

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



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



Beograd • Belgrade • 2022.
IMGGI • IMGGE

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

Predgovor

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

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

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

„I šta ćemo sad?“

Sonja Pavlović

Iz recenzija Tematskog zbornika *Trendovi u molekularnoj biologiji*

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Dr Gordana Nikčević, naučni savetnik

Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Univerzitet u Beogradu

Savremeni pristupi u istraživanju molekularne osnove karcinoma prostate

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

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

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

³Kriminalističko-policijski univerzitet, Beograd, Srbija

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

⁵Univerzitet u Beogradu-Hemijski fakultet, Beograd, Srbija

Kontakt: brajuskovic@bio.bg.ac.rs

Apstrakt

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

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

Modern approaches in research of the molecular basis of prostate cancer

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

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

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

³Criminal Police University, Belgrade, Serbia

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

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

Correspondence: brajuskovic@bio.bg.ac.rs

Abstract

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

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

Karcinom prostate

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

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

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

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

PROSTATSERBIA

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Istraživanja moguće primene egzozoma kao bioloških tumor specifičnih markera KP

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

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

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

Zahvalnica

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

Autori rada duguju zahvalnost:

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

Literatura

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin.* 2021; 71(3):209-49.
2. Cornford P, van den Bergh RCN, Briers E, Van den Broeck T, Cumberbatch MG, De Santis M, et al. EAU-EANM-ESTRO-ESUR-SIOG Guidelines on Prostate Cancer. Part II-2020 Update: Treatment of Relapsing and Metastatic Prostate Cancer. *Eur Urol.* 2021; 79(2):263-82.
3. Hoffman RM, Mott SL, McDowell BD, Anand ST, Nepple KG. Trends and practices for managing low-risk prostate cancer: a SEER-Medicare study. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* 2022; 25(1):100-8.
4. Jolliffe I, Lovric M. International encyclopedia of statistical science. Principal Component Analysis. Springer Berlin Heidelberg Berlin, Heidelberg; 2011. p.1094–6.
5. Clarke GM, Anderson CA, Pettersson FH, Cardon LR, Morris AP, Zondervan KT. Basic statistical analysis in genetic case-control studies. *Nat Protoc.* 2011; 6(2):121-33.
6. Wallace BC, Dahabreh IJ, Trikalinos TA, Lau J, Trow P, Schmid CH. Closing the Gap between Methodologists and End-Users: R as a Computational Back-End. *J Stat Softw.* 2012; 49(5).
7. Mantel N, Haenszel W. Statistical aspects of the analysis of data from retrospective studies of disease. *J Natl Cancer Inst.* 1959; 22(4):719-48.
8. DerSimonian R, Laird N. Meta-analysis in clinical trials. *Control Clin Trials.* 1986; 7(3):177- 88.
9. Egger M, Smith GD, Schneider M, Minder C. Bias in meta-analysis detected by a simple, graphical test. *BMJ* 1997; 315(7109):629-34.
10. Bai B, Chen Q, Jing R, He X, Wang H, Ban Y, et al. Molecular Basis of Prostate Cancer and Natural Products as Potential Chemotherapeutic and Chemopreventive Agents. *Front Pharmacol.* 2021;12:738235.
11. Phua TJ. The Etiology and Pathophysiology Genesis of Benign Prostatic Hyperplasia and Prostate Cancer: A New Perspective. *Medicines (Basel).* 2021;8(6):30.
12. Knowles RG, Moncada S. Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J.* 1994; 298 (Pt 2):249-58.
13. Lee KM, Kang D, Park SK, Berndt SI, Reding D, Chatterjee N, et al. Nitric oxide synthase gene polymorphisms and prostate cancer risk. *Carcinogenesis* 2009; 30(4):621-5.
14. Branković A, Brajušković G, Nikolić Z, Vukotić V, Cerović S, Savić-Pavićević D, et al. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms and prostate cancer risk in Serbian population. *Int J Exp Pathol.* 2013;94(6):355-61.
15. Nikolić ZZ, Pavićević DLj, Romac SP, Brajušković GN. Genetic variants within endothelial nitric oxide synthase gene and prostate cancer: a meta-analysis. *Clin Transl Sci.* 2015; 8(1):23-31.
16. Ding WH, Ren KW, Yue C, Zou JG, Zuo L, Zhang LF, Bai Y, Okada A, Yasui T, Mi YY. Association between three genetic variants in kallikrein 3 and prostate cancer risk. *Biosci Rep.* 2018; 38(6):BSR20181151.
17. Stegeman S, Amankwah E, Klein K, O'Mara TA, Kim D, Lin HY, et al. A Large-Scale Analysis of Genetic Variants within Putative miRNA Binding Sites in Prostate Cancer. *Cancer Discov.* 2015; 5(4):368-79.
18. Gansmo LB, Romundstad P, Birkeland E, Hveem K, Vatten L, Knappskog S, et al. MDM4 SNP34091 (rs4245739) and its effect on breast-, colon-, lung-, and prostate cancer risk. *Cancer Med.* 2015; 4(12):1901-7.
19. Kotarac N, Dobrijevic Z, Matijasevic S, Savic-Pavicevic D, Brajuskovic G. Association of KLK3, VAMP8 and MDM4 Genetic Variants within microRNA Binding Sites with Prostate Cancer: Evidence from Serbian Population. *Pathol Oncol Res.* 2020; 26(4):2409-23.
20. Benafif S, Kote-Jarai Z, Eeles RA; PRACTICAL Consortium. A Review of Prostate Cancer Genome-Wide Association Studies (GWAS). *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2018; 27(8):845-857.
21. Brajušković G, Nikolić Z, Branković A, Kotarac N, Savić-Pavićević D. Genetic basis of prostate cancer: Association studies. *Biologica Serbica* 2017; 39(1):40-5.
22. Branković AS, Brajušković GN, Mirčetić JD, Nikolić ZZ, Kalaba PB, Vukotić VD, Tomović SM, Cerović SJ, Radojičić ZA, Savić-Pavićević DL, Romac SP. Common variants at 8q24 are associated with prostate cancer risk in Serbian population. *Pathol Oncol Res.* 2013; 19(3):559-69.
23. Nikolić ZZ, Branković AS, Savić-Pavićević DL, Preković SM, Vukotić VD, Cerović SJ, Filipović NN, Tomović SM, Romac SP, Brajušković GN. Assessment of association between common variants at 17q12 and prostate cancer risk-evidence from Serbian population and meta—analysis. *Clin Transl Sci.* 2014; 7(4):307-13.

