske izoforme (*IwPIP1;4*, *IwPIP2;2*, *IwPIP2;7*) i jedna tonoplastna izoforma (*IwTIP4;1*). Sekvence su podvrgnute bioinformatičkim analizama da bi se najpre izvršila njihova karakterizacija, a potom i eksperimentalna provera. Na osnovu dobijenih rezultata za broj aminokiselina, molekulsku masu, izoelektričnu tačku, indeks stabilnosti i subćelijsku lokalizaciju, zaključeno je da svi analizirani akvaporini imaju tipične osobine članova MIP superfamilije [57]. Daljim analizama, definisan je broj transmembranskih regiona i stereoheimijske osobine proteina, konstruisani 3D modeli kanala za vodu pojedinačnih monomera, kao i tetramerne strukture holoproteina. Na **Slici 2** predstavljeni su rezultati analiza transmembranskih regiona *I. walleriana* akvaporina (**Slika 2 A**), kao i 3D modeli pojedinačnih monomera u membrani (**Slika 2 B**) i holoproteina (**Slika 2 C**).

Prilikom izlaganja *I. walleriana* suši i rehidraciji uočene su promene u ekspresiji gena za akvaporine [57, 60]. Suša je ispoljavala najveći uticaj na redukciju ekspresije gena *lwPIP2;7*, naročito pri umerenom intenzitetu stresa (15% sadržaja vode u supstratu), dok je pri rehidraciji ekspresija svih analiziranih gena bila indukovana (**Slika 3A**). Redukcija ekspresije gena pri suši objašnjena je kao doprinos smanjenju protoka, a samim tim i odavanju vode u atmosferu putem transpiracije, dok je sa druge strane, povišena ekspresija svih gena tokom procesa rehidracije objašnjena kao doprinos vraćanju homeostaze i boljem protoku vode kroz ćelije nakon stresnog perioda. U ovom istraživanju pokazano je da suša i rehidracija regulišu ekspresiju gena za akvaporine kod *I. walleriana* na različite načine, obezbeđujući u datom momentu najoptimalniji odgovor biljaka. U sličnom istraživanju na ovoj biljnoj vrsti, pokazano je da akvaporini mogu biti regulisani i biljnim hormonima. Naime, folijarna primena metil jasmonata (MeJA) u predtretmanu, indukovala je različit odgovor u ekspresiji gena za akvaporine *I. walleriana* tokom suše (**Slika 3B**) [59]. Folijarni predtretman MeJA vršen je sa ciljem pospešivanja odgovora i performansa biljaka prilikom izlaganja suši, a vršen je dva puta pre nastupanja stresnog perioda u razmaku od 7 dana. Uočeno je da folijarni tretman MeJA u koncentraciji od 50 μM , najviše indukuje ekspresiju *lwPIP1;4* gena pri umerenoj i intenzivnoj suši, i *lwPIP2;7* pri intenzivnoj suši, dok je ekspresija izoformi *lwPIP2;2* i *lwTIP4;1* ispoljavala ne tako izražene promene. Ovakvi rezultati ukazuju da ekspresija akvaporinskih izoformi može da bude različito regulisana pri dejstvu stresogenog faktora suše koji je prethodno modulisan dejtvom egzogeno primenjenog fitohormona MeJA.

U poslednjih deset godina, metode genetičkog inženjerstva pružile su dodatne informacije o funkciji pojedinih gena za akvaporine i omogućile dobijanje transgenih biljaka tolerantnih na sušu. Manipulacijom genima za akvaporine pokazano je da akvaporini mogu da povećavaju hidrauličnu provodljivost korena a sa druge strane da ograniče transpiraciju, težeći ka održanju homeostaze u biljnim ćelijama. Iz tog razloga, nalaze primenu u biotehnologiji odnosno genetičkom inženjerstvu za postizanje tolerancije biljaka na abiotičke stresogene faktore. Povećana ekspresija gena *PIP1;1* poreklom iz banane u *A. thaliana* je uticala na povećanu toleranciju biljaka prema suši [61]. Transgene biljke imale su veću stopu preživljavanja, razvijeniji korenov sistem i veći broj korenskih dlačica. Takođe transgena *A. thaliana* sa povećanom ekspresijom gena *FaPIP2;1* iz trave *Festuca arundinacea* ispoljavala je toleranciju na sušu, posredovanu povećanim brojem listova po biljci, relativnim sadržajem vode u listovima, intenzitetom fotosinteze i povećanom stopom preživljavanja u odnosu na netransformisane biljke [62]. Slični rezultati opisani su i u istraživanju autora Wang i sar. [63] gde je pokazano da *A. thaliana* transformisana *MzPIP2;1* genom iz hibrida jabuke (*Malus zumi*) ispoljava povećanu toleranciju prema suši. Transgeni krompir (*Solanum tuberosum*) sa povećanom konstitutivnom ekspresijom gena *StPIP1* bio je tolerantniji prema suši i imao veću efikasnost korišćenja vode, kao i sadržaj ugljenih hidrata u krtolama [64].

Zaključak

Akvaporini imaju veoma bitnu ulogu u biljnoj fiziologiji a istraživanja poslednjih decenija pružila su jasniji uvid u njihovu strukturu i funkciju. Identifikovan je veliki broj izoformi akvaporina i opisane su njihove funkcije u transportu vode i drugih molekula, kao i regulacija njihove ekspresije. Pokazano je da mnogobrojni činioci podstiču ili inhibiraju ekspresiju gena za akvaporine u biljkama, kao i da različite post-translacione modifikacije i fizički uslovi utiču na aktivnost proteina. Interakcije između spoljašnjih i unutrašnjih signala menjaju aktivnost gena za akvaporine i vode ka fiziološkom odgovoru koji biljci u datom momentu obezbeđuje maksimalnu prednost. S obzirom da većina abiotičkih stresogenih faktora, a naročito suša, vodi ka dehidraciji tkiva, velika pažnja posvećena je promenama u ekspresiji gena za akvaporine tokom izlaganja biljaka pomenutom abiotičkom stresogenom faktoru. Kod različitih biljnih vrsta primećen je različit

obrazac ekspresije gena za akvaporine pri suši u istraživanjima sprovedenim u proteklih deset godina. Najveći broj istraživanja vezan je za biljne vrste značajne u ishrani ljudi i životinja, dok skorašnja istraživanja na vrsti *I. walleriana*, osetljivoj na dejstvo suše, ukazuju i na značaj akvaporina u prilagođavanju transporta vode kod hortikulturnih biljaka.

Zahvalnica

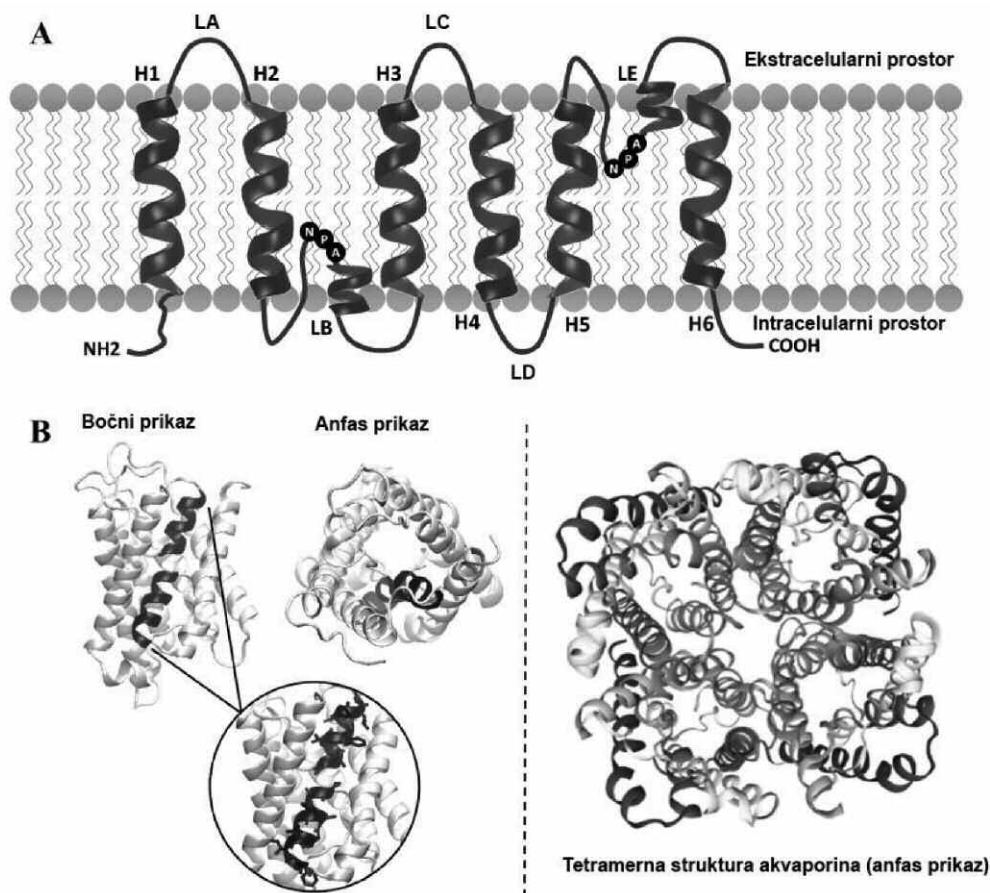
Ovaj rad je realizovan pod pokroviteljstvom Ministarstvo nauke, tehnološkog razvoja i inovacija Republike Srbije, broj ugovora: 451-03-47/2023-01/200007.

Literatura

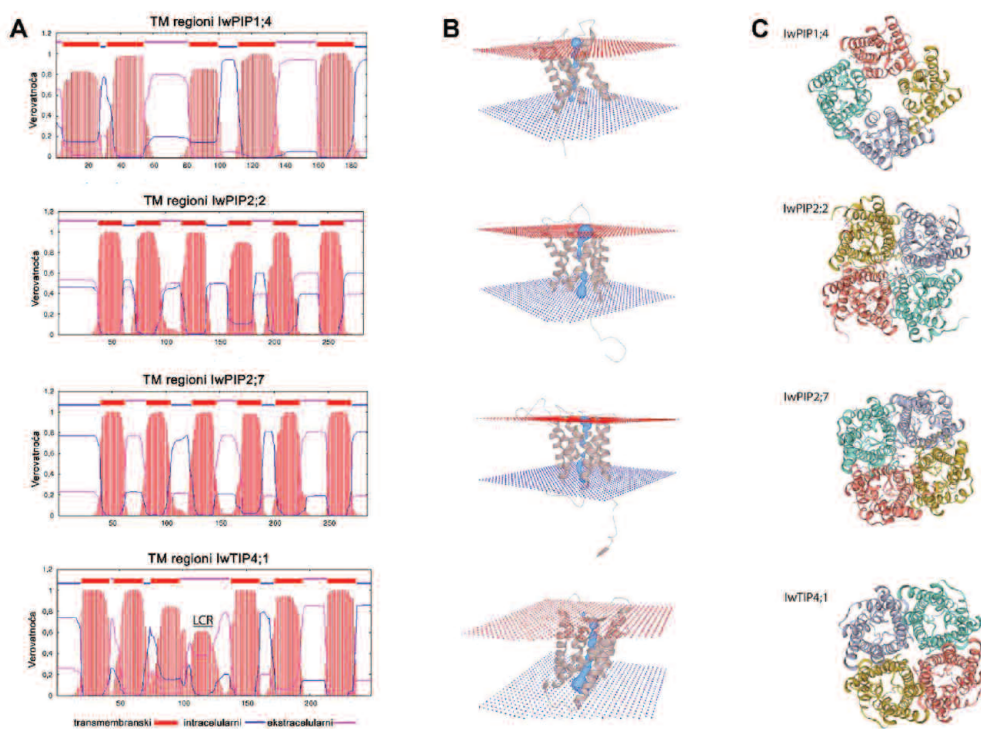
- Denker BM, Smith BL, Kuhajda FP, & Agre P. Identification, purification, and partial characterization of a novel Mr 28,000 integral membrane protein from erythrocytes and renal tubules. *Journal of Biological Chemistry* 1988; 263(30): 15634-15642.
- Fortin MG, Morrison NA, & Verma DPS. Nodulin-26, a peribacteroid membrane nodulin is expressed independently of the development of the peribacteroid compartment. *Nucleic acids research* 1987; 15(2): 813-824.
- Šurbanovski N, & Grant OM. The Emerging Role of Aquaporins in Plant Tolerance of Abiotic Stress. In *Emerging Technologies and Management of Crop Stress Tolerance*. Academic Press; 2014. pp. 431-447.
- Banerjee A, & Roychoudhury A. The role of aquaporins during plant abiotic stress responses. In *Plant Life Under Changing Environment*. Academic Press; 2020. pp. 643-661.
- Farooq M, Hussain M, Wahid A, & Siddique KHM. Drought stress in plants: an overview. *Plant responses to drought stress: From morphological to molecular features* 2012; 1-33.
- Salehi-Lisar SY, & Bakhshayeshan-Agdam H. Drought stress in plants: causes, consequences, and tolerance. *Drought Stress Tolerance in Plants. Physiology and Biochemistry*, 2016; Vol 1: 1-16.
- Yang X, Lu M, Wang Y, Wang Y, Liu Z, & Chen S. Response mechanism of plants to drought stress. *Horticulturae* 2021; 7(3): 50.
- Abascal F, Irisarri I, & Zardoya R. Diversity and evolution of membrane intrinsic proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects* 2014; 1840(5): 1468-1481.
- Bezerra-Neto JP, de Araújo FC, Ferreira-Neto JR, da Silva MD, Pandolfi V, Aburjaile F F et al. Plant aquaporins: diversity, evolution and biotechnological applications. *Current Protein and Peptide Science* 2019; 20(4): 368-395.
- Reuscher S, Akiyama M, Mori C, Aoki K, Shibata D, & Shiratake K. Genome-wide identification and expression analysis of aquaporins in tomato. *PloS one* 2013; 8(11): e79052.
- Ariani A, & Gepts P. Genome-wide identification and characterization of aquaporin gene family in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Molecular genetics and genomics* 2015; 290: 1771-1785.
- Froger A, Thomas D, Delamarche C, & Tallur B. Prediction of functional residues in water channels and related proteins. *Protein Science* 1998; 7(6): 1458-1468.
- Danielson JÅ, & Johanson U. Unexpected complexity of the aquaporin gene family in the moss *Physcomitrella patens*. *BMC Plant Biology* 2008; 8: 1-15.
- Anderberg HI, Kjellbom P, & Johanson U. Annotation of *Selaginella moellendorffii* major intrinsic proteins and the evolution of the protein family in terrestrial plants. *Frontiers in plant science* 2012; 3: 33.
- Li G, Santoni V, & Maurel C. Plant aquaporins: roles in plant physiology. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects* 2014; 1840(5): 1574-1582.
- Uehlein N, Otto B, Hanson DT, Fischer M, McDowell N, & Kaldenhoff R. Function of *Nicotiana tabacum* aquaporins as chloroplast gas pores challenges the concept of membrane CO₂ permeability. *The Plant Cell* 2008; 20(3): 648-657.
- Gomes D, Agasse A, Thiébaud P, Delrot S, Gerós H, & Chaumont F. Aquaporins are multifunctional water and solute transporters highly divergent in living organisms. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* 2009; 1788(6): 1213-1228.
- Park W, Scheffler BE, Bauer PJ, & Campbell BT. Identification of the family of aquaporin genes and their expression in upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *BMC plant biology* 2010; 10(1): 1-17.
- Fetter K, Van Wilder V, Moshelion M, & Chaumont F. Interactions between plasma membrane aquaporins modulate their water channel activity. *The Plant Cell* 2004; 16(1): 215-228.

