

UNIVERZITET U BEOGRADU

MEDICINSKI FAKULTET

Marko L. Stojanović

ISPITIVANJE ULOGE *AIP* GENA U
PATOGENEZI ADENOMA HIPOFIZE NA
ŽIVOTINJSKOM I LJUDSKOM MODELU

DOKTORSKA DISERTACIJA

Beograd, 2019

BELGRADE UNIVERSITY

MEDICAL FACULTY

Marko L. Stojanović

INVESTIGATION OF THE ROLE OF *AIP*
GENE IN PITUITARY ADENOMA
PATHOGENESIS ON ANIMAL AND HUMAN
MODELS

DOCTORAL DISSERTATION

Belgrade, 2019

Mentor:

Prof. dr Vera Popović

Medicinski fakultet, Univerziteta u Beogradu
Beograd, Srbija

Komentor:

Prof. dr Márta Korbonits

William Harvey Research Institute,
Barts and the London School of Medicine
London, UK

Članovi komisije za ocenu završene doktorske disertacije:

1. **Prof dr Milan Petakov**, Klinika za endokrinologiju, dijabetes i bolesti metabolizma,
Klinički centar Srbije, Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu

2. **Prof. dr Milica Medić Stojanoska**

Klinika za endokrinologiju, Klinički centar Vojvodine
Medicinski fakultet, Univerzitet u Novom Sadu

3. **Doc dr Dragana Miljić**, Klinika za endokrinologiju, dijabetes i bolesti metabolizma,
Klinički centar Srbije, Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu

Datum odbrane: ____/____ 2019. godine

Zahvalnica

Ovaj rad nastao je u sklopu projekta Ministarstva nauke Republike Srbije br. 175033: “Ispitivanje uloge novih molekula u regulaciji sekrecije hormona rasta i energetske homeostaze kod čoveka”, čiji je rukovodilac prof dr Vera Popović (mentor doktorata). Istraživanja na eksperimentalnim životinjama sprovedena su u okviru šestomesečnog studijskoj boravka doktoranta na odeljenju *Department of Endocrinology, William Harvey Research Institute, Bart's and the London School of Medicine, Queen Mary University of London*. Domaćin posete bila je prof dr Márta Korbonits (komentor doktorata) a boravak je ostvaren zahvaljujući stipendijama *Society for Endocrinology (Practical Skills Grant), Royal College of Physicians (Samuel Leonard Simpson Fellowship), British Society for Neuroendocrinology (Research Visit Grant), European Society of Endocrinology (Short Term Fellowship)*, i zahvaljujući razumevanju rukovodstva Kliničkog centra Srbije i Klinike za endokrinologiju, dijabetes i bolesti metabolizma. Eksperimenti na životinjama sprovedeni su pod okriljem *Royal Veterinary College, University of London*, pod patronatom profesorke Imelde McGonnell. Veliku zahvalnost za pomoć u eksperimentalnom radu dugujem dr Danieli Aflorei. Kliničko-istraživački deo doktorata sproveden je na Odeljenju neuroendokrinologije, pod supervizijom prof dr Vere Popović (mentora). Izražavam posebnu zahvalnost svim pacijentima koji su nesebično pristali da učestvuju u ovoj studiji. Zahvalan sam svim lekarima Odeljenja neuroendokrinologije i sestrama i tehničarima na čelu sa glavnom sestrom Milom Pantović, kao i zaposlenima u Hormonskoj laboratoriji Klinike za endokrinologiju. Za potrebe ovog istraživanja razvijen je i po prvi put primenjen serumski imunoesej za AIP za čiji razvoj i optimizaciju je najzaslužniji dr Zida Wu pod supervizijom prof dr Christian Strasburgera, *Department of Medicine for Endocrinology, Diabetes and Nutritional Medicine, Charité Universitätsmedizin, Campus Mitte, Berlin, Germany*. Najveću zahvalnost dugujem svom mentoru, prof dr Veri Popović za viziju, strpljenje, nesebičnu podršku, poverenje i stalni podsticaj ličnim primerom.

Posveta

Svojoj porodici, za ljubav, strpljenje, razumevanje i podršku.

ISPITIVANJE ULOGE AIP GENA U PATOGENEZI ADENOMA HIPOFIZE NA ŽIVOTINJSKOM I LJUDSKOM MODELU

Rezime:

Uvod: Naučno interesovanje za aryl hydrocarbon receptor-interacting protein (*AIP*) gen poteklo je od saznanja da su pacijenti sa inaktivirajućim *AIP* mutacijama predisponirani za razvoj velikih, invazivnih tumora hipofize, somatotropinoma ili prolaktinoma, koji se javljaju u mlađem dobu i otporni su na lečenje. Zebrice (*Danio rerio*) - (ZF) kao eksperimentalni životinjski model pružaju anatomske i funkcionalne sličnosti sa ljudskim neuroendokrinim sistemom. *AIP* gen je evoluciono visoko konzerviran i široko eksprimiran u organizmu. Fiziološka uloga *AIP* proteina u zdravoj hipofizi nije poznata. Zapažena je kolokalizacija *AIP* proteina sa hormonom rasta (HR) u sekretornim vezikulama somatotrofa. Prisustvo proteina *AIP* u serumu pokazano je proteomičkom analizom.

Ciljevi: Na životinjskom modelu ZF ispitivan je uticaj inaktivacije *AIP* gena na tumorigenezu na nivou hipofize. Na ljudskom modelu ispitivana je fiziološka uloga *AIP* proteina na nivou hipofize. Pretpostavljena kosekrecija *AIP* i HR je ispitivana analizom serumskog nivoa *AIP* i HR bazno i u toku testova stimulacije ili supresije sekrecije HR kod ispitanika sa očuvanom sekrecijom HR, pacijenata sa deficitom HR (GHD) i pacijenata sa akromegalijom – nekontrolisanom hipersekrecijom HR.

Studija na životinjskom modelu – Materijal i metode: Inaktivacija *AIP* gena - knock down (*AIP* KD) na embrionima ZF ostvarena je primenom antisens morfolino oligonukleotida u jednoćelijskom stadijumu razvoja. Kontrolni embrioni su tretirani neaktivnim oligonukleotidima sa 5 promenjenih baznih parova (KMo). Neinjektirani embrioni iz istog legla - wild type (WT) analizirani su kao netretirana kontrola. Svi embrioni (N=307) su inkubirani pod istim uslovima po 5 dana tokom kojih je morfometrijski analiziran njihov razvoj. Whole mount in situ hibridizacija za *AIP* korišćena je za ispitivanje ekspresije *AIP* gena kod normalnih zebrića (WT) i za potvrdu inaktivacije kod *AIP* KD. 120h nakon oplodnje, sprovedeno je whole mount imunobojenje ispitivanih i kontrolnih embriona primenom anti-PRL antitela (zečija anti-losos poliklonalna 1:2000). Po 5 embriona iz svake grupe je slučajnim izborom izdvojeno za analizu digitalnom mikroskopijom. Površina bojenja na nivou hipofize analizirana je pomoću softvera za analizu slike (NIH ImageJ 1.48v).