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



IMPRESUM

Trendovi u molekularnoj biologiji, 2022.

Izdavač

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

Urednik

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

Uređivački odbor

Dr **Jelena Begović**, naučni savetnik,
Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo
Univerzitet u Beogradu

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

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

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

Recenzenti

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

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

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

Dizajn i izrada korica

Ivan Strahinić

Štampa

Curent Print, Beograd

Periodičnost izlaženja publikacije

Godišnje

Tiraž

100 primeraka

Autori

Aleksandar Cingel.....	238
Ana Branković.....	63
Ana Djordjević.....	63
Branislava Medić Brkić.....	15
Dragana Srebro.....	15
Dunja Drakulić.....	168
Dusan Keckarević.....	51, 275
Goran Brajušković.....	63
Gordana Matić.....	8
Ilona Đorić.....	75
Ivana Guševac Stojanović.....	168
Jelena Martinović.....	186
Jelena Perić.....	143
Jovana Despotović.....	90
Katarina Savić Vujović.....	15
Katarina Zeljić.....	223
Mariana Stanišić.....	255
Marijana B. Živković.....	104
Marina Zarić Kontić.....	186
Milena Trajković.....	238
Milena Ugrin.....	32
Milica Keckarević Marković.....	51, 275
Milica Popović.....	63
Miljana Kecmanović.....	51, 275
Neda Đorđević.....	206
Nevena Banjac.....	223
Nikola Jovanović.....	125
Predrag Vujović.....	155
Sladjana Jevremović.....	238
Slavica Ninković.....	223
Sonja Šelemetjev.....	75
Sonja Vučković.....	15
Suzana Matijašević-Joković.....	63
Tamara Dakić.....	155
Tatjana Mitrović.....	125
Tijana Išić Denčić.....	75
Zorana Dobrijević.....	63

CIP - Каталогизacija u publikaciji
Narodna biblioteka Srbije, Beograd

577.2

TRENDOVI u molekularnoj biologiji = Trends in
Molecular Biology. - 2022, br. 2 (sep.)- . - Beograd :
Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo,
2021- (Beograd : Curent Print). - 28 cm

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