20. Yaneff A, Vitali V, & Amodeo G. PIP1 aquaporins: Intrinsic water channels or PIP2 aquaporin modulators? *FEBS letters* 2015; 589(23): 3508-3515.
21. Kaldenhoff R, & Fischer M. Functional aquaporin diversity in plants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* 2006; 1758(8): 1134-1141.
22. Maeshima M. Tonoplast transporters: organization and function. *Annual review of plant biology* 2001; 52(1): 469-497.
23. Quigley F, Rosenberg JM, Shachar-Hill Y, & Bohnert HJ. From genome to function: the Arabidopsis aquaporins. *Genome biology* 2001; 3(1): 1-17.
24. Ishikawa F, Suga S, Uemura T, Sato MH, & Maeshima M. Novel type aquaporin SIPs are mainly localized to the ER membrane and show cell-specific expression in Arabidopsis thaliana. *FEBS letters* 2005; 579(25): 5814-5820.
25. Venkatesh J, Yu JW, & Park SW. Genome-wide analysis and expression profiling of the Solanum tuberosum aquaporins. *Plant physiology and biochemistry* 2013; 73: 392-404.
26. Johanson U, Karlsson M, Johansson I, Gustavsson S, Sjövall S, Frayse L et al. The complete set of genes encoding major intrinsic proteins in Arabidopsis provides a framework for a new nomenclature for major intrinsic proteins in plants. *Plant physiology* 2001; 126(4): 1358-1369.
27. Deshmukh RK, Vivancos J, Guérin V, Sonah H, Labbé C, Belzile F et al. Identification and functional characterization of silicon transporters in soybean using comparative genomics of major intrinsic proteins in Arabidopsis and rice. *Plant molecular biology* 2013; 83: 303-315.
28. Bienert GP, Bienert MD, Jahn TP, Boutry M, & Chaumont F. Solanaceae XIPs are plasma membrane aquaporins that facilitate the transport of many uncharged substrates. *The Plant Journal* 2011; 66(2): 306-317.
29. Maurel C, Boursiac Y, Luu DT, Santoni V, Shahzad Z, & Verdoucq L. Aquaporins in plants. *Physiological reviews* 2015; 95(4): 1321-1358.
30. Kapilan R, Vaziri M, & Zwiazek JJ. Regulation of aquaporins in plants under stress. *Biological research* 2018; 51(1): 1-11.
31. Sakurai J, Ahamed A, Murai M, Maeshima M, & Uemura M. Tissue and cell-specific localization of rice aquaporins and their water transport activities. *Plant and Cell Physiology* 2008; 49(1): 30-39.
32. Knipfer T, Besse M, Verdeil JL, & Fricke W. Aquaporin-facilitated water uptake in barley (*Hordeum vulgare* L.) roots. *Journal of Experimental Botany* 2011; 62(12): 4115-4126.
33. Singh RK, Deshmukh R, Muthamilarasan M, Rani R, & Prasad M. Versatile roles of aquaporin in physiological processes and stress tolerance in plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 2020; 149: 178-189.
34. Prado K, Boursiac Y, Tournaire-Roux C, Monneuse JM, Postaire O, Da Ines O et al. Regulation of Arabidopsis leaf hydraulics involves light-dependent phosphorylation of aquaporins in veins. *The Plant Cell* 2013; 25(3): 1029-1039.
35. Verdoucq L, Rodrigues O, Martinière A, Luu DT, & Maurel C. Plant aquaporins on the move: reversible phosphorylation, lateral motion and cycling. *Current Opinion in Plant Biology* 2014; 22: 101-107.
36. Grondin A, Rodrigues O, Verdoucq L, Merlot S, Leonhardt N, & Maurel C. Aquaporins contribute to ABA-triggered stomatal closure through OST1-mediated phosphorylation. *The Plant Cell* 2015; 27(7): 1945-1954.
37. Ahmed S, Kouser S, Asgher M, & Gandhi SG. Plant aquaporins: A frontward to make crop plants drought resistant. *Physiologia Plantarum* 2021; 172(2): 1089-1105.
38. Zhu C, Schraut D, Hartung W, & Schäffner AR. Differential responses of maize MIP genes to salt stress and ABA. *Journal of Experimental Botany* 2005; 56(421): 2971-2981.
39. Bae EK, Lee H, Lee JS, & Noh EW. Drought, salt and wounding stress induce the expression of the plasma membrane intrinsic protein 1 gene in poplar (*Populus alba* × *P. tremula* var. *glandulosa*). *Gene* 2011; 483(1-2): 43-48.
40. Sánchez-Romera Beatriz, Ruiz-Lozano JM, Li G, Luu DT, Martínez-Ballesta MDC, Carvajal, M et al. Enhancement of root hydraulic conductivity by methyl jasmonate and the role of calcium and abscisic acid in this process. *Plant, cell & environment* 2014; 37(4): 995-1008.
41. Li J, Ban L, Wen H, Wang Z, Dzyubenko N, Chapurin V et al. An aquaporin protein is associated with drought stress tolerance. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2015; 459(2): 208-213.
42. Azeem F, Bilal A, Rana MA, Muhammad AA, Habibullah N, Sabir H et al. Drought affects aquaporins gene expression in important pulse legume chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Pakistan Journal of Botany* 2019; 51(1): 81-88.
43. Hussain A, Tanveer R, Mustafa G, Farooq M, Amin I, & Mansoor S. Comparative phylogenetic analysis of aquaporins provides insight into the gene family expansion and evolution in plants and their role in drought tolerant and susceptible chickpea cultivars. *Genomics* 2020; 112(1): 263-275.