Studija na životinjskom modelu - Rezultati: Kod ZF embriona sa inaktivacijom *AIP* gena (*AIP* KD) zapažen je ukupni zastoj u rastu i razvoju u odnosu na kontrolne grupe WT i KMo. Kod

AIP KD embriona pokazana je značajno smanjena telesna dužina, prolazno uvećanje regije srednjeg mozga, uvećanje regije perikarda i nerazvijenost ribljeg mehura. Na osnovu površine PRL bojenja, hipofiza kod *AIP* KD bila je uvećana, više ventralno pozicionirana i zaokrugljena u poređenju sa ovalnim ili bubrežastim oblikom kod WT i KMo. Površina preseka hipofize kod *AIP* morfanta ($1621,9 \pm 87,2 \mu\text{m}^2$) bila je značajno veća u odnosu na WT ($574,1 \pm 357,8 \mu\text{m}^2$ $p < 0,05$) i KMo ($626,0 \pm 223,6 \mu\text{m}^2$ $p < 0,05$) bez razlike između dve kontrolne grupe ($p=0,90$).

Studija na ljudskom modelu – Pacijenti i Metode: Test tolerancije insulina (ITT) je primenjen kod pacijenata sa GHD ($n=13$) i kontrolnih ispitanika bez GHD podudarnih po uzrastu i ITM ($n=31$). Oralni test opterećenja glukozom (OGTT) sproveden je kod pacijenata sa aktivnom akromegalijom ($n=26$) i kontrolnih ispitanika sa normalnom supresibilnošću HR podudarnih po uzrastu i ITM ($n=18$). Imunometrijski esej za serumski *AIP* razvijen je za potrebe ove studije.

Studija na ljudskom modelu - Rezultati: Serumski *AIP* uspešno je meren kod svih ispitanika u koncentraciji ranga $0,1 \text{ ng/ml}$, nezavisno od pola, uzrasta i ITM. Kod pacijenata sa GHD i kontrolnih ispitanika bez GHD nisu se razlikovale bazne vrednosti *AIP*, *AIP*max, *AIP*-AUC ili *AIP*-Delta u ITT. *AIP* vrednosti nisu korelirale sa vrednostima HR, PRL ili kortizola tokom ITT. Kod pacijenata sa aktivnom akromegalijom i kontrolnih ispitanika sa normalnom supresibilnošću HR nisu se razlikovale bazne vrednosti *AIP*, *AIP*max, *AIP*-AUC ili *AIP*-Delta u toku OGTT. Serumske vrednosti *AIP* nisu se menjale tokom ITT ili OGTT.

Zaključci: *AIP* morfolino KD embrioni zebrića ispoljavaju anomalije razvoja mozga, perikarda i ribljeg mehura kao i ukupan zastoj u rastu, ukazujući na široke razvojne uloge *AIP* gena. *AIP* morfanti ispoljavaju veću površinu imunobojenja za PRL na nivou hipofize ukazujući na mogući porast proliferativne aktivnosti (hiperplaziju ili tumor) na nivou hipofize usled inaktivacije *AIP* gena.

Serumski nivo *AIP* proteina *in vivo* je po prvi put analiziran primenom ciljano razvijenog imunometrijskog eseja. Serumski *AIP* nezavistan je od uzrasta, pola i ITM i nepodložan uticaju hipoglikemije ili hiperglikemije. Suprotno očekivanju, baziranom na kolokalizaciji sa HR u sekretornim vezikulama somatotrofa, pokazano je odsustvo korelacije u sekreciji HR i *AIP* bazno ili tokom testova stimulacije (ITT) ili supresije HR (OGTT). Platforma pouzdanog određivanja serumskog *AIP* uspostavljena je za dalja istraživanja izvora, uloge i značaja, ovog evolutivno visoko konzerviranog i za opstanak važnog proteina.

Ključne reči: adenomi hipofize, sekrecija HR, hipopituitarizam, ITT, OGTT, akromegalija, FIPA, *AIP*, ARA9, XAP2

Naučna oblast: Medicina

Uža naučna oblast: Interna medicina - endokrinologija

INVESTIGATION OF THE ROLE OF *AIP* GENE IN PITUITARY ADENOMA PATHOGENESIS ON ANIMAL AND HUMAN MODELS

Abstract

Introduction: Scientific interest for aryl hydrocarbon receptor-interacting protein (*AIP*) gene originates from the fact that patients with inactivating *AIP* mutations are predisposed to large, invasive, GH- or PRL-secreting pituitary tumours, occurring at a younger age and poorly responsive to treatment. The zebrafish (*ZF*) model provides anatomical and functional similarities to human neuroendocrine system. *AIP* is evolutionarily well conserved and widely distributed throughout organism. The role of *AIP* in normal pituitary function is largely unknown. *AIP* is co-localized with growth hormone (GH) in somatotroph secretory vesicles. Serum *AIP* protein was proteomically identified. We aimed at investigating the role of *AIP* inactivation on pituitary tumorigenesis in *ZF* model and investigating the physiological role of *AIP* at pituitary level in human model. We investigated whether *AIP* and GH are co-secreted by measuring serum *AIP* and GH levels at baseline and after GH stimulation and suppression tests using *in vivo* human models of normal GH secretion, patients with GH deficiency (GHD) and patients with GH hypersecretion - acromegaly.

Animal model study - Material and Methods: *AIP* knock down (KD) *ZF* embryos were generated using antisense morpholino oligonucleotides injected at one-cell stage. Control embryos were injected with 5-base mispaired oligonucleotide as control morpholinos (CM). Wild type (WT) embryos from the same batch served as uninjected controls. All embryos (N=307) were incubated in the same conditions for 5 days, and assessed during development. Whole mount in situ hybridization for *AIP* was used to confirm the inactivation in *AIP* KD and to assess *AIP* expression in WT. At 120 hours post fertilization (hpf) whole mount immunostaining of all embryos was performed with anti-PRL antibodies (rabbit anti-salmon polyclonal 1:2000). A total of 15 embryos (5 from each group) were randomly selected for digital microscopy. Pituitary staining was assessed by image analysis software (NIH ImageJ 1.48v).