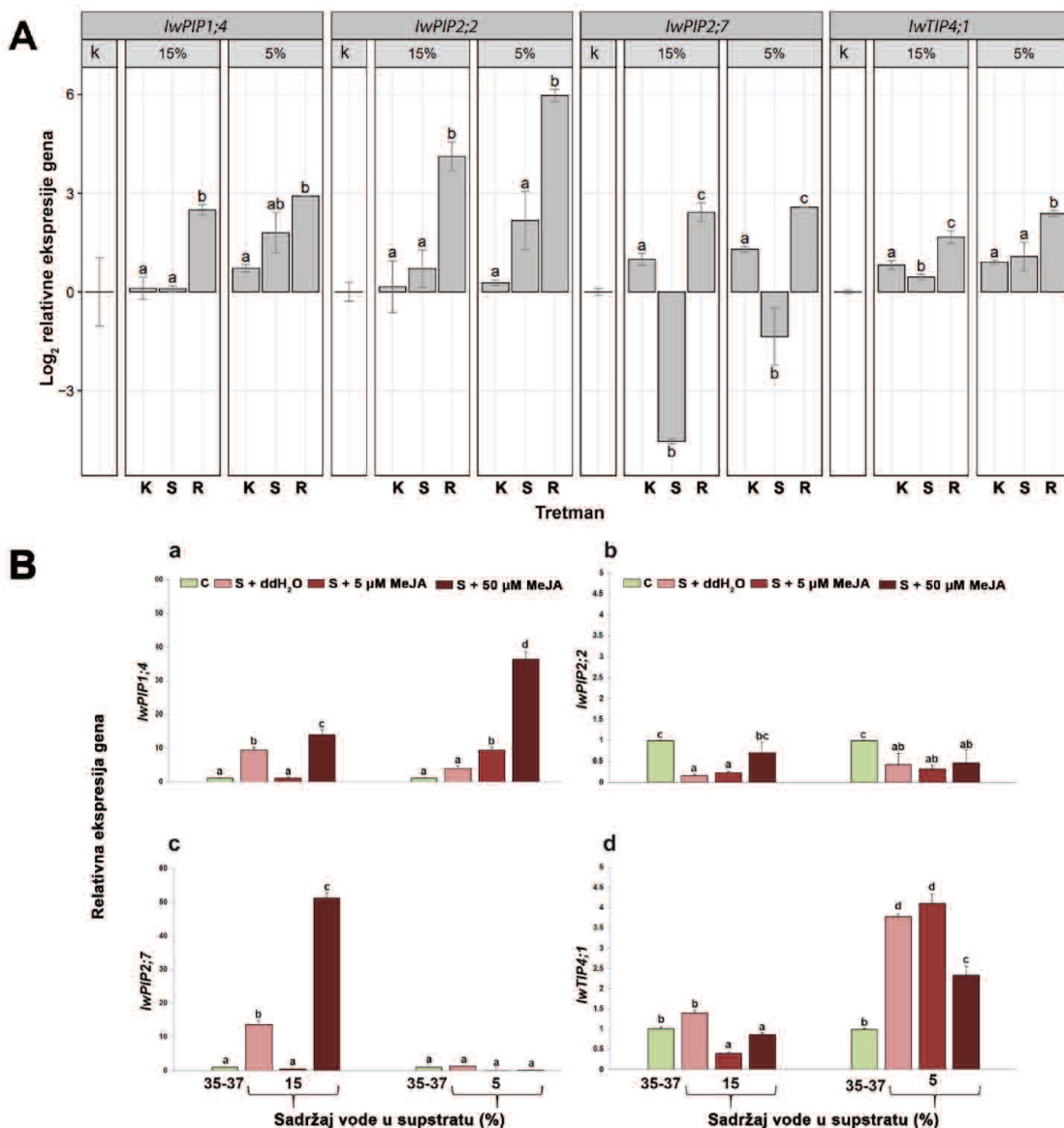
44. Šurbanovski N, Sargent DJ, Else MA, Simpson DW, Zhang H, & Grant OM. Expression of *Fragaria vesca* PIP aquaporins in response to drought stress: PIP down-regulation correlates with the decline in substrate moisture content. *PloS one* 2013; 8(9): e74945.
45. Merlaen B, De Keyser E, Ding L, Leroux O, Chaumont F, & Van Labeke MC. Physiological responses and aquaporin expression upon drought and osmotic stress in a conservative vs prodigal *Fragaria x ananassa* cultivar. *Plant Physiology and Biochemistry* 2019; 145: 95-106.
46. Grondin A, Mauleon R, Vadez V, & Henry A. Root aquaporins contribute to whole plant water fluxes under drought stress in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant, Cell & Environment* 2016; 39(2): 347-365.
47. Hasan SA, Rabei SH, Nada RM, & Abogadallah GM. Water use efficiency in the drought-stressed sorghum and maize in relation to expression of aquaporin genes. *Biologia plantarum* 2017; 61: 127-137.
48. Liu C, Li C, Liang D, Ma F, Wang S, Wang P et al. Aquaporin expression in response to water-deficit stress in two *Malus* species: relationship with physiological status and drought tolerance. *Plant Growth Regulation* 2013; 70: 187-197.
49. Miniussi M, Del Terra L, Savi T, Pallavicini A, & Nardini A. Aquaporins in *Coffea arabica* L.: identification, expression, and impacts on plant water relations and hydraulics. *Plant physiology and biochemistry* 2015; 95: 92-102.
50. Nada RM, & Abogadallah GM. Aquaporins are major determinants of water use efficiency of rice plants in the field. *Plant Science* 2014; 227: 165-180.
51. Paudel I, Gerbi H, Zisovich A, Sapir G, Ben-Dor S, Brumfeld V, & Klein T. Drought tolerance mechanisms and aquaporin expression of wild vs. cultivated pear tree species in the field. *Environmental and Experimental Botany* 2019; 167: 103832.
52. Zhang S, Feng M, Chen W, Zhou X, Lu J, Wang Y et al. In rose, transcription factor PTM balances growth and drought survival via PIP2; 1 aquaporin. *Nature Plants* 2019; 5(3): 290-299.
53. Wei Q, Ma Q, Ma Z, Zhou G, Feng F, Le S et al. Genome-wide identification and characterization of sweet orange (*Citrus sinensis*) aquaporin genes and their expression in two citrus cultivars differing in drought tolerance. *Tree Genetics & Genomes* 2019; 15: 1-13.
54. Antonić D, Milošević S, Cingel A, Lojić M, Trifunović-Momčilov M, Petrić M et al. Effects of exogenous salicylic acid on *Impatiens walleriana* L. grown in vitro under polyethylene glycol-imposed drought. *South African Journal of Botany* 2016; 105: 226-233.
55. Antonić DD, Subotić AR, Dragičević MB, Pantelić D, Milošević SM, Simonović et al. Effects of exogenous salicylic acid on drought response and characterization of dehydrins in *Impatiens walleriana*. *Plants* 2020; 9(11): 1589.
56. Đurić M, Subotić A, Prokić L, Trifunović-Momčilov M, Cingel A, Vujičić M, & Milošević S. Morpho-physiological and molecular evaluation of drought and recovery in *impatiens walleriana* grown ex vitro. *Plants* 2020; 9(11): 1559.
57. Đurić MJ, Subotić AR, Prokić LT, Trifunović-Momčilov MM, Cingel AD, Dragičević MB et al. Molecular characterization and expression of four aquaporin genes in *Impatiens walleriana* during drought stress and recovery. *Plants* 2021; 10(1): 154.
58. Đurić M, Subotić A, Trifunović-Momčilov M, & Milošević S. Improvement of water deficit stress tolerance of *Impatiens walleriana* shoots grown in vitro by methyl jasmonate. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)* 2022a; 1-15.
59. Đurić M, Subotić A, Prokić L, Trifunović-Momčilov M, & Milošević S. Alterations in Physiological, Biochemical, and Molecular Responses of *Impatiens walleriana* to Drought by Methyl Jasmonate Foliar Application. *Genes* 2023; 14(5): 1072.
60. Đurić Marija. (2022b). Uticaj dehidracije i rehidracije na fiziološki odgovor i ekspresiju gena za akvaporine i metabolizam apscisinske kiseline kod *Impatiens walleriana*. Univerzitet u Beogradu – Biološki fakultet, Beograd, 1-186. Doktorska disertacija.
61. Xu Y, Hu W, Liu J, Zhang J, Jia C, Miao H et al. A banana aquaporin gene, MaPIP1; 1, is involved in tolerance to drought and salt stresses. *BMC Plant Biology* 2014; 14: 1-14.
62. Zhuang L, Liu M, Yuan X, Yang Z, & Huang, B. Physiological effects of aquaporin in regulating drought tolerance through overexpressing of *Festuca arundinacea* aquaporin gene FaPIP2; 1. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 2015; 140(5): 404-412.
63. Wang L, Li Q, Lei Q, Feng C, Gao Y, Zheng X et al. MzPIP2; 1: an aquaporin involved in radial water movement in both water uptake and transportation, altered the drought and salt tolerance of transgenic *Arabidopsis*. *PLoS One* 2015; 10(11): e0142446.
64. Wang L, Liu Y, Feng S, Yang J, Li D, & Zhang J. Roles of plasmalemma aquaporin gene StPIP1 in enhancing drought tolerance in potato. *Frontiers in Plant Science* 2017; 8: 616.



Slika 1. Struktura akvaporina. **A)** Šematski prikaz strukture akvaporina sa 6 transmembranskih domena (H1-H6, H - *helix*) ujedinenih pomoću 5 petlji (LA-LE, L - *loops*), kao i NH₂ and COOH terminalnim krajevima u intracelularnom prostoru. Petlje LB i LE nose NPA motive koji formiraju kanale u membrani. **B)** 3D struktura pojedinačnih monomera (levo) i tetramera na osnovu kristalne strukture akvaporina SoPIP2-1 iz spanaća. Crnom bojom obeleženi su NPA motivi. Preuzeto i modifikovano prema Bezerra-Neto i sar. [9].



Slika 2. Rezultati bioinformatičkih analiza strukture akvaporina *I. walleriana*. **A)** Transmembranski regioni (TM) akvaporina IwPIP1;4, IwPIP2;2, IwPIP2;7 i IwTIP4;1; **B)** 3D izgled kanala za vodu IwPIP1;4, IwPIP2;2, IwPIP2;7 i IwTIP4;1 u membrani; **C)** 3D modeli strukture holoproteina IwPIP1;4, IwPIP2;2, IwPIP2;7 i IwTIP4;1. Preuzeto i modifikovano prema Đurić et al. [57, 60].



Slika 3. A) Uticaj suše (15 i 5% sadržaja vode u supstratu) i rehidracije na ekspresiju gena za akvaporine *I. walleriana* (*lwPIP1;4*, *lwPIP2;2*, *lwPIP2;7* i *lwTIP4;1*). K – kontrola, S – suša, R – rehidracija; Preuzeto i modificirano prema Đurić i sar. [57, 60]. **B)** Uticaj folijarne primene metil jasmonata (MeJA) u koncentracijama 5 i 50 μM na ekspresiju gena za akvaporine *I. walleriana* a) *lwPIP1;4*, b) *lwPIP2;2*, c) *lwPIP2;7* i d) *lwTIP4;1*, pri 15 i 5% sadržaja vode u supstratu; Preuzeto i modificirano prema Đurić i sar. [59].

Identifikacija gena za arabinogalaktanske proteine (AGP) biljaka korišćenjem metoda mašinskog učenja

Danijela Paunović

Institut za biološka istraživanja "Siniša Stanković" – Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerzitet u Beogradu

Kontakt: danijela.paunovic@ibiss.bg.ac.rs

Apstrakt:

Arabinogalaktanski proteini (AGP) su ekstenzivno glikozilovani proteini ćelijskog zida koje karakteriše velika raznolikost primarne strukture i širok spektar uloga tokom rastanja i razvića biljaka. Identifikacija sekvenci koje kodiraju ove proteine na osnovu homologije otežava činjenica da su to proteini sa neuređenom strukturom (engl. „*intrinsically disordered proteins*“). Da bi se poboljšao način za identifikaciju i analizu sekvenci AGP u cilju daljeg ispitivanja ekspresije ovih gena u različitim eksperimentalnim uslovima, primenjen je pristup koji koristi upravo neuređenost ovih proteina, tj. prisustvo nekarakteristične aminokiseline hidroksiprolina. Model za predviđanje verovatnoće hidroksilacije prolina na osnovu lokalne sekvence proteina inkorporiran je u *ragp* R paket uz brojne druge alate koji omogućavaju analize proteinskih sekvenci.

Ključne reči: hidroksiprolin, biljni glikoproteini bogati hidroksiprolinom, arabinogalaktanski proteini, mašinsko učenje, predviđanje posttranslacionih modifikacija proteina

Identification of *AGP* genes of plants using machine learning methods

Danijela Paunović

Institute for Biological Research „Siniša Stanković” – National Institute of the Republic of Serbia,
University of Belgrade

Correspondence: danijela.paunovic@ibiss.bg.ac.rs

Abstract:

Arabinogalactan proteins (AGPs) are extensively glycosylated cell wall proteins characterised by high diversity of primary structure and a wide array of functions in plant growth and development. AGPs are intrinsically disordered proteins, which hinders their homology-based identification. To improve the methodology for identification and analysis of hydroxyproline-rich glycoprotein (HRGP) sequences for further monitoring of AGP expression under different experimental conditions, a new approach was developed using the main feature of HRGPs, the presence of the uncharacteristic amino acid hydroxyproline. A model for predicting the hydroxylation probability of proline based on the local protein sequence has been incorporated into the R package the *ragp*, together with a number of diverse tools that allow the analysis of protein sequences

Keywords: hydroxyproline, plant hydroxyproline rich glycoproteins, arabinogalactan proteins, machine learning, prediction of posttranslational modifications

Uvod

Raznovidnost i konstantno povećanje broja podataka nastalih u savremenoj molekularnoj biologiji doveo je do potrebe za razvojem uspešnih metoda za brzu obradu podataka. Baze bioloških sekvenci rastu eksponencijalnom brzinom, a sa njima i pokušaji da se na osnovu sekvence predvide biološki značajne informacije. Proces dobijanja korisnih informacija iz velike količine sirovih podataka ili predviđanje budućih trendova korišćenjem trenutno dostupnih podataka (engl. „*data mining*“ i „*predictive analytics*“), ručnom analizom nije moguć ili je previše spor. U tu svrhu se sve više danas koriste tehnike mašinskog učenja. Termin mašinsko učenje smislio je Artur Samjuel i definisao ga kao oblast učenja koja daje kompjuterima sposobnost da uče a da nisu izričito programirani za to (1). Mašinsko učenje se definiše kao sposobnost softverskog sistema da generalizuje na osnovu prethodnog iskustva i da koristi generalizaciju kako bi pružio odgovore na pitanja koja se odnose na podatke koje pre nije sretao.

Postoji nekoliko tipova mašinskog učenja: nadgledano (engl. „*Supervised learning*“), nenadgledano (engl. „*Unsupervised learning*“), polunadgledano (engl. „*Semi-supervised learning*“) i učenje sa podrškom (engl. „*Reinforcement learning*“). Nadgledano mašinsko učenje predstavlja najčešće primenjivan tip mašinskog učenja, u kome je svakom ulaznom podatku x pridružena izlazna vrednost y , koji algoritam mašinskog učenja treba da predvidi. Cilj je da se na osnovu datih parova (x,y) pronađe optimalna funkcija koja će moći da za različite vrednosti x vrši predviđanje vrednosti y .

Kombinacija razvoja tehnika za sekvenciranje nukleinskih kiselina (NGS tehnike, (2)) i mašinskog učenja doprinela je rešavanju glavnog problema u oblasti biohemije, problema preciznog predviđanja 3D strukture proteina na osnovu sekvence (3).

U našem istraživanju, cilj je bio da se tehnikama mašinskog učenja pronađu tačna mesta posttranslacionih modifikacija kao jednog od kriterijuma za lakše identifikovanja gena za arabinogalaktanske proteine biljaka.

Arabinogalaktanski proteini

Arabinogalaktanski proteini pripadaju velikoj familiji proteina ćelijskog zida, glikoproteinima bogatim hidroksiprolinom (HRGP, engl. „*Hydroxyproline-rich glycoproteins*“). HRGP proteini predstavljaju O-glikozilovane proteine sa širokim spektrom funkcija u rastenju i razviću, odgovoru biljke na promenjene uslove sredine, signalizaciji i odbrani biljke (4-6). Proteinski deo HRGP odlikuje se različitim prolin-bogatim motivima koji su predmet hidroksilacije prolina (Pro) u hidroksiprolin (Hyp) i zatim i O-glikozilacije (7). Zavisno od tipa i stepena glikozilacije, HRGP se dele na: visoko glikozilovane arabinogalaktanske proteine (AGP), umereno glikozilovane ekstenzine (EXT) i slabo ili neglikozilovane proteine bogate prolinom (PRP) (6, 8, 9).

HRGP pripadaju proteinima sa neuređenom strukturom (engl. „*intrinsically disordered proteins*“ IDP) koju promoviše prisustvo prolina i njegove rigidne konformacije koja oneomogućava zauzimanje najčešćih sekundarnih struktura proteina, alfa-heliksa i beta ploče. Neuređenost je dodatno promovisana glikozilacijom, što znači da HRGP nemaju jedinstvenu globularnu strukturu sa hidrofobnom unutrašnošću. HRGP poseduju i motive koji usmeravaju post-translacione modifikacije (PTM) (10): N-terminalne signalne peptide koji ih usmeravaju ka sistemu endomembrana i na kraju do ćelijske membrane, a određene grupe HRGP, posebno AGP, i C-terminalno glikozil-fosfatidilinozitol sidro (GPI-sidro) koji vezuje protein za plazma membranu i dozvoljava da se ostatak glikoproteina širi prema ćelijskom zidu (11). HRGP, kao i svi IDP, imaju slabija evolutivna ograničenja u odnosu na globularne proteine, pošto njihova funkcija nije predodređena specifičnom konformacijom peptidnog lanca, odnosno tercijernom strukturom.

Među različitim grupama HRGP, AGP privlače najviše pažnje pre svega zbog strukturne raznovrsnosti i uloge u različitim fiziološkim procesima (8). Proteinski deo čini do 10% molekulske mase arabinogalaktanskih proteina i za njega su karakteristični arabinogalaktanski (AG) motivi ili glikomoduli koji se sastoje od diskontinualnih hidroksiprolina grupisanih u dipeptide sa aminokiselinama A, S, T i ređe G i V (npr: AO, SO, TO, OT, OG, OV). AG motivi su O-glikozilovani na Hyp sa razgranatim arabino-3,6-galaktanskim polisaharidima tipa II (Slika 1) (10) koji se sastoje od (1→3)-β-D- galaktana sa (1→6)-β-D- galaktanskim bočnim lancima koji su supstituisani sa arabinozom i u manjoj meri sa L-ramnozom, L-fukozom, D-manozom, D-ksilozom, D-glukozom, D-glukozaminom, D-glukuronskom i D-galakturonskom kiselinom (12).

Na osnovu primarne strukture, izvršena je podela AGP na (13):

- Klasične AGP (Slika 1F): proteinske sekvence dužine preko 100 AK, koje karakteriše prisustvo N-sp na N-terminusu, centralni region varijabilne dužine bogat Pro, Ala, Ser i Thr (PAST) AK aranžiranim u AG motive i GPI-sp (C-terminalna signalna sekvenca za dodatak glikozil-fosfatidilinozitola) na C-terminusu.
- AG peptidi (Slika 1G): kratke sekvence, po građi slične klasičnim AGP koje nakon odsecanja N-sp i GPI-sp imaju 10-15 AK.
- AGP bogati lizinom: poseduju kratak bazni region bogat Lys (14). Kod *Arabidopsis thaliana* su otkrivena dva AGP koji pripadaju ovoj grupi, AtAGP17/18 koji su lokalizovani na plazma membrani i uključeni u signalnu transdukciju.
- AGP nalik fasciklinu (FLA, engl. „*fasciclin like arabinogalactan*“): himerni AGP koji su asocirani sa jednim ili dva fasciklinska domena (FAS, PF02469) duga oko 110-150 AK. FLA se razlikuju na osnovu broja FAS domena i AGP regiona (mogu sadržati jedan ili dva) i prisustva GPI-sidra (15, 16). Pokazano je da proteini sa FLA domenima imaju adhezivnu ulogu (17, 18) i da presudnu ulogu u njihovoj funkciji imaju dva visoko konzervisana regiona od oko 10 AK označena kao H1 i H2 (18).
- AGP nalik ranom nodulinu (eNOD-AGP, engl. „*early nodulin-like AGPs*“) (19) i AGP nalik fitocijaninu (PLA, engl. „*plastocyanin-like*“): himerni AGP asocirani sa PLA domenom (PF02298) (20).
- AGP nalik proteinima za transfer nespecifičnih lipida (nsLTP-AGP, engl. „*non-specific lipid transfer protein-like AGPs*“): himerni AGP asocirani sa ns-LTP domenom (PF00234, engl. „*plant lipid transfer/seed storage/trypsin-alpha amylase inhibitor*“). ns-LTP sadrži osam Cys koji grade 4 disulfidna mosta (21). Ksilogen je primer proteina koji sadrži AG regione i nsLTP domen (22).
- Neklasični AGP: svi AGP koji se ne mogu svrstati u prethodno opisanih šest klasa. Za njih je karakteristično da najčešće nemaju signal za dodavanje GPI sidra na C-terminusu (13).

Nove grupe AGP se i dalje otkrivaju, pri čemu mnoge sekvence imaju odlike različitih klasa tako da se pre može govoriti o kontinuumu sekvenci, ne samo AGP već i ostalih HRGP klasa. Izuzetna raznovrsnost primarne strukture peptidnog lanca AGP i činjenica da su kodirani velikom familijom gena, čine ovu klasu proteina podobnim za širok spektar uloga u regulaciji procesa rastenja i razvića biljaka (11, 23-28).-Određeni GPI-AGP su asocirani sa receptor-nalik kinazama pa se smatra da imaju ulogu u prenosu signala (29). Pokazano je da su AGP uključeni u osmoregulaciju (30), u odgovor na različite tipove stresa kao što su: hladnoća (31), mehaničke povrede biljnog tkiva (32-34), interakcije sa mikrobima (35) i odgovor na infekciju biljnog tkiva (36, 37). AGP su dobar model sistem za proučavanje adaptacija ćelijskog zida na različite uslove sredine zahvaljuju i modifikacijama glikana identifikovanim u različitim tkivima koje menjaju funkciju AGP (38). Asocijacija sa konzerviranim domenima omogućava različitim klasama AGP još širi spektar funkcija. Tako je pokazano je da arabinogalaktanski proteini nalik fasciklinu (FLA) imaju uticaj na organizaciju polisaharida

ćelijskog zida kao što su celuloza i pektin što utiče na svojstva ćelijskog zida i na rast biljaka (39). AGP imaju uticaja i na somatsku embriogenezu i organogenezu izdanaka različitih biljnih vrsta (40-42).

Pristupi identifikaciji HRGP sekvenci

S obzirom na raznolikost fizioloških i strukturnih uloga u koje su HRGP uključeni i njihovu prisutnost u svim biljkama, potraga za sekvencama HRGP u biljnim genomima i transkriptomima je značajan cilj biljne glikobiologije. Visoka stopa mutacija i velika repetitivnost njihovih proteinskih sekvenci oneomogućavaju njihovo pronalaženje na osnovu homologije (7). Sa druge strane HRGP sekvence imaju visok sadržaj pojedinih AK i odlikuje ih prisustvo specifičnih kratkih aminokiselinskih motiva (glikomotiva) koji mogu poslužiti kao kriterijum za njihovu identifikaciju. Pretraga HRGP sekvenci se zbog ovoga bazira na kombinaciji ključnih odlika ovih proteina:

- Prisustvo N-terminalnog signalnog peptida kao zajednička odlika svih HRGP pošto su to molekuli lokalizovani u ćelijskom zidu.
- Aminokiselinski sastav: zastupljenije su AK koje ulaze u sastav motiva za glikozilaciju. Klasični AGP su bogati sa P, A, S i T, pa se u literaturi one sekvence koje sadrže više od 50% PAST AK identifikuju kao klasični AGP, dok se AG peptidima smatraju kratke sekvence sa više od 35% PAST (9, 43). PRP se smatraju sekvence sa više od 45% PVKCYT (9) ili PVKY, a EXT se smatraju sekvence sa više od 45% PSKY (7).
- Prisustvo GPI-sp, hidrofobnog C-terminalnog peptida koji je signal dodavanja GPI je odlika mnogih, ali ne svih AGP i AG peptida (8, 9, 44).
- Karakteristični motivi: SO_3-5 motivi karakteristični za EXT sekvence (7, 9), AG motivi karakteristični za AGP sekvence (45) i motivi kao što su PPVX[KT] i KKPCPP koji služe za identifikaciju PRP sekvenci (9).
- Pretraga na osnovu homologije se može primeniti za himerne HRGP koji sadrže konzervirane domene, pri čemu, sem za AG peptide, nisu pronađeni konzervirani domeni karakteristični isključivo za HRGP. Domeni prisutni kod HRGP, kao što su fasciklinski (PF02469), proteini za transfer lipida (*ns-LTP like*, engl. „non-specific lipid-transfer proteins“, PF00234), plastocijanin (PF02298) i nekoliko drugih, su korisni za identifikaciju himernih HRGP sekvenci zasnovanu na homologiji.

Do sada je u literaturi opisano nekoliko različitih načina filtriranja HRGP sekvenci koje se baziraju na kombinaciji navedenih osobina. Jedan od prvih programa za identifikaciju HRGP bio je *BIO OHIO* (9) koji je kombinovao predviđanje prisustva N-sp i GPI sa analizom zastupljenosti pojedinih AK i domena karakterističnih za AGP. MAAB (engl. „the motif and amino acid bias“) metoda razvijena je od strane Johnson *et al.* (7) ne samo za pronalaženje ve i klasifikaciju HRGP u deskriptivne podklase. Ova klasifikacija je rezultat saznanja da postoji veliki broj hibridnih HRGP sekvenci koji nije korektno obuhvaćen inicijalnom podelom HRGP na tri klase (EXT, PRP i AGP) pošto sadrže odlike dve ili čak sve tri klase (7). MAAB klasifikacija se bazira na predviđanju N-sp nakon čega sledi određivanje sadržaja karakterističnih AK, brojanje karakterističnih motiva i predviđanje prisustva GPI-sp. Pored prethodne dve metode koje su korisne za identifikaciju i klasifikaciju „prototipskih“ HRGP sa visokim sadržajem karakterističnih AK, razvijena je i metoda *Finding AGP* (45) kojom je omogućena i identifikacija AGP sekvenci sa niskim sadržajem karakterističnih AK i motiva. Ova metoda se zasniva na kombinaciji ukupnog i parcijalnog aminokiselinskog sastava u delu sekvence proteina sa najvećom učestalošću karakterističnih AK, dužini proteina, kao i prisustvu i razdaljini AG glikomotiva.

Nedostatak opisanih metoda se ogleda ili u nemogućnosti identifikacije HRGP sekvenci sa niskim sadržajem HRGP karakterističnih AK i malom zastupljenošću HRGP motiva, naročito ukoliko ne sadrže domene

za koje se zna da su asocirani sa HRGP, ili u visokoj frekvenciji potencijalno lažno identifikovanih sekvenci kod metoda koje kao kriterijum za identifikaciju koriste mali broj HRGP karakterističnih motiva.

Među HRGP sekvencama, AGP su najkomplikovaniji za identifikaciju pošto nemaju dobro definisane motive - nije poznato koliko AG motiva je neophodno i koliki razmak između njih je dozvoljen da bi motiv bio hidroksilovan, kao preduslov za glikozilaciju. Pronalaženje takvih sekvenci bi bilo jednostavno da su pozicije Hyp poznate unapred, što je nemoguće zbog cene i truda potrebnog za eksperimentalnu identifikaciju posttranslacionih modifikacija (PTM) proteina. Potencijalno rešenje je da se postojeća znanja o pozicijama Hyp u proteinskim sekvencama iskoriste za pronalaženje novih HRGP sekvenci u proteomima različitih biljnih vrsta metodama mašinskog učenja.

Upotreba mašinskog učenja za predviđanja na osnovu proteinske sekvence sa akcentom na predviđanje hidroksilacije prolina

Predviđanje mesta PTM u proteinima na osnovu sekvence je jedan od glavnih izazova u biohemiji. Za predviđanje PTM značajna je sekvenca motiva oko AK koja se modifikuje (46), a ukoliko se radi o modifikacijama na proteinima u nativnoj konformaciji, od značaja je dostupnost AK koja se modifikuje i interakcije peptidnog motiva oko nje sa udaljenim delovima sekvence koje zajedno čine lokalnu 3D strukturu (47, 48). Nasuprot eksponencijalnom rastu broja bioloških sekvenci u različitim bazama, broj proteina sa eksperimentalno anotiranim PTM beleži značajno manji rast tokom vremena kao posledica visoke cene metoda koje služe za eksperimentalno utvrđivanje PTM.

Ako se predviđanje pozicija PTM postavi kao supervizovan problem mašinskog učenja (MU), što je u najvećem broju dosadašnjih pokušaja odnosno publikacija i slučaj, za uspešno treniranje modela neophodne su proteinske sekvence za koje se nedvosmisleno zna koje AK su modifikovane sa određenom PTM, a koje ne. Prema tome glavna prepreka za ovakav tip zadatka je mala dostupnost obeleženih podataka koji se mogu koristiti za treniranje i evaluaciju modela MU. Predviđanje PTM na osnovu sekvence je dodatno zakomplikovano činjenicom da su proteinske sekvence sa eksperimentalno određenim PTM uglavnom animalnog porekla. U budućnosti se može očekivati porast dostupnih podataka za treniranje kao i razvoj pristupa MU koji postižu jako dobre performanse i kada su trenirani sa malim skupovima obeleženih podataka.