Animal model study - Results: Overall developmental delay and retardation was observed in the *AIP* KD compared to WT and CM control groups. KD embryos exhibited reduced total body length, transitory midbrain enlargement, pericardium enlargement and swim bladder underdevelopment. Assessed by the PRL staining, pituitary in the *AIP* morphants appeared to be larger, ventrally shifted and round shaped compared to oval or kidney shaped pituitary in the

WT. Pituitary size in *AIP* morphants ($1621.9 \pm 87.2 \mu\text{m}^2$) was significantly larger than in WT ($574.1 \pm 357.8 \mu\text{m}^2$ $p < 0.05$) and CM ($626.0 \pm 223.6 \mu\text{m}^2$ $p < 0.05$) with no statistical difference between the two control groups ($p=0.90$).

Human model study - Subjects and Methods: Insulin tolerance test (ITT) was performed in GHD patients ($n=13$) and age-BMI-matched non-GHD controls ($n=31$). Oral glucose tolerance test (OGTT) was performed in patients with active acromegaly ($n=26$) and age-BMI-matched controls ($n=18$) with normal GH suppressibility. An in-house immunometric AIP assay was developed and employed.

Human model study - Results: Serum AIP was independent of gender, age or BMI. Baseline AIP levels did not differ in GHD and non-GHD subjects nor did AIPmax, AIP-AUC or AIP-Delta in ITT. AIP levels did not correlate with GH, PRL or cortisol levels in ITT. Baseline AIP, AIPmax, AIP-AUC or AIP-Delta did not differ between patients with active acromegaly versus control subjects at baseline and during GH suppression test (OGTT). Serum AIP values did not significantly change during ITT or OGTT.

Conclusions: *AIP* Morpholino Knock Down zebrafish embryos demonstrate brain, pericardium, and swim bladder anomalies and general developmental delay, pointing to wide developmental role of *AIP* gene. *AIP* morphant embryos exhibit larger surface of PRL immunostaining in the pituitary compared to controls suggesting possible increase in proliferative activity (hyperplasia or tumour) at pituitary level following *AIP* gene inactivation.

A novel immunometric assay was employed for the first time to assess human circulating serum AIP *in vivo*. Serum AIP levels were independent of age, sex or BMI, and were unaffected by hypoglycemia or hyperglycemia. Contrary to expectations based on secretory vesicles co-localization of AIP and GH, no correlation was found between serum AIP and GH secretion at baseline nor during GH stimulation (ITT) and GH suppression tests (OGTT). A platform of reliable serum AIP measurement is established for further research of the circulatory source, role and impact for this highly conserved protein essential for survival.

Key words: pituitary adenoma, GH secretion, hypopituitarism, ITT, OGTT, acromegaly, FIPA, AIP, ARA9, XAP2

Scientific area: Medicine

Scientific field: Internal medicine - endocrinology

Sadržaj

1.UVOD	1
1.1 Adenomi hipofize	1
1.2 Patogeneza adenoma hipofize.....	2
1.3 <i>AIP</i> gen.....	5
2. ISPITIVANJE ULOGE <i>AIP</i> GENA U PATOGENEZI ADENOMA HIPOFIZE NA ŽIVOTINJSKOM MODELU.....	9
2.1 Eksperimentalni životinjski modeli inaktivacije <i>AIP</i> gena	9
2.2 Model <i>Danio rerio</i> – ribe zebrice.....	11
2.3 Morfolino metoda u eksperimentalnoj genskoj inaktivaciji	17
3. Ciljevi istraživanja na životinjskom modelu	20
4. Materijal i metodologija istraživanja na životinjskom modelu	21
4.1 Eksperimentalne životinje	21
4.2 Ekspresija <i>AIP</i> gena.....	21
4.3 Morfolino tehnika genske inaktivacije <i>AIP</i>	22
4.4 <i>Whole mount</i> imunobojenje antitelima za PRL i HR	23
4.5 Statistička metodologija	23
5. Rezultati istraživanja na životinjskom modelu	25
5.1 Ekspresija <i>AIP</i> gena u organizmu zebrića	25
5.2 Lokalizacija i morfologija hipofize zebrića analizom HR i PRL imunobojenja.....	26
5.3 Testiranje injekcione tehnike i optimalne koncentracije morfolina.....	26
5.4 Fenotipske karakteristike rasta i razvoja zebrića sa <i>AIP</i> inaktivacijom.....	27
5.5 Promene na nivou hipofize zebriće usled inaktivacije <i>AIP</i> gena	34
6. Diskusija rezultata istraživanja na životinjskom modelu.....	36
7. Zaključak istraživanja na životinjskom modelu.....	39
8. ISPITIVANJE FIZIOLOŠKE ULOGE <i>AIP</i> PROTEINA NA NIVOU HIPOFIZE NA LJUDSKOM MODELU	40
8.1 <i>AIP</i> protein	40
8.2 Primeri sekretornih produkata tumor-supresornih gena	42
8.3 Osnove pretpostavke o sekretornoj prirodi <i>AIP</i> proteina	43
9. Ciljevi istraživanja na ljudskom modelu	51
10. Pacijenti i metode	52
10.1 Pacijenti	52

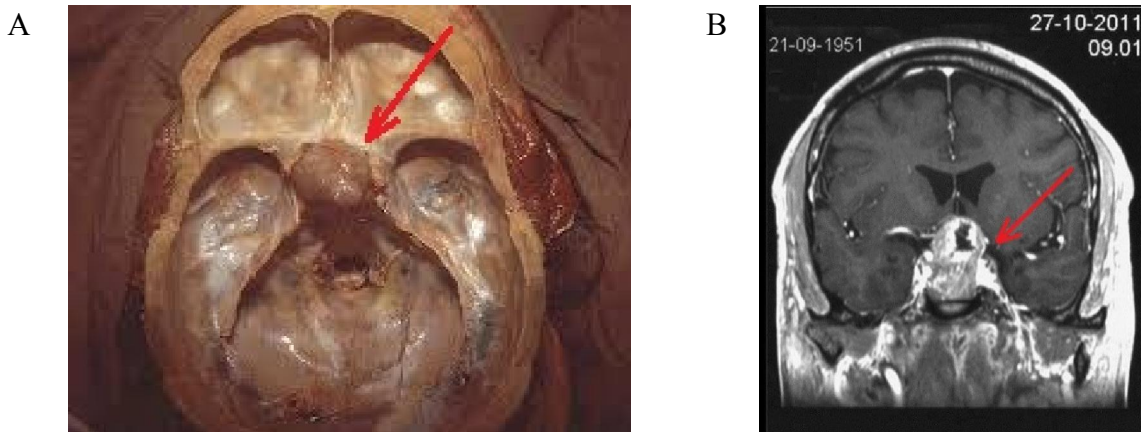
10.2 Dinamski testovi sekrecije HR	53
10.3 Hormonske analize	54
10.4 Analiza serumskog AIP	54
10.5 Statistička analiza	55
11. Rezultati istraživanja na ljudskom modelu	56
11.1 Hormonski odgovor u ITT.....	56
11.2 Odgovor HR na supresiju	56
11.3 Koncentracije AIP u serumu	56
11.3.1 Uticaj pola na serumski AIP	56
11.3.2 Uticaj godina starosti na serumski AIP	57
11.3.3 Uticaj ITM na serumski AIP	59
11.3.4 Uticaj očuvanosti sekrecije HR na serumski AIP.....	60
11.3.5 Uticaj očuvane supresibilnosti HR na serumski AIP	62
11.3.6 Korelacija serumskih nivoa AIP i HR u ITT	63
11.3.7 Korelacija vrednosti AIP i PRL u ITT.....	64
11.3.8 Korelacija vrednosti AIP i kortizola u ITT	65
11.3.9 Korelacija vrednosti AIP i HR u OGTT.....	66
11.3.10 Dinamika nivoa serumskog AIP u toku ITT.....	67
11.3.11 Dinamika nivoa serumskog AIP u toku OGTT.....	68
12. Diskusija rezultata istraživanja na ljudskom modelu	70
13. Zaključak istraživanja na ljudskom modelu	75
14. ZAKLJUČCI.....	76
15. LITERATURA.....	77
SKRAĆENICE	

1. UVOD

1.1 Adenomi hipofize

Hipofiza je glavni regulator endokrine homeostaze. Funkcionalna mreža njenih ćelija dinamično i plastično odgovara na konstantne promene hormonske i metaboličke sredine. Visok nivo diferencijacije i specijalizacije hipofiznih ćelija ostvaren je na račun smanjenog kapaciteta obnavljanja.

Adenomi hipofize (AH) su benigne, najčešće monoklonalne neoplazije, pretežno sporadičnog javljanja. Patogeneza AH kao i visoko prevalentna benignost tumora hipofize i dalje predstavljaju naučne izazove. AH privlače stručnu i istraživačku pažnju kako zbog uticaja na morbiditet i mortalitet tako i stepenom opterećenja zdravstvenih resursa kroz ponavljane neuroendokrinološke i neurohirurške preglede, MR vizuelizacije, ponavljane hormonske analize, oftalmološke preglede sa kompjuterizovanim perimetrijom, troškove medikamentnog, operativnog ili stereotaksičnog lečenja. Svaka četvrta kranijalna neurohirurška intervencija sprovodi se zbog AH. (Raappana A *et al*, 2010) Sa prevalencom klinički relevantnih AH od oko 1:1000 i godišnjom incidencom od oko 45 na milion, AH pogađaju u velikoj meri populaciju srednjeg životnog doba, u punoj ekonomskoj produktivnosti i reproduktivnom potencijalu. Radi se o bolesti koja najčešće pruža mogućnost lečenja, remisije ili dobre kontrole, pri tom sa prevalencom ranga uporedivog sa bolestima koje imaju mnogo veću pažnju stručne i opšte javnosti. (Agustsson T *et al*, 2015)



Slika 1.1: Adenom hipofize (označeni strelicom): A- patološki makroskopski izgled na poprečno preseku nivoa baze lobanje (izvor: www.library.med.utah.edu) B – MR izgled – koronalni presek (kolekcija autora).

AH ispoljavaju karakteristike koje ih izdvajaju po ponašanju od drugih endokrinih i ne-endokrinih neoplazija: visoka benignost, spor rast i pretežna nesklonost za progresiju ka malignosti ili metastaziranju uprkos mogućem lokalno agresivnom rastu. Mikroadenomi ne napreduju nužno u makroadenome. Makroadenomi ispoljavaju često stabilost ili spor rast. (Melmed S, 2006) Mogući mehanizmi kojima se objašnjava stacionarnost veličine većine mikroadenoma uključuju – apoptozu, izostanak indukcije vaskularne strome i prelazak ćelija u stanje senescencije.

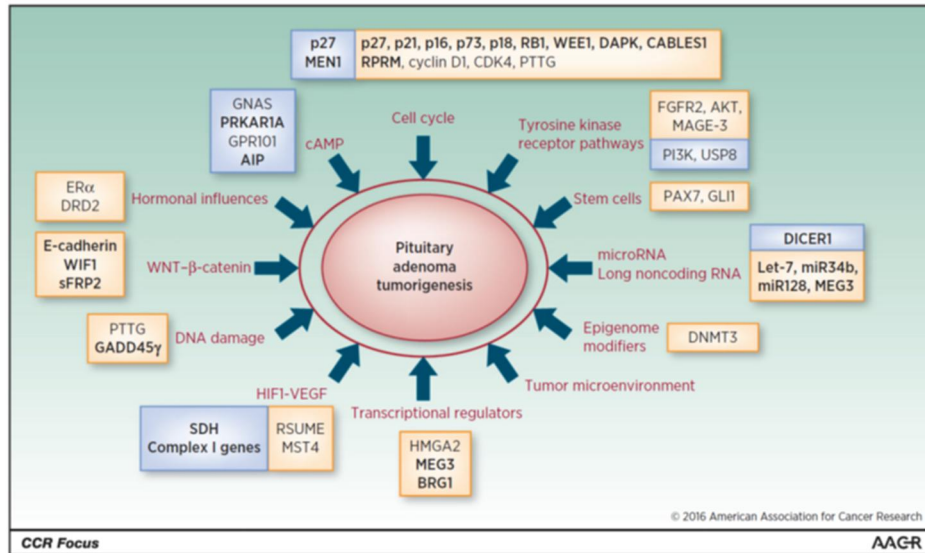
1.2 Patogeneza adenoma hipofize

Pitanje patogeneze adenoma hipofize (AH) još uvek nije u potpunosti rasvetljeno. Preovladava mišljenje da je nastanak AH posledica intrinzičkih defekata na nivou hipofize uzrokovanih naslednim ili stečenim genetskim ili epigenetskim promenama, koje predstavljaju inicijalni korak. Druge genetske alteracije, faktori rasta ili sredinski faktori doprinose narednim – promotivnim koracima. (Aflorei ED *et al*, 2014) (Lim CT *et al*, 2018) Razmatra se nezavisna ili udružena uloga brojnih onkogeno (*GNAS*, *H-ras* i drugih) i tumor-supresorskih gena (*GADD45-gama*, *MEG3*, *Rb* gena i drugih). (Aflorei ED *et al*, 2014) Brojni i raznovrsni podaci o pojačanoj ili smanjenoj ekspresiji određenih faktora rasta ili onkogeno u AH, ne znače nužno uzročnu povezanost sa nastankom AH. Mnogi od ovih faktora su indukovani tek nakon ćelijske transformacije. Moguće je da se radi o epifenomenu a ne o etiološkim faktorima. Kontroverzno je pitanje uticaja industrijske kontaminacije spoljne sredine kao faktora nastanka ili promocije AH.