Kada se razmatra predviđanje pozicija hidroksilacije prolina korišćenjem MU u dosadašnjoj literaturi, može se zapaziti da postoji relativno mali broj publikacija. Pre svega zbog relativno malog značaja ove PTM u odnosu na druge u humanoj biohemiji i fiziologiji. Ova PTM se javlja pre svega u strukturnim proteinima, najviše u kolagenu i potrebna je za njegovo pravilno funkcionisanje jer povećava stabilnost trostrukog heliksa kolagena (49). Poznato je da do hidroksilacije prolina u kolagenu dolazi u motivima XPG te za daljim predviđanjem korišćenjem MU nema potrebe. Postoji nekoliko dostupnih servera za predviđanje pozicije hidroksiprolina u proteinima: *iHyd-PseAAC* (50, 51); *PredHydroxy* (52); *RF-Hydroxysite* (53); *iHyd-PseCp* (54).

Sve pomenute metode su kao ulaz koristile proteinske sekvence iz različitih carstava organizama (životinjske i biljne), pri čemu su dominantno zastupljene životinjske sekvence. Takođe ni jedna od metoda nema kao ulazni atribut da li je sekvenca poreklom iz biljke, životinje ili eventualno bakterije, pa samim tim pokazuju ograničen uspeh u predviđanju hidroksilacije prolina u biljnim proteinima.

Identifikacija i analiza HRGP korišćenjem znanja o Hyp

Do sada su sekvence HRGP identifikovane na osnovu aminokiselinskog sastava i prisustva karakterističnih motiva (7, 9, 45). Međutim, postoji i veliki broj himernih proteina koje je teže identifikovati na osnovu

datih osobina a koji sadrže i dodatne specifične motive. Sekvence koje sadrže domene za koje je poznato da asociraju sa HRGP regionima je moguće identifikovati na osnovu homologije (9, 44), ali na ovaj način nije moguće identifikovati domene za koje je do sada nepoznato da asociraju sa HRGP regionima.

Sa ciljem poboljšanja metodologije za identifikaciju i analizu HRGP sekvenci osmišljen je novi pristup baziran na mašinskom učenju. Pomenuti pristup bazira se na jednoj od osnovnih odlika HRGP, a to je prisustvo hidroksiprolina. Identifikacija verovatnih hidroksiprolina u sekvencama biljnih proteina se postiže korišćenjem modela MU koji je treniran da predviđa verovatnoću hidroksilacije prolina na osnovu lokalne sekvence (55).

Novi pristup identifikaciji ovih sekvenci koji inkorporira mašinsko učenje ima za cilj povećanje specifičnosti identifikovanih sekvenci (da se smanji udeo lažno identifikovanih HRGP sekvenci) a da se istovremeno identifikuju skoro sve sekvence koje jesu HRGP. Model mašinskog učenja koji služi za predviđanje verovatnoće hidroksilacije prolina predstavlja glavnu inovaciju pristupu filtriranja HRGP-a koja će biti detaljnije objašnjena na primeru filtriranja AGP sekvenci.

Predviđanje pozicija hidroksiprolina u proteinskim sekvencama biljaka

Da bi se algoritam MU obučio da predviđa verovatnoću hidroksilacije prolina u biljnim proteinima korišćeni su podaci o eksperimentalno potvrđenim hidroksiprolinima u biljnim proteinima iz UniProtKB/Swiss-Prot baze podataka (The UniProt Consortium, 2019). Preuzete su sekvence biljnih proteina koje su detaljno proverene i upoređene sa UniProtKB/Swiss-Prot anotacijama i literaturnim podacima o sekvenciranju, kako bi se koristili samo oni prolina/hidroksiprolina u sekvencama za koje se na osnovu dostupne literature može sa sigurnošću utvrditi hidroksilacioni status prolina.

Da bi se algoritam mašinskog učenja trenirao da predviđa hidroksilaciju prolina na osnovu lokalnog konteksta sekvence, potrebno je na neki način prevesti proteinske sekvence u numerički oblik koji će oslikavati sekvence, a sa kojima će algoritam moći da radi. U literaturi je opisano puno načina da se ovo postigne: od proste zamene AK sa numeričkim vrednostima koje odgovaraju određenim fizičko-hemijskim osobinama, zatim različite transformacije koje na neki način oslikavaju pravilnost promene fizičko-hemijskih osobina kroz proteinsku sekvencu, kao što su autokorelacioni deskriptori i drugi. Pošto nije moguće unapred pretpostaviti koje je bolje rešenje za zadatak predviđanja verovatnoće hidroksilacije prolina, korišćeno je 16 različitih načina transformacije proteinskih sekvenci u numerički oblik što je rezultovalo sa 16 različitih grupa atributa koji su zajedno imali 1294 jedinstvenih atributa.

Mnogi od ovih atributa su međusobno korelisani, ili pak ne nose nikakvu upotrebljivu informaciju o hidroksilaciji prolina i samim tim ometaju pronalaženje modela sa maksimalnim performansama. Zbog toga je isprobano nekoliko metoda za odabir atributa, dve filter metode: udeo dobijene informacije (IGr, engl. „*Information gain ratio*“) (56) i minimalna suvišnost maksimalna značajnost (mRMR, engl. „*Minimum Redundancy Maximum Relevance*“) (57, 58) i jedna metoda bazirana na omotač algoritima za odabir atributa (engl. „*wrapper*“) sekvencionu pretragu unapred (sfs, engl. „*sequential forward selection*“) (59). Tokom odabira modela evaluirana su četiri algoritma MU: k najbližih suseda (KNN, engl. „*k-nearest neighbors*“) (60), metod potpornih vektora (SVM, engl. „*support vector machine*“) (61), algoritam *random forests* (RF) (62) i algoritam XGBoost (XGB, engl. „*extreme gradient boosting*“) (63), od kojih su SVM i RF već korišćeni za modele koji predviđaju Hyp na osnovu lokalne sekvence (52-54).

Sve poređene metode za odabir atributa, rezultirale su u malom povećanju performansi modela u poređenju sa modelima bez selekcije atributa, osim za SVM koji je pokazao jako slabe performanse u slučaju

bez odabira atributa ili uz mRMR filter algoritam (55). Prema tome, za treniranje modela koji je inkorporiran u *ragp* R paket izabran je XGB algoritam zajedno sa sfs metodom za odabir atributa kroz 16 grupa atributa jer je pokazao najbolje performanse (55).

Ragp R programski paket za identifikaciju i analizu HRGP sekvenci

Model za predviđanje hidroksilacije prolina na osnovu lokalne sekvence je inkorporiran u R funkciju *predict_hyp* u R paketu *ragp* koji je dostupan pod MIT (engl. „Massachusetts Institute of Technology”) licencom na *github* platformi na adresi <https://github.com/missuse/ragp>. Uputstva za postupak rada sa paketom se nalaze na <https://missuse.github.io/ragp>, a web server za predviđanje hidroksilacije prolina na osnovu lokalne sekvence se nalazi na adresi <https://ragp.shinyapps.io/Rapp>. Osim modela za predviđanje Pro hidroksilacije u paket su inkorporirane funkcije za efikasnu komunikaciju sa Internet serverima za detekciju domena, predviđanje N-sp, GPI i neuređenih regiona u proteinima kao i funkcije za detekciju i analizu AG karakterističnih motiva. Sve funkcije paketa su dokumentovane na adresi <https://missuse.github.io/ragp/reference/index.html>.

Identifikacija i analiza HRGP sekvenci se u okviru *ragp* paketa vrši kroz dva sloja analize (Slika 3):

- Sloj za filtriranje sekvenci služi za identifikaciju proteina koji imaju N-sp komunikacijom sa serverima za predviđanje N-sp. Potom se iz skupa sekvenci za koje je predviđeno da sadrže N-sp filtriraju proteini koji sadrže nekoliko predviđenih Hyp korišćenjem implementiranih modela MU.
- Sloj za analizu u kome se filtrirane sekvence analiziraju na prisustvo AG motiva, klasifikuju u MAAB klase (7), identifikuju se domeni (64, 65), transmembranski regioni (66), potencijalna mesta za vezivanje GPI-sidra (67-69) i neuređeni regioni proteina (70) komunikacijom sa web serverima. Svi serveri su birani tako da omogućavaju visoku propusnost analiza kako bi *ragp* paket bio upotrebljiv za anotaciju celih proteoma.

Predviđanje prisustva N-sp u *ragp* paketu postignuto je efikasnom komunikacijom sa Internet serverima: *TargetP* (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>) (71), *SignalP4.1* (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-4.1/>) (72), *Phobius* (<http://phobius.sbc.su.se/>) (66) i *SignalP5*(73) korišćenjem funkcija *get_targetp*, *get_signalp* i *get_phobius*. Predviđanje transmembranskih regiona (TM) omogućeno je korišćenjem *Phobius* servera. Predviđanje pozicija GPI sidra (omega mesta) postignuto je komunikacijom sa Internet serverima *big Pi plant predictor* (67), *PredGPI* (68) i *NetGPI* (69) korišćenjem funkcija *get_big_pi*, *get_pred_gpi* i *get_netGPI*. Navedene funkcije koriste R pakete *httr* (Wickham i sar., 2018a) i *xml2* (Wickham i sar., 2018b) za komunikaciju sa odgovarajućim serverima.

Anotacija domena u *ragp* paketu postignuta je korišćenjem funkcije *get_hmm* koja komunicira sa *hmmscan* Internet serverom (64) (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/hmmer/search/hmmscan>) i *pfam2go* koja preslikava *Pfam* anotacije u GO (engl. „gene ontology”) korišćenjem <http://geneontology.org/external2go/pfam2gomapping>. Osim toga omogućena je i anotacija pomoću baze konzerviranih domena (CDD, engl. „conserved domain database”, (65)<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/bwrpsb/bwrpsb.cgi>) preko funkcije *get_cdd*. Za predviđanje neuređenih delova proteina *ragp* sadrži funkciju *get_espritz* koja komunicira sa *Espritz* serverom (70). Ove funkcije takođe koriste *httr* i *xml2* R pakete.

Analiza motiva karakterističnih za HRGP u proteinskim sekvencama je u *ragp* paketu postignuta kroz dve funkcije *maab* i *scan_ag*. U okviru funkcije *maab* inkorporirana je MAAB klasifikaciona šema (7) koja klasifikuje HRGP sekvence u 23 deskriptivne klase. Funkcija *scan_ag* služi za detekciju lokalizovanih klastera AG motiva korišćenjem regularnih izraza. Korisnik unosi minimalan broj motiva koji su potrebni i maksimalno

dozvoljeno rastojanje među njima, a funkcija konstruiše regularni izraz kojim obavlja detekciju u datim sekvencama. Ova funkcija može da uvrsti znanje o pozicijama Hyp u sekvencama korišćenjem rezultata *predict_hyp* funkcije, kao i da maskira određene tipove nepoželjnih motiva kao što su ekstenzinski.

Kombinacija navedenih alata predstavlja novu metodologiju za filtriranje i analizu HRGP sekvenci, prvenstveno namenjenju za identifikaciju i analizu AGP sekvenci iz biljnih proteoma. *Ragp* paket je jednostavan za upotrebu; funkcije paketa imaju konzistentan unos i prihvataju širok spektar ulaznih objekata (od bazičnih struktura podataka u R do .FASTA fajlova). Podrazumevane vrednosti za dodatne argumente funkcija su pažljivo odabrane i u većini slučajeva se mogu ostaviti kako su i zadate. Izlazne vrednosti funkcija su takođe bazične R strukture kojima se lako može manipulirati korišćenjem različitih R paketa sa specijalizovanim namenama.

Anotacija HRGP sekvenci iz 62 biljna proteoma

Ragp paket je primenjen na proteinske sekvence iz 62 biljna proteoma kako bi se stekao utisak o varijabilnosti identifikovanih HRGP sekvenci u biljnom svetu i sa ciljem testiranja sposobnosti paketa. Filtriranjem sekvenci na osnovu predviđanja Hyp i njihovom MAAB klasifikacijom iz 62 biljna proteoma identifikovano je 99,29% prototipskih HRGP sekvenci u poređenju sa MAAB klasifikacijom bez predviđanja Hyp, pri čemu su pronađene sve prototipske sekvence HRGP u 51 od 62 analizirana biljna proteoma (55). Identifikovan je priličan broj potencijalnih himernih AGP sekvenci: oko 30000 (u proseku oko 500 po proteomu) sa različitim domenima, što ukazuje da prisustvo Hyp u AG motivima nije limitirano na par tipova proteina sa specifičnim domenima, već da ih ima znatno više.

Interesantno je da mali broj publikacija dovodi u vezu protein kinazni/protein tirozin kinazni (PK/PTK) domen sa AGP regionima (38, 45, 74), naročito pošto je on najfrekventnije identifikovan domen u himernim AGP, prema analizi urađenoj ovde. Na osnovu prikazane strukture himernih AGP – receptor kinaza *Arabidopsis thaliana* (Slika 4), može se zaključiti da glikozilovani ekstracelularni regioni ovih proteina verovatno služe za prijem signala u ćelijskom zidu koji se onda šalju dalje u ćeliju posredstvom kinaznog domena. Ovo je u saglasnosti sa predloženom ulogom himernih AGP kao ekstracelularnih senzora (75). Na osnovu iznetih rezultata se čini da AGP ne samo da interaguju sa ekstracelularnim regionima receptor kinaza kao što je pretpostavljeno (75), već mogu da budu i sastavni deo ovih proteina.

Veličina i raznolikost HRGP superfamilije proteina *Centaurium erythraea* (kičice)

Poslednjih godina razvijeno je nekoliko pristupa identifikacije potencijalnih HRGP, naročito AGP sekvenci, u pokušaju da se prevaziđu ograničenja klasičnih pristupa. MAAB sistem klasifikacije razvijen je da bi se prikazalo postojanje kontinuuma HRGP sekvenci sa zajedničkim karakteristikama EXT, AGP i PRP (7). Sa druge strane, *ragp* paket je pre svega napravljen za identifikaciju AGP sekvenci sa malom zastupljenošću AG motiva kombinacijom algoritama MU za predviđanje Hyp sa fleksibilnom detekcijom AG motiva koji sadrže predviđen Hyp. Oba pristupa iskorišćena su za identifikaciju HRGP kičice.

Korišćenjem modifikovane MAAB klasifikacije, inkorporirane u *ragp* paket, na predviđenim proteinskim sekvencama *de novo* sastavljenog transkriptoma *C. erythraea* ((76) <https://zenodo.org/record/3591805>) 126 transkripata (134 proteinske sekvence) je klasifikovano u MAAB HRGP klase 1-23, dok je preostalih 87 transkripata (kojima odgovara isti broj proteina) klasifikovano kao MAAB klasa 24 (77).

Namena *ragp* paketa, pored pronalaženja predstavnika prototipskih HRGP preko MAAB klasifikacije, je identifikacija sekvenci koje sadrže kratke regione nalik AGP. Ostali frekventno pronađeni domeni u se-

kvenicama kičice, identifikovani kao AGP, su već povezani sa AGP na osnovu bioinformatičkih (9, 45, 55) ili eksperimentalnih dokaza (15, 78).

Neke od identifikovanih sekvenci AGP *Centaurea erythraea* su šematski prikazani na Slici 5 pomoću *plot_prot* funkcije *ragp* paketa. Prikazane su sekvence AGP sa protein kinaznim domenima, FLA domenima i AG peptidi, sa označenim domenima, transmembranskim regionima, intra i ekstracelularnim regionima. Navedene sekvence su filtrirane iz *de novo* transkriptoma kičice korišćenjem *ragp* R paketa da bi se dalje ispitala njihova ekspresija u različitim eksperimentalnim uslovima (77).

Zaključak

Trenirani modeli mašinskog učenja za previđanje verovatnoće hidroksilacije prolina predstavljaju centralni deo nove metodologije za identifikaciju i analizu HRGP i AGP sekvenci inkorporirane u R paket *ragp* koji je dostupan za korišćenje svima sa osnovnim znanjem R programskog jezika.

Razvijena metodologija je primenjena za identifikaciju HRGP i AGP sekvenci u velikom broju biljnih proteoma uključujući i proteom kičice. Identifikovan je veliki broj i heterogenost himernih AGP sekvenci, što potencijalno znači da O-glikozilacija na Hyp kod biljaka nije ograničena na manji skup prototipskih sekvenci. Identifikovani HRGP geni predstavljaju preduslov i resurs za buduća istraživanja uloga članova ove proteoglikanske familije. Najveći napredak u generalizaciji modela može se očekivati ako se više sekvenci, sa većom raznolikošću, iz različitih biljnih vrsta koriste za treniranje. Kako se bude povećavao broj biljnih sekvenci sa eksperimentalno određenim pozicijama Hyp, povećavaće se i moć generalizacije modela napravljenih na osnovu njih.

Zahvalnica

Ovaj rad je finansiran od strane Ministarstva nauke, tehnološkog razvoja i inovacija Republike Srbije, ugovor broj 451-03-47/2023-01/ 200007.

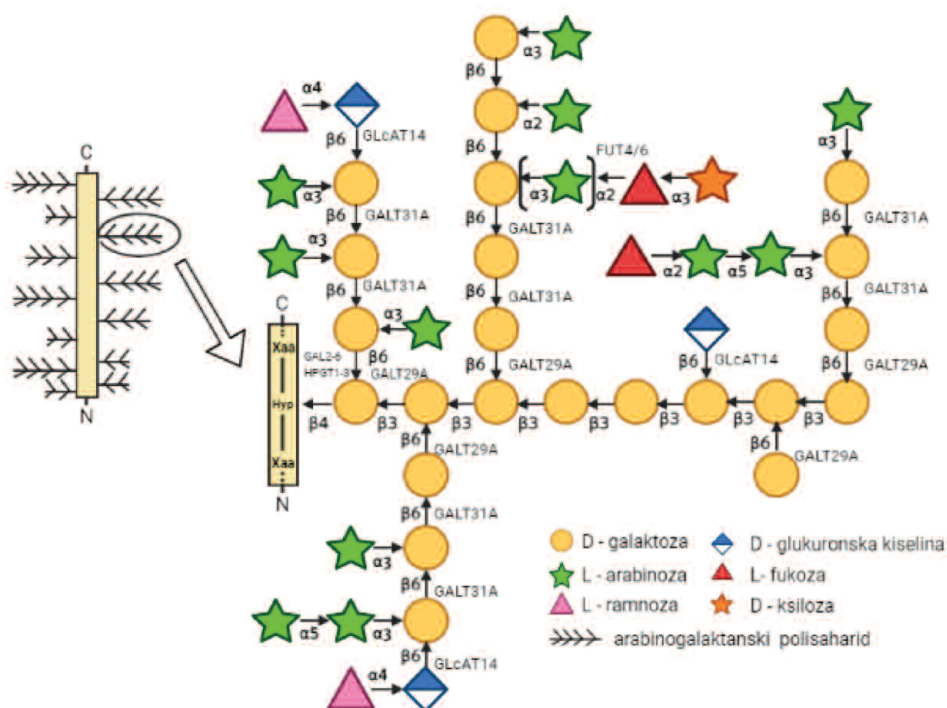
Literatura

1. Samuel AL. Some Studies in Machine Learning Using the Game of Checkers. IBM J Res Dev. 1959;3:210-29.
2. Goodwin S, McPherson JD, McCombie WR. Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. Nature Reviews Genetics. 2016;17(6):333-51.
3. Jumper J, Evans R, Pritzel A, Green T, Figurnov M, Ronneberger O, et al. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. Nature. 2021;596(7873):583-9.
4. Deepak S, Shailasree S, Kini RK, Muck A, Mithöfer A, Shetty SH. Hydroxyproline-rich Glycoproteins and Plant Defence. Journal of Phytopathology. 2010;158(9):585-93.
5. Kieliszewski M, Lamport D, Tan L, Cannon M. Hydroxyproline-Rich Glycoproteins: Form and Function. Annual Plant Reviews. 2011;41:319-40.
6. Hijazi M, Velasquez SM, Jamet E, Estevez JM, Albenne C. An update on post-translational modifications of hydroxyproline-rich glycoproteins: toward a model highlighting their contribution to plant cell wall architecture. Frontiers in Plant Science. 2014;5.
7. Johnson KL, Cassin AM, Lonsdale A, Bacic A, Doblin MS, Schultz CJ. Pipeline to Identify Hydroxyproline-Rich Glycoproteins Plant Physiology. 2017;174(2):886-903.
8. Ellis M, Egelund J, Schultz CJ, Bacic A. Arabinogalactan-proteins: key regulators at the cell surface? Plant Physiol. 2010;153(2):403-19.
9. Showalter AM, Keppler B, Lichtenberg J, Gu D, Welch LR. A Bioinformatics Approach to the Identification, Classification, and Analysis of Hydroxyproline-Rich Glycoproteins Plant Physiology. 2010;153(2):485-513.

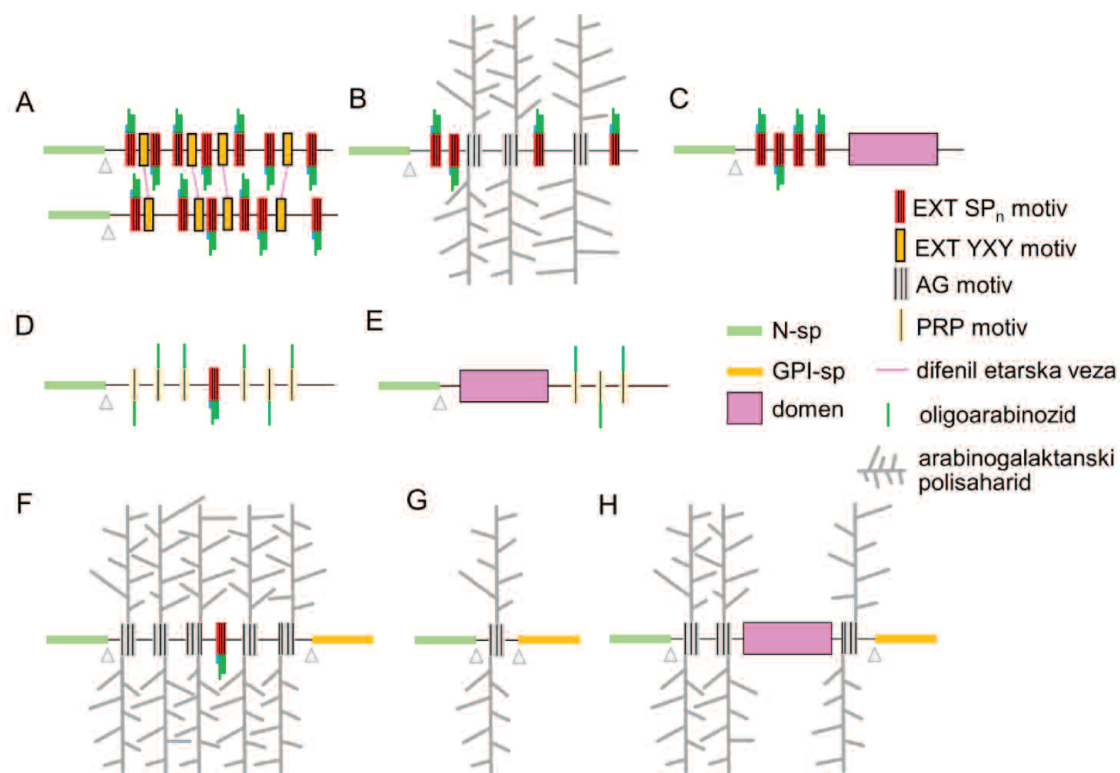
10. Johnson KL, Cassin AM, Lonsdale A, Bacic A, Doblin MS, Schultz CJ. Pipeline to Identify Hydroxyproline-Rich Glycoproteins. *Plant Physiol.* 2017;174(2):886-903.
11. Seifert GJ, Roberts K. The biology of arabinogalactan proteins. *Annu Rev Plant Biol.* 2007;58:137-61.
12. Showalter AM. Arabinogalactan-proteins: structure, expression and function. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS.* 2001;58(10):1399-417.
13. Gaspar Y, Johnson KL, McKenna JA, Bacic A, Schultz CJ. The complex structures of arabinogalactan-proteins and the journey towards understanding function. *Plant Molecular Biology.* 2001;47(1):161-76.
14. Zhang Y, Yang J, Showalter AM. AtAGP18, a lysine-rich arabinogalactan protein in *Arabidopsis thaliana*, functions in plant growth and development as a putative co-receptor for signal transduction. *Plant Signal Behav.* 2011;6(6):855-7.
15. Johnson KL, Jones BJ, Bacic A, Schultz CJ. The Fasciclin-Like Arabinogalactan Proteins of *Arabidopsis*. A Multigene Family of Putative Cell Adhesion Molecules. *Plant Physiology.* 2003;133(4):1911-25.
16. Ma H, Zhao J. Genome-wide identification, classification, and expression analysis of the arabinogalactan protein gene family in rice (*Oryza sativa* L.). *J Exp Bot.* 2010;61(10):2647-68.
17. Kim JE, Kim SJ, Lee BH, Park RW, Kim KS, Kim IS. Identification of motifs for cell adhesion within the repeated domains of transforming growth factor-beta-induced gene, betaig-h3. *J Biol Chem.* 2000;275(40):30907-15.
18. Kawamoto T, Noshiro M, Shen M, Nakamasu K, Hashimoto K, Kawashima-Ohya Y, et al. Structural and phylogenetic analyses of RGD-CAP/beta ig-h3, a fasciclin-like adhesion protein expressed in chick chondrocytes. *Biochim Biophys Acta.* 1998;1395(3):288-92.
19. Mashiguchi K, Asami T, Suzuki Y. Genome-Wide Identification, Structure and Expression Studies, and Mutant Collection of 22 Early Nodulin-Like Protein Genes in *Arabidopsis*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry.* 2009;73(11):2452-9.
20. Ma H, Zhao H, Liu Z, Zhao J. The phytocyanin gene family in rice (*Oryza sativa* L.): genome-wide identification, classification and transcriptional analysis. *PLoS One.* 2011;6(10):e25184.
21. Motose H, Sugiyama M, Fukuda H. A proteoglycan mediates inductive interaction during plant vascular development. *Nature.* 2004;429(6994):873-8.
22. Kobayashi Y, Motose H, Iwamoto K, Fukuda H. Expression and Genome-Wide Analysis of the Xylogen-Type Gene Family. *Plant and Cell Physiology.* 2011;52(6):1095-106.
23. Gao M, Showalter AM. Yariv reagent treatment induces programmed cell death in *Arabidopsis* cell cultures and implicates arabinogalactan protein involvement. *Plant J.* 1999;19(3):321-31.
24. Serpe MD, Nothnagel EA. Effects of Yariv phenylglycosides on *Rosa* cell suspensions: Evidence for the involvement of arabinogalactan-proteins in cell proliferation. *Planta.* 1994;193(4):542-50.
25. Majewska-Sawka A, Nothnagel EA. The Multiple Roles of Arabinogalactan Proteins in Plant Development1. *Plant Physiology.* 2000;122(1):3-10.
26. Pereira AM, Pereira LG, Coimbra S. Arabinogalactan proteins: rising attention from plant biologists. *Plant Reprod.* 2015;28(1):1-15.
27. Costa M, Pereira AM, Pinto SC, Silva J, Pereira LG, Coimbra S. In silico and expression analyses of fasciclin-like arabinogalactan proteins reveal functional conservation during embryo and seed development. *Plant Reprod.* 2019;32(4):353-70.
28. Coimbra S, Costa M, Jones B, Mendes MA, Pereira LG. Pollen grain development is compromised in *Arabidopsis* *agp6 agp11* null mutants. *J Exp Bot.* 2009;60(11):3133-42.
29. Zhou K. Glycosylphosphatidylinositol-Anchored Proteins in *Arabidopsis* and One of Their Common Roles in Signaling Transduction. *Frontiers in Plant Science.* 2019;10.
30. Lamport DT, Kieliszewski MJ, Showalter AM. Salt stress upregulates periplasmic arabinogalactan proteins: using salt stress to analyse AGP function. *New Phytol.* 2006;169(3):479-92.
31. Meng J, Hu B, Yi G, Li X, Chen H, Wang Y, et al. Genome-wide analyses of banana fasciclin-like AGP genes and their differential expression under low-temperature stress in chilling sensitive and tolerant cultivars. *Plant Cell Reports.* 2020;39(6):693-708.
32. Liu C, Mehdy MC. A Nonclassical Arabinogalactan Protein Gene Highly Expressed in Vascular Tissues, AGP31, Is Transcriptionally Repressed by Methyl Jasmonic Acid in *Arabidopsis*. *Plant Physiology.* 2007;145(3):863-74.
33. Fragkostefanakis S, Dandachi F, Kalaitzis P. Expression of arabinogalactan proteins during tomato fruit ripening and in response to mechanical wounding, hypoxia and anoxia. *Plant Physiol Biochem.* 2012;52:112-8.
34. Gilson P, Gaspar YM, Oxley D, Youl JJ, Bacic A. NaAGP4 is an arabinogalactan protein whose expression is suppressed by wounding and fungal infection in *Nicotiana glauca*. *Protoplasma.* 2001;215(1):128-39.