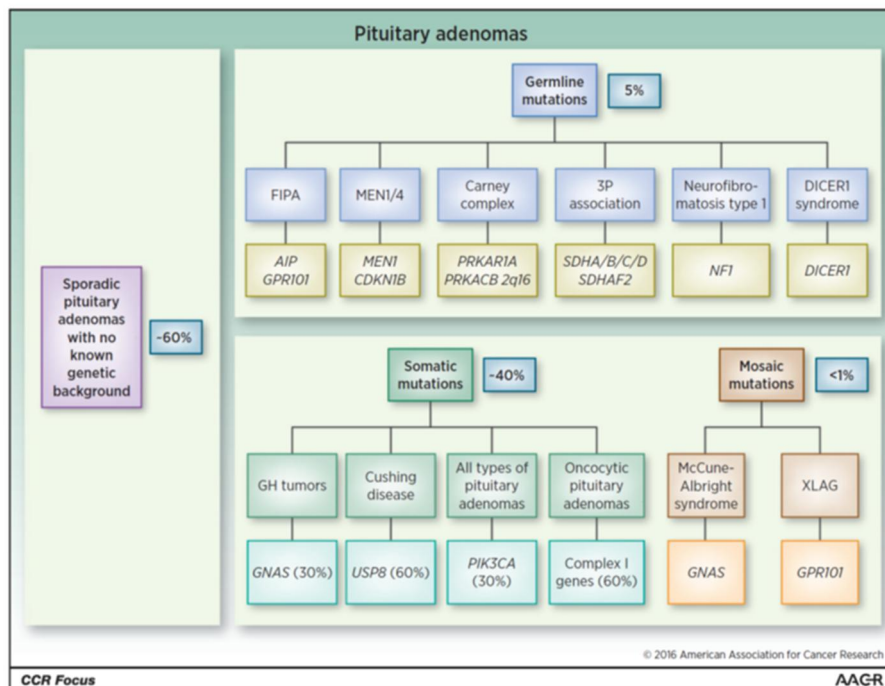
Visoko su preovlađujući AH koji nastaju sporadično, bez poznate predisponirajuće mutacije i oni čine 60 do 95%. Genetski uzrokovani AH javljaju se izolovano – kao familijarni izolovani tumori hipofize - FIPA ili u sklopu multitumorskih sindroma uzrokovanih germinativnim ili mozaičnim mutacijama. U sindrome u okviru kojih se javljaju AH ubrajaju se: sindrom MEN1 (mutacija *MEN1* gena), MEN4 (mutacija *CDKN1B* gena), Karnejev kompleks (mutacija *PRKARIA* ili *PRAKCB* gena), MekKjun Olbrajt sindrom (stečena mutacija *GNAS* gena), Feohocitom-paragangliom-adenom hipofize (3PA) sindrom (mutacije *SDHA*, *SDHB*, *SDHC*, *SDHD* ili *MAX* gena) i *DICER1* sindrom (mutacija *DICER1* gena). (Pepe S, *et al* 2019)

Opisano je nekoliko mogućih mehanizama patogeneze AH koji obuhvataju poremećaj regulacije ćelijskog ciklusa ili poremećaje na nivou signalnih faktora rasta – većinom verovatno uzrokovanih epigenetskim promenama kao i promene intrahipofizne mikrosredine (parakrinih

faktora rasta) i poremećen hormonski milje. Somatske, a posebno germinativne mutacije ređe mogu biti uzrok AH. Inaktivirajuća somatska *GNAS* mutacija nalazi se kod 10-50% somatotropinoma). Somatske mutacije *USP8* gena koje dovode do inaktivacije EGF puta nalaze se kod 20-60% kortikotropinoma. (Peverelli *et al.* 2014) (Ballmann *et al.* 2018). (Caimari F, *et al* 2016)



Slika 1.2: Mogući patogenetski mehanizmi uključeni u nastanak adenoma hipofize (Preuzeto iz Caimari F *et al.*, 2016)



Slika 1.3: Germinativne, somatske i mozaične mutacije identifikovane u familijalnim ili sporadičnim adenomima hipofize. (Preuzeto iz Caimari F *et al.*, 2016)

Klasična paradigma o kancerskim matičnim ćelijama kao modelu tumorigeneze, možda se može u nekoj meri primeniti i na tumore hipofize. Onkogeno transformisana matična ćelija dovodi do klonalnog razvoja tumora. Poremećaj kontrole ćelijskog ciklusa je čest u AH a uključuje aberantnu ekspresiju gena: *PTTG* (pituitary tumor transforming gene), *RB*, *CDKN1A*, *CDKN2A* i *Ciklina A1, B1, B2, E1 i D1*; (Alorei ED *et al*, 2014) Najčešće ispitivani onkogeni koji se često sreću u neendokrinim neoplazijama (uključujući *ras*, *c-myc*, *c-myb* i *c-fos*) nisu tipično eksprimirani u većini AH i nisu uključeni u patogenezu. Mogu biti, kao u slučaju aktivacije *ras* ili *p53* povezani sa većom lokalnom invazivnošću ili agresivnošću tumora ili sa pojavom metastaza. (Melmed S, 2003) Podtipovi AH pokazuju razlike u ispoljavanju činilaca tumorigeneze. Somatotropinomi i prolaktinomi pokazuju povišenu ekspresiju *PTTG* koja pokreće intranuklearnu ekspresiju *p21*. Onkogenima indukovana senescencija je inicijalna barijera u kancerogenezi i smatra se mogućim objašnjenjem prevalentne biološke dobroćudnosti adenoma hipofize. Markeri ćelijske senescencije (kao što je aktivnost beta galaktozidaze), posebno su izraženi kod somatotropinoma, a slabo izraženi kod kortikotropinoma što može biti objašnjenje njihove veće sklonosti ka biološkoj agresivnosti. (Chesnokova V *et al*, 2010)

Po mnogim mišljenjima razvoju AH prethodi hipofizna hiperplazija. Hiperplazija predstavlja kontrolisanu ćelijsku proliferaciju uzrokovanu fiziološkim ili patološkim stimulusom ali koja prestaje kada se stimulacija obustavi. Klinički se hiperplazija ponekad može ispoljavati isto kao adenom (na primer kod pacijenata sa akromegalijom ili Kušingovom bolešću). Na patohistološkom planu, u hiperplaziji je očuvana acinarna arhitektonika hipofize sa retikulinskom mrežom, dok se adenomi karakterišu potpuno narušenom mrežom retikulinskih vlakana. (Asa S *et al*, 2008)

U spektru promena koje vode od reverzibilne hiperplazije do mikroadenoma i konačno do makroadenoma, ćelije hipofize podležu proliferativnim i sekretornim promenama koje su posledica intrinzičkih i ekstrinzičkih signala. Kaskada signala koji promovišu rast ili onkogenih pogodaka može da revertira rano, kao što se zapaža u reverzibilnoj hiperplaziji hipofize (na primer u trudnoći ili hipofunkciji ciljnih žlezda). Faktori koji vode u porast autonomije rasta ćelija hipofize, sa izbegavanjem apoptoze i nekontrolisanim replikativnim potencijalom, potencirani su promenama u aktivnosti hormona, faktora rasta ili receptora. (Melmed S, 2003) Neki od faktora rasta za koje je pokazano da uzrokuju hiperplaziju hipofize, sa ili bez dalje progresije u razvoj adenoma su: FGF-b, HST, TGF-a, TGF-b i NGF. (Melmed S, 2003)

1.3 AIP gen

Naučno inteteresovanje za prirodu i funkciju *AIP* gena (Aryl hydrocarbon receptor-interacting protein - protein koji interreaguje sa aril-hidrokarbon receptorom) usledilo je zbog otkrića da su inaktivacione mutacije *AIP* gena povezane sa nastankom adenoma hipofize (AH) (Aflorei ED *et al*, 2014) (Lim CT *et al*, 2018) I u familijalnim i u sporadičnim AH sa *AIP* mutacijama radi se o germinativnim mutacijama, dok somatske mutacije nisu do sada identifikovane.

Humani *AIP* gen je lociran na dugom q kraku hromozoma 11q13.3 i obuhvata približno 8,07kb, sadrži 6 egzona i kodira iRNK transkript dužine 1250bp bez poznatih varijacija u izrezivanju introna. (Trivelin G *et al*, 2011) (Beckers A *et al*, 2013) Označavan je ranije i kao *ARA9* (aryl hydrocarbon-receptor associated protein 9) ili *XAP2* (hepatitis B virus X-associated protein). Ubikvitaro je eksprimiran i u razvojnim i u adultnim stadijumima u različitim životinjskim vrstama i kod ljudi. Smatra se da ima ulogu tumor-supresornog gena. Inaktivacione *AIP* mutacije dovode do AH u 30%, najčešće somatotropinoma ili prolaktinoma. (Vierimaa O *et al*, 2006), (Leontiou CA *et al*, 2008), (Trivellin G *et al*, 2011) (Lloyd C *et al*, 2014) *AIP* mutacije su nađene kod 20% pacijenata sa izolovanim familijalnim adenomima hipofize (FIPA) i kod 20% pacijenata sa sporadičnim AH nastalim u detinjstvu. (Igreja S *et al*, 2010) (Beckers A, *et al*. 2013) (Hernández-Ramírez LC *et al*, 2015). Najčešće se radi o invazivnim makroadenomima, rezistentnim na medikamentnu terapiju, naročito na analoge somatostatina (SSA) uprkos nepromenjenoj ekspresiji somatostatinskih receptora. (Viermaa O, *et al* 2006) (Pepe S *et al*, 2019). Apopleksija AH je česta kod pacijenata sa *AIP* mutacijom (8–10%) i može predstavljati i prezentujući znak. (Pepe S *et al*, 2019)

Velika većina (80%) AH sa *AIP* mutacijom su somatotropinomi zatim mešani HR-PRL AH i ređe prolaktinomi, dok su nefunkcijski AH ređi od 10%, mada su mnogi od njih imunohistohemijski pozitivni za HR ili PRL. (Stiles C *et al*, 2011). Otkriveno je preko 100 različitih mutacija u *AIP* genu uključujući nonsense, missense, frameshift, splicing i promoter mutacije, delecije, insercije i segmentne duplikacije. (Daly *et al* 2010) (Hernandez-Ramirez LC *et al*. 2015) Oko 70% ovih mutacija dovodi do gubitka C-terminalnog segmenta *AIP* (Hernandez-Ramirez LC *et al*. 2015). *AIP* mutacije u većini slučajeva imaju za posledicu prevarno skraćenje kodirajuće sekvence (*nonsense* i *frameshift* mutacije), ili nastanak visoko nestabilnih proteina skraćenog poluživota (*missense* mutacije ili segmente duplikacije) (Pepe S *et al*, 2019)

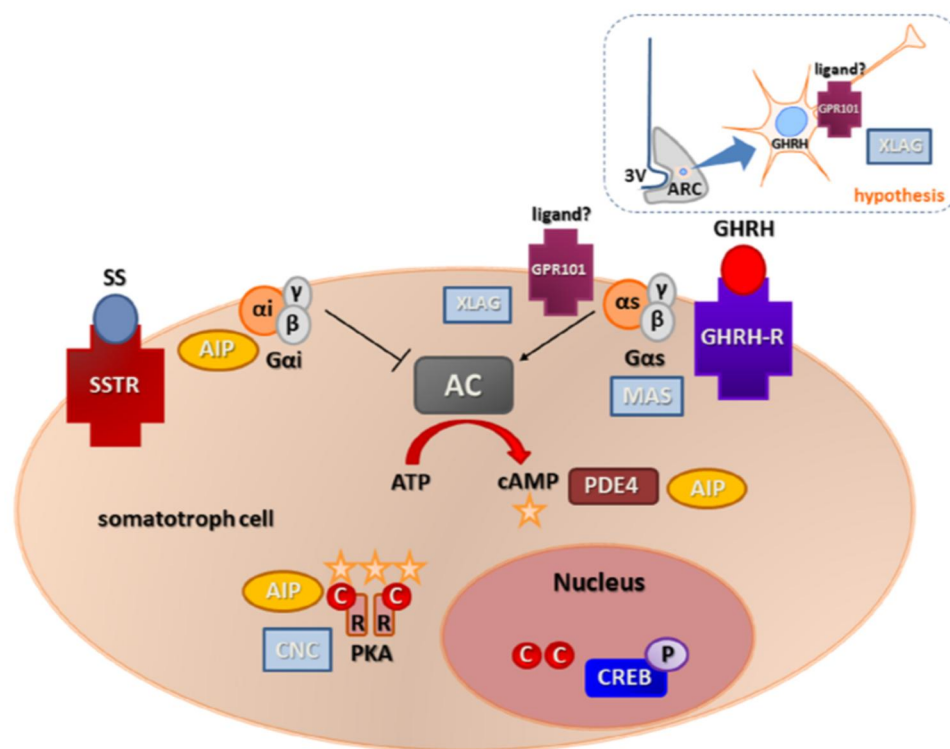
Uprkos ubikvitarnoj ekspresiji *AIP*, ni jedna druga manifestacija osim AH nije konzistentno prisutna kod pacijenata sa *AIP* mutacijama. Mehanizmi koji leže u osnovi hipofizno specifičnog tumorigenetskog efekta *AIP* mutacije nisu u potpunosti rasvetljeni, ali se smatra da uključuju više različitih puteva, a da za osnovu imaju gubitak tumor supresorne uloge *AIP* gena.