35. Nguema-Ona E, Vitré-Gibouin M, Cannesan M-A, Driouch A. Arabinogalactan proteins in root-microbe interactions. *Trends in Plant Science*. 2013;18(8):440-9.
36. Gaspar YM, Nam J, Schultz CJ, Lee L-Y, Gilson PR, Gelvin SB, et al. Characterization of the Arabidopsis Lysine-Rich Arabinogalactan-Protein AtAGP17 Mutant (rat1) That Results in a Decreased Efficiency of Agrobacterium Transformation. *Plant Physiology*. 2004;135(4):2162-71.
37. Xie D, Ma L, Samaj J, Xu C. Immunohistochemical analysis of cell wall hydroxyproline-rich glycoproteins in the roots of resistant and susceptible wax gourd cultivars in response to *Fusarium oxysporum* f. sp. *Benincasae* infection and fusaric acid treatment. *Plant Cell Rep*. 2011;30(8):1555-69.
38. Pfeifer L, Shafee T, Johnson KL, Bacic A, Classen B. Arabinogalactan-proteins of *Zostera marina* L. contain unique glycan structures and provide insight into adaption processes to saline environments. *Scientific Reports*. 2020;10(1):8232.
39. MacMillan CP, Mansfield SD, Stachurski ZH, Evans R, Southerton SG. Fasciclin-like arabinogalactan proteins: specialization for stem biomechanics and cell wall architecture in Arabidopsis and Eucalyptus. *The Plant Journal*. 2010;62(4):689-703.
40. Van Hengel AJ, Van Kammen A, De Vries SC. A relationship between seed development, Arabinogalactan-proteins (AGPs) and the AGP mediated promotion of somatic embryogenesis. *Physiol Plant*. 2002;114(4):637-44.
41. Poon S, Heath RL, Clarke AE. A chimeric arabinogalactan protein promotes somatic embryogenesis in cotton cell culture. *Plant Physiol*. 2012;160(2):684-95.
42. Pérez-Pérez Y, Carneros E, Berenguer E, Solís M-T, Bárány I, Pintos B, et al. Pectin De-methylesterification and AGP Increase Promote Cell Wall Remodeling and Are Required During Somatic Embryogenesis of *Quercus suber*. *Frontiers in Plant Science*. 2019;9.
43. Schultz CJ, Rumsewicz MP, Johnson KL, Jones BJ, Gaspar YM, Bacic A. Using Genomic Resources to Guide Research Directions. The Arabinogalactan Protein Gene Family as a Test Case. *Plant Physiology*. 2002;129(4):1448-63.
44. Simonovic A, Dragičević M, Bogdanović M, Trifunović-Momčilov M, Subotic A, Todorović S. DUF1070 as a signature domain of a subclass of arabinogalactan peptides. *Archives of Biological Sciences*. 2016;68:23-.
45. Ma Y, Yan C, Li H, Wu W, Liu Y, Wang Y, et al. Bioinformatics Prediction and Evolution Analysis of Arabinogalactan Proteins in the Plant Kingdom. *Frontiers in Plant Science*. 2017;8.
46. Amanchy R, Kandasamy K, Mathivanan S, Periaswamy B, Reddy R, Yoon WH, et al. Identification of Novel Phosphorylation Motifs Through an Integrative Computational and Experimental Analysis of the Human Phosphoproteome. *J Proteomics Bioinform*. 2011;4(2):22-35.
47. Jung I, Matsuyama A, Yoshida M, Kim D. PostMod: sequence based prediction of kinase-specific phosphorylation sites with indirect relationship. *BMC Bioinformatics*. 2010;11 Suppl 1(Suppl 1):S10.
48. Yang H, Wang M, Liu X, Zhao X-M, Li A. PhosIDN: an integrated deep neural network for improving protein phosphorylation site prediction by combining sequence and protein-protein interaction information. *Bioinformatics*. 2021;37(24):4668-76.
49. Kotch FW, Guzei IA, Raines RT. Stabilization of the Collagen Triple Helix by O-Methylation of Hydroxyproline Residues. *Journal of the American Chemical Society*. 2008;130(10):2952-3.
50. Chou KC. Prediction of protein cellular attributes using pseudo-amino acid composition. *Proteins*. 2001;43(3):246-55.
51. Xu Y, Wen X, Shao XJ, Deng NY, Chou KC. iHyd-PseAAC: predicting hydroxyproline and hydroxylysine in proteins by incorporating dipeptide position-specific propensity into pseudo amino acid composition. *Int J Mol Sci*. 2014;15(5):7594-610.
52. Shi S-P, Chen X, Xu H-D, Qiu J-D. PredHydroxy: computational prediction of protein hydroxylation site locations based on the primary structure. *Molecular BioSystems*. 2015;11(3):819-25.
53. Ismail HD, Newman RH, Kc DB. RF-Hydroxysite: a random forest based predictor for hydroxylation sites. *Molecular BioSystems*. 2016;12(8):2427-35.
54. Qiu WR, Sun BQ, Xiao X, Xu ZC, Chou KC. iHyd-PseCp: Identify hydroxyproline and hydroxylysine in proteins by incorporating sequence-coupled effects into general PseAAC. *Oncotarget*. 2016;7(28):44310-21.
55. Dragičević MB, Paunović DM, Bogdanović Milica D, Todorović SI, Simonović AD. ragp: Pipeline for mining of plant hydroxyproline-rich glycoproteins with implementation in R. *Glycobiology*. 2019;30(1):19-35.
56. Quinlan JR. Induction of decision trees. *Machine Learning*. 1986;1(1):81-106.
57. Peng H, Long F, Ding C. Feature selection based on mutual information: criteria of max-dependency, max-relevance, and min-redundancy. *IEEE Trans Pattern Anal Mach Intell*. 2005;27(8):1226-38.
58. Zhao Z, Anand R, Wang M. Maximum Relevance and Minimum Redundancy Feature Selection Methods for a Marketing Machine Learning Platform. 2019 IEEE International Conference on Data Science and Advanced Analytics (DSAA). 2019:442-52.

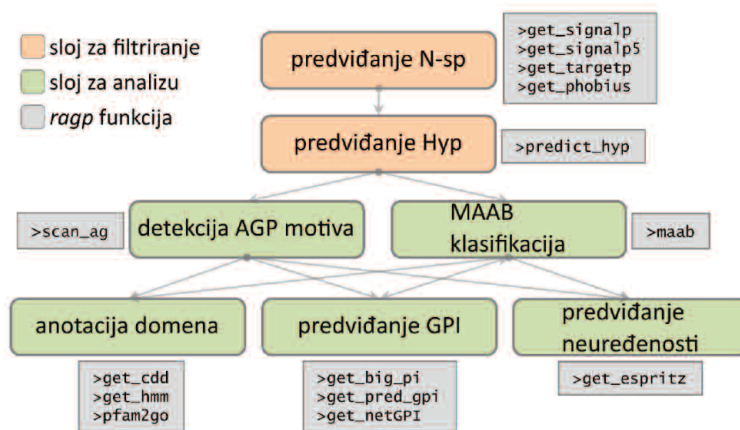
59. Kohavi R, John GH. Wrappers for feature subset selection. *Artificial Intelligence*. 1997;97(1):273-324.
60. Fix E, Hodges JL. Discriminatory Analysis. Nonparametric Discrimination: Consistency Properties. *International Statistical Review / Revue Internationale de Statistique*. 1989;57(3):238-47.
61. Cortes C, Vapnik V. Support-vector networks. *Machine Learning*. 1995;20(3):273-97.
62. Breiman L. Random Forests. *Machine Learning*. 2001;45(1):5-32.
63. Chen T, Guestrin C. XGBoost: A Scalable Tree Boosting System. *Proceedings of the 22nd ACM SIGKDD International Conference on Knowledge Discovery and Data Mining; San Francisco, California, USA: Association for Computing Machinery; 2016*. p. 785–94.
64. Finn RD, Clements J, Eddy SR. HMMER web server: interactive sequence similarity searching. *Nucleic acids research*. 2011;39(Web Server issue):W29-W37.
65. Lu S, Wang J, Chitsaz F, Derbyshire MK, Geer RC, Gonzales NR, et al. CDD/SPARCLE: the conserved domain database in 2020. *Nucleic Acids Research*. 2019;48(D1):D265-D8.
66. Käll L, Krogh A, Sonnhammer ELL. Advantages of combined transmembrane topology and signal peptide prediction—the Phobius web server. *Nucleic Acids Research*. 2007;35(suppl_2):W429-W32.
67. Eisenhaber B, Wildpaner M, Schultz CJ, Borner GH, Dupree P, Eisenhaber F. Glycosylphosphatidylinositol lipid anchoring of plant proteins. Sensitive prediction from sequence- and genome-wide studies for Arabidopsis and rice. *Plant Physiol*. 2003;133(4):1691-701.
68. Pierleoni A, Martelli PL, Casadio R. PredGPI: a GPI-anchor predictor. *BMC Bioinformatics*. 2008;9(1):392.
69. Gíslason MH, Nielsen H, Almagro Armenteros JJ, Johansen AR. Prediction of GPI-anchored proteins with pointer neural networks. *Current Research in Biotechnology*. 2021;3:6-13.
70. Walsh I, Martin AJM, Di Domenico T, Tosatto SCE. ESpritz: accurate and fast prediction of protein disorder. *Bioinformatics*. 2011;28(4):503-9.
71. Emanuelsson O, Brunak S, von Heijne G, Nielsen H. Locating proteins in the cell using TargetP, SignalP and related tools. *Nature Protocols*. 2007;2(4):953-71.
72. Petersen TN, Brunak S, von Heijne G, Nielsen H. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nature Methods*. 2011;8(10):785-6.
73. Almagro Armenteros JJ, Tsirigos KD, Sønderby CK, Petersen TN, Winther O, Brunak S, et al. SignalP 5.0 improves signal peptide predictions using deep neural networks. *Nat Biotechnol*. 2019;37(4):420-3.
74. Hwang Y, Lee H, Lee Y-S, Cho H-T. Cell wall-associated ROOT HAIR SPECIFIC 10, a proline-rich receptor-like kinase, is a negative modulator of Arabidopsis root hair growth. *Journal of Experimental Botany*. 2016;67(6):2007-22.
75. Showalter AM, Basu D. Glycosylation of arabinogalactan-proteins essential for development in Arabidopsis. *Communicative & Integrative Biology*. 2016;9(3):e1177687.
76. Ćuković K, Dragičević M, Bogdanović M, Paunović D, Giurato G, Filipović B, et al. Plant regeneration in leaf culture of *Centaurea erythraea* Rafn. Part 3: de novo transcriptome assembly and validation of housekeeping genes for studies of in vitro morphogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*. 2020;141(2):417-33.
77. Paunović DM, Ćuković KB, Bogdanović MD, Todorović SI, Trifunović-Momčilov MM, Subotić AR, et al. The Arabinogalactan Protein Family of *Centaurea erythraea* Rafn. *Plants (Basel)*. 2021;10(9).
78. Mashiguchi K, Yamaguchi I, Suzuki Y. Isolation and Identification of Glycosylphosphatidylinositol-Anchored Arabinogalactan Proteins and Novel β -Glucosyl Yariv-Reactive Proteins from Seeds of Rice (*Oryza sativa*). *Plant and Cell Physiology*. 2004;45(12):1817-29.