U tumačenju tumorigenetskog mehanizma *AIP* uloga se pripisuje poremećaju regulacije cAMP puta. Adenilat ciklaza (AC), aktivirana je u fiziološkim uslovima preko G proteina nakon vezivanja GHRH za svoj receptor. Povećano stvaranje cAMP dovodi do odvajanja regulatorne subjedinice (R) od katalitičke subjedinice (C) protein kinaze A (PKA) koja prelazi u jedro i fosforiliše svoje mete uključujući CREB (cAMP response element binding protein) koji kada je fosforilisan vezuje se za promotor PIT1 što ima za rezultat proliferaciju somatotrofa. Gubitak funkcije *AIP* (uzrokovano na primer inaktivirajućom mutacijom *AIP* gena) dovodi do povećanja stvaranja cAMP – smanjenom ekspresijom inhibitornog *Gai-2*, interakcijom sa fosfodiesterazom tip 4 (PDE4) ili direktno sa elementima PKA. Deficijencija *AIP* preko defekta u inhibitornoj funkciji alfa subjedinice G proteina dovodi do povećanja nivoa cAMP (Tuominen I *et al*, 2015). Više izvora ukazuje na vezu između *AIP* i puta ciklični AMP (cAMP) zavisne proteinske kinaze A (PKA) koja ima važnu ulogu u regulaciji i proliferaciji somatotrofa. Vezivanje GHRH za svoj receptor na somatotrofima aktivira G-protein, što dovodi do povećanja nivoa cAMP i aktivacije PKA. Inaktivacija *AIP* dovodi na eksperimentalnim GH3 ćelijama (mamosomatotropinoma pacova) do povećanog stvaranja cAMP. Tačni mehanizmi koji povezuju *AIP* i cAMP-zavisnu PKA nisu u potpunosti poznati. U ljudskim AH kod pacijenata sa *AIP* mutacijom ekspresija G-inhibitornog proteina (*Gai-2*) je snižena u odnosu na pacijente bez *AIP* mutacije. Sa druge strane, pokazana je i interakcija *AIP* sa katalitičkom (PRKACA) i regulatornom (PRKAR1A) subjedinicom PKA. *AIP* takođe interreaguje sa članovima porodice fosfodiesteraza tip 4 (kao što je PDE4A5) koji imaju ulogu u razlaganju cAMP značajnu u funkciji somatotrofa. (Trivellin G *et al*, 2011) Kod *AIP* mutantnih AH pokazana je značajna redukcija ovih faktora, što može doprinositi pojačanom delovanju cAMP. (Pepe S *et al*, 2019) AH sa *AIP* mutacijom su često invazivni i klinički agresivni, što nije slučaj sa drugim monogeniski predisponiranim AH čiji nastanak uključuje aktivaciju puta cAMP-PKA (kao što je slučaj u Karnej kompleksu ili Mek Kjun Olbrajt sindromu). Ovo ukazuje na drugačije ili dodatne mehanizme dejstva *AIP*. (Pepe S *et al*, 2019)

Smatra se da *AIP* ima ključnu ulogu u odgovoru pacijenata sa akromegalijom na somatostatinske analoge (SSA). Većina pacijenata sa akromegalijom sa germinativnim *AIP* mutacijama su potpuno ili delimično rezistentni na SSA. (Kasuki L *et al*, 2012) Posrednikom u

ovom fenomenu smatra se ZAC1 (zinc finger 1) protein koji je moguća veza AIP i somatostatinskih SSTR2 receptora. (Caimari F *et al* , 2016) Niska tumorska ekspresija *AIP* je pokazana kao bolji prediktor invazivnosti somatotropinoma nego Ki67 ili p53. (Kasuki J, *et al* 2011)(Chahal HS, *et al* 2012)(Gadelha MR, *et al* 2013)

AIP ispoljava interakciju sa proteinima uključenim u organizaciju citoskeleta kao što su TUBB, TUBB2A i drugi članovi porodice tubulina. (Hernandez-Ramirez LC *et al.* 2018). Moguće je da *AIP* mutacije doprinose većoj agresivnosti AH uticajem na citoskeletnu organizaciju.



Slika 1.4: Uloga *AIP* mutacija u cAMP putu u patogenezi somatotropinoma (preuzeto iz Pepe S, 2018)

AH se kod nosilaca *AIP* mutacije tipično javljaju sa niskom penetrantnošću – procenjenom na 15–30% (Vierimaa O *et al.* 2006, Chahal HS *et al.* 2011). Ovo može ukazivati da neki faktori sredine ili dodatni genetski faktori možda doprinose i određuju rizik za razvoj AH kod osoba sa *AIP* mutacijom. (Pepe S *et al.*, 2019) Kao jedan od mogućih faktora, proučavan je uticaj štetnih faktora iz spoljne sredine. Posredstvom AhR – *AIP* puta oni možda mogu uticati na patogenezu i biološku prirodu AH.

Prvi poznati partnerski molekul *AIP* proteina je nuklearni receptor AhR (aril hidrokarbon receptor) najpoznatiji po svojoj ulozi u vezivanju toksičnih supstanci iz spoljne