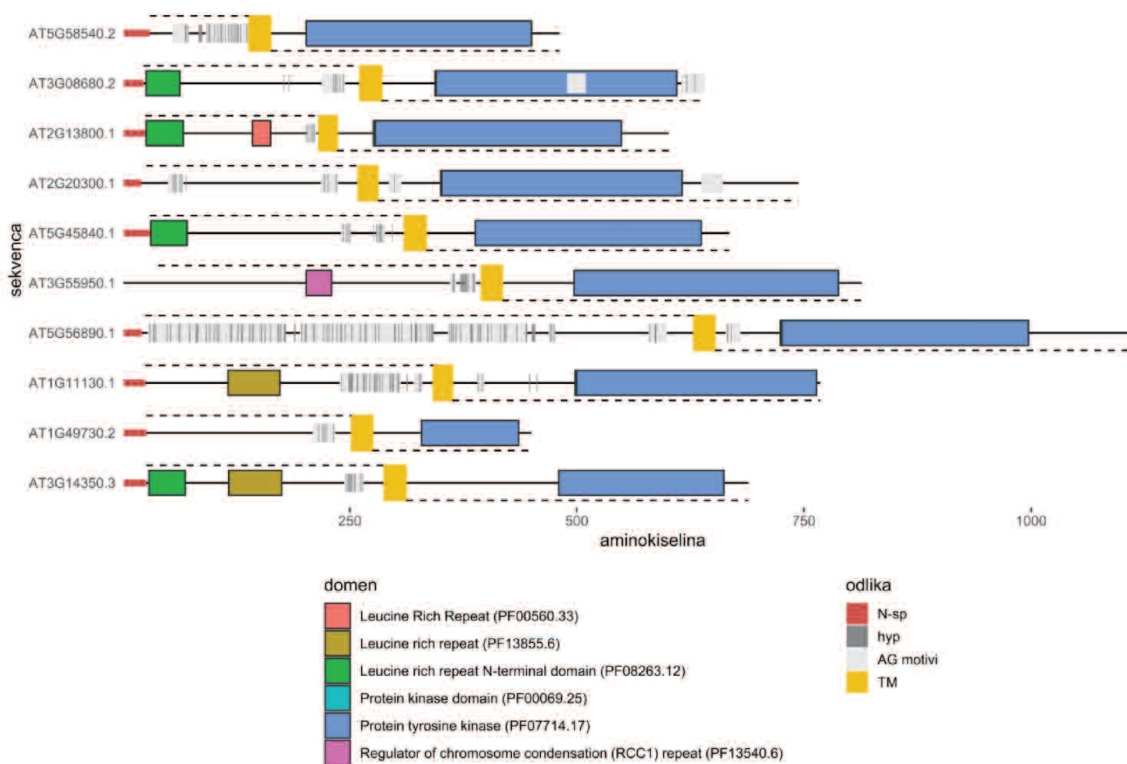
Slika 1. Šematska struktura arabinogalaktanskog polisaharida sa prikazanim mestima delovanja poznatih glikoziltransferaza. HPGT1-3 su Hyp O-galaktoziltransferaze koje glikoziluju hidroksilnu grupu Hyp sa galaktozom. At1g77810 je uključen u sintezu β -(1,3) galaktanskog lanca. GAL29A i GALT31A katališu formiranje i ekstenziju β -(1,6) galaktanskih lanaca. GlcAT14 katališe dodatak terminalnih uronskih kiselina. FUT4/6 katališu dodatak terminalne fukoze (modifikovano prema (75)).



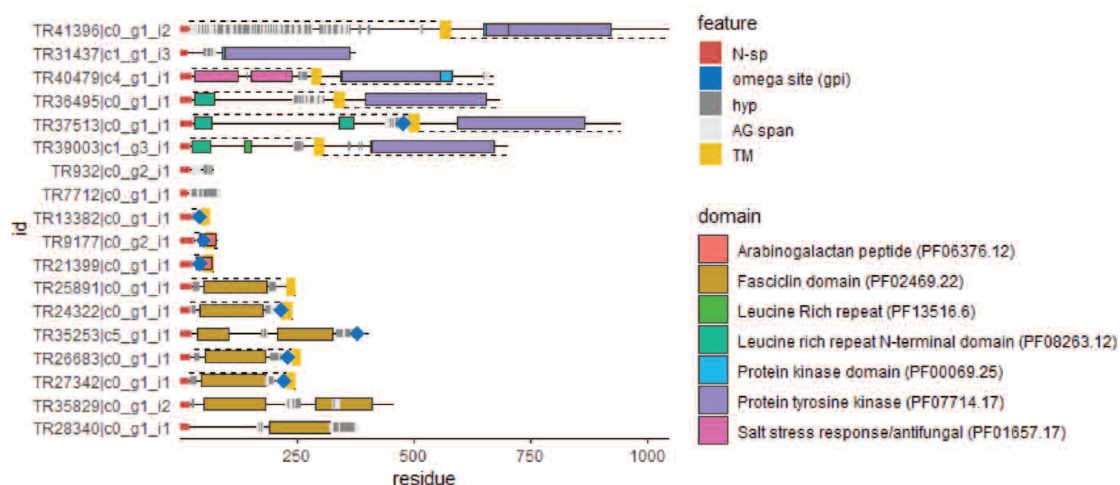
Slika 2. Šematski prikaz struktura članova HRGP familije: A - CL-EXT, B - hibridni EXT/AGP, C - himerni EXT, D - PRP, E - himerni PRP, F - AGP, G - AG peptid, H - himerni AGP. Hyp u motivima su predstavljeni crnim vertikalnim linijama, AG motivi su predstavljeni sivom pozadinom, EXT SP_n motivi su predstavljeni crvenom pozadinom, EXT Tyr motivi su predstavljeni narandžastim pravougaonicima, a difenil etarske veze između njih sa ljubičastim linijama, PRP motivi su predstavljeni krem pravougaonicima. Himerni HRGP poseduju Pfam domene (ljubičasti pravougaonici). N-sp je predstavljen zelenim segmentom na N-terminusu, a GPI-sp žutim segmentom na C-terminusu. Sive strelice označavaju da se ovi signalni peptidi odstranjuju. O-glikozilovani oligo i polisaharidi su šematski predstavljeni na svim klasama HRGP (modifikovano prema (7)).



Slika 3. Šema analize sekvenci korišćenjem *ragp* paketa. Bojom kajsije predstavljen je sloj za filtriranje sekvenci, zelenom bojom je predstavljen sloj za analizu sekvenci, sivi kvadrati označavaju nazive *ragp* funkcija kojima se postižu opisani zadaci u okviru dva sloja analize



Slika 4. Šematski prikaz strukture nekoliko arabinogalaktana nalik receptornim kinazama (engl. „kinase like AGPs“) KLA *Arabidopsis thaliana* koje sadrže AG motive. Struktura proteina je vizuelizovana korišćenjem *ragp* funkcije *plot_prot*. Transmembranski (TM) regioni su prikazani žutom bojom; ekstracelularni regioni su označeni isprekidanom linijom iznad sekvence, dok su intracelularni regioni označeni isprekidanom linijom ispod sekvence (predviđeni od strane *Phobius* pomoću *ragp* funkcije *get_phobius*); signalni peptidi (predviđeni od strane *SignalP* pomoću *ragp* funkcije *get_signalp*) označeni su zadebljalom crvenom linijom na N-terminalnom kraju sekvence; Hyp (predviđeni *predict_hyp* *ragp* funkcijom) su označeni vertikalnim, tamno sivim linijama; nizovi AG glikomoda (predviđeni *scan_ag* *ragp* funkcijom) označeni su svetlo sivom pozadinom; domeni (identifikovani *get_hmm* *ragp* funkcijom) su označeni pravougaonicima sa odgovarajućom bojom kao što je naznačeno u legendi.



Slika 5. Šematski prikaz sekvenci AGP *C. Erythrae* napravljen pomoću *ragp* paketa. Struktura proteina je vizuelizovana korišćenjem *ragp* funkcije *plot_prot*. Transmembranski (TM) regioni su prikazani žutom bojom; ekstracelularni regioni su označeni isprekidanom linijom iznad sekvence, dok su intracelularni regioni označeni isprekidanom linijom ispod sekvence (predviđeni od strane *Phobius* pomoću *ragp* funkcije *get_phobius*); signalni peptidi (predviđeni od strane *SignalP* pomoću *ragp* funkcije *get_signalp*) označeni su zadebljalom crvenom linijom na N-terminalnom kraju sekvence; Hyp (predviđeni *predict_hyp* *ragp* funkcijom) su označeni vertikalnim, tamno sivim linijama; nizovi AG glikomodula (predviđeni *scan_ag* *ragp* funkcijom) označeni su svetlo sivom pozadinom; različiti domeni (identifikovani *get_hmm* *ragp* funkcijom) su označeni pravougaonima sa odgovarajućom bojom kao što je naznačeno u legendi



“Trendovi u molekularnoj biologiji 3”
su podržani od
**Ministarstva nauke, tehnološkog
razvoja i inovacija Republike Srbije**

IMPRESUM

Trendovi u molekularnoj biologiji, 2023.

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 **Duška Savić Pavićević**, redovni profesor,
Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu

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

Recenzenti

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

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

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

Štampa

Curent Print, Beograd

Periodičnost izlaženja publikacije

Godišnje

Tiraž

100 primeraka

tmb

Trendovi u molekularnoj biologiji
Trends in Molecular Biology

Autori

Aleksandra Uskoković	138
Ana Djordjevic	151
Anastasija Ninković	38
Biljana Božić Nedeljković	245
Bojan Božić	245
Bojana Stevanović	90
Danijela Paunović	269
Dunja Drakulić	184
Duška Savić-Pavičević	38
Goran Brajušković	8
Ivana Kolić	168
Jadranka Miletić Vukajlović	184
Jelena Arambašić Jovanović	138
Jelena M. Aleksić	18
Jovan Pešović	38
Jovana Komazec	78
Jovana Kuveljić	122
Lana Radenković	38
Ljiljana Stojković	168
Ljupka Gligorovska	151
Luka Velimirov	38
Maja Bubić	106
Maja Stojiljković	78
Maja Živković	106
Marija Đorđević	138
Marija Đurić	256
Marija Dušanović Pjević	205
Marija Kosić	218
Marko Panić	38
Melita Vidaković	138
Milena Stevanović	18
Milka Grk	232
Miloš Brkušnin	38
Mirjana Mihailović	138
Nataša Kovačević Grujičić	18
Nemanja Garai	38
Nemanja Radovanović	38
Nevena Grdović	138
Nina Japundžić-Žigon	90
Nina Žigon	218
Slobodan Davidović	18
Svetlana Dinić	138
Tamara Djurić	122
Tanja Lunić	245
Teodora Karan-Đurašević	58
Zorica Nešić	218

CIP - Каталогизација у публикацији
Народна библиотека Србије, Београд

577.2

TRENDVI u molekularnoj biologiji = Trends in
Molecular Biology. - 2021, br. 1 (sep.)- . - Београд :
Институт за молекуларну генетику и генетичко инжењерство,
2021- (Београд : Curent Print). - 28 cm

Годишње. - Текст на срп. и engl. језику.
ISSN 2787-2947 = Trendovi u molekularnoj biologiji
COBISS.SR-ID 45105929