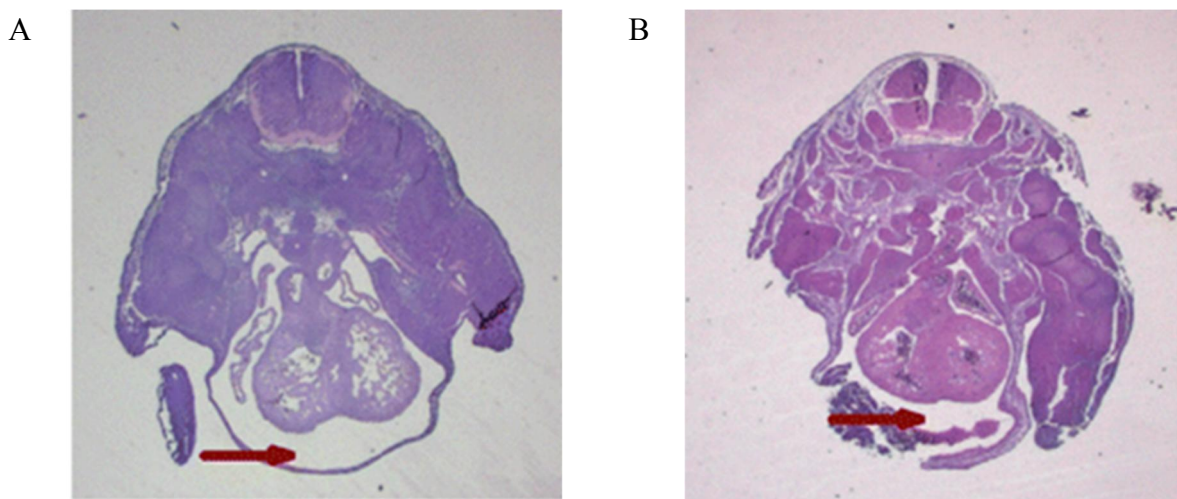
sredine. Uloga AhR-AIP puta je proučavana *in vitro* na hipofiznim ćelijama i na pacijentima sa akromegalijom (Pesatori AC *et al*, 2008)(Cannavo S *et al*, 2010)(Cannavo S *et al*, 2014)(Cannavo S *et al*, 2016)(Cannavo S, *et al* 2017)(Tapella L *et al*, 2017)(Fortunati L *et al*, 2017). Nekoliko *in vitro* studija pokazalo je vezu između izlaganja GH3 ćelija toksinima koji deluju preko AhR i porasta proliferacije (Tapella L *et al*, 2017) ili sekrecije HR (Fortunati L, *et al* 2017). Na epidemiološkom planu sugerisana je veza između izloženosti aerozagađenju i povećane incidence javljanja somatotropinoma. (Cannavo S, *et al* 2010) Ipak, nije dokazana direktna ovakva veza proučavanjem regiona pogođenog industrijskom havarijom sa izlaganjem stanovništva dioksinu. (Pesatori AC, *et al* 2008). Modifikujući efekat *AhR* i *AIP* polimorfizama udružen sa izloženošću aerozagađenju kod pacijenata sa akromegalijom se dovodio u vezu sa veličinom adenoma, biološkom agresivnošću i rezistencijom na analoge somatostatina. (Cannavo S, *et al* 2016). AhR je glavni partner AIP, ali tačan odnos AIP i AhR je i dalje predmet kontroverze. Neki autori su pokazali uticaj AIP na povećanje transkripcione aktivnosti AhR, dok su drugi pokazali suprotno (Kazalaukas A, *et al* 2000). Postoje dokazi da AIP sprečava ubikvitinaciju i proteozomalnu degradaciju AhR (Kazlauskas A *et al* 2000) (Trivellin *et al* 2011). Interesantno je da sniženje nivoa AIP proteina u *AIP* mutantnim fibroblastima ne dovodi do efekta na ekspresiju AhR. (Lecoq AL *et al* 2016)

2. ISPITIVANJE ULOGE *AIP* GENA U PATOGENEZI ADENOMA HIPOFIZE NA ŽIVOTINJSKOM MODELU

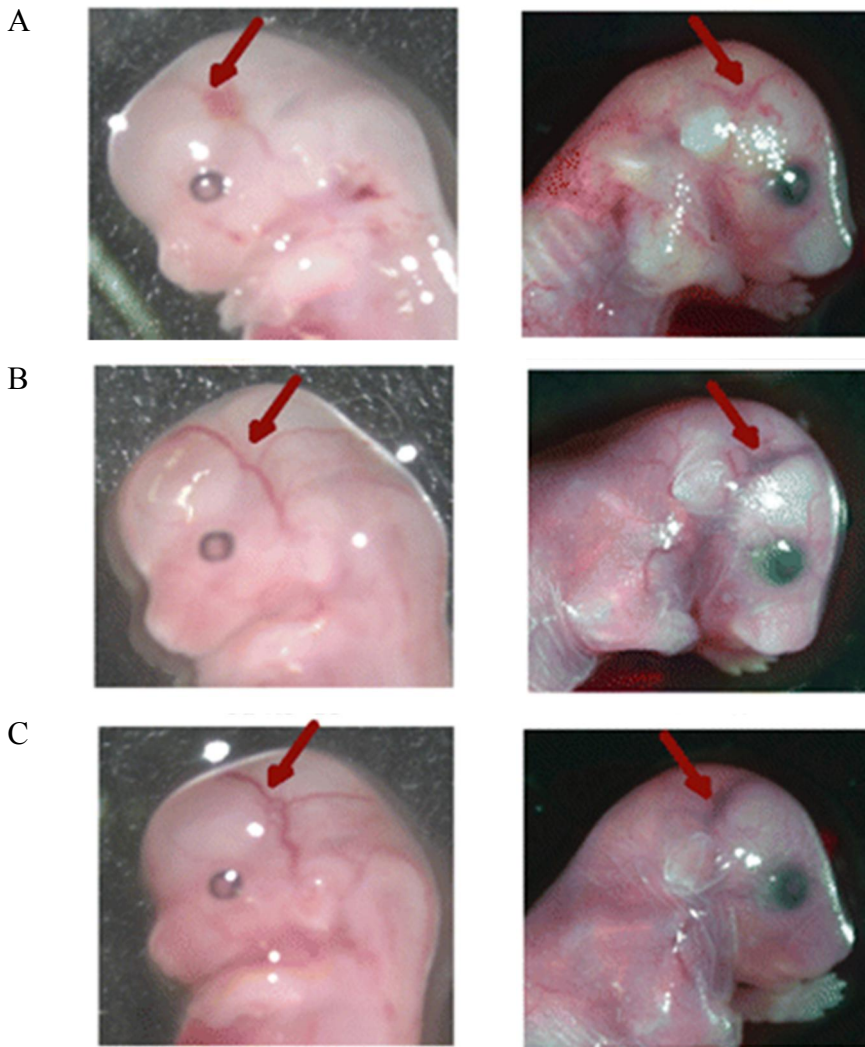
2.1 Eksperimentalni životinjski modeli inaktivacije *AIP* gena

Eksperimentalne životinje deficitne za *AIP* gen ispoljavaju ranu embrionalnu smrtnost usled kardiovaskularnih malformacija (miševi) ili smrtnost u larvalnom stadijumu (*Drosophila*). (Aforei ED, *et al.* 2018) (Lin BC *et al* 2007) Osim strukturne sličnosti kod različitih vrsta, evolucionu očuvanost *AIP* gena potvrđuju i eksperimenti na modelu mušice (*Drosophila melanogaster*). Delecija endogenog *AIP* ortologa kod Drozofila bila je smrtonosna za jedinku, ali je nedostatak uspešno mogao da se kompenzuje prenošenjem kopije humanog *AIP* gena. (Aforei ED, *et al* 2018)

U ranijim istraživanjima uloge *AIP* gena u patogenezi adenoma hipofize (AH) na životinjskim modelima, pokazano je da su miševi heterozigotni za *AIP* mutaciju rano razvijali somatotropne AH, a miševi homozigotni za *AIP* mutaciju nisu preživljavali embrionalni stadijum. (Raitila A, *et al* 2010) (Lin BC, *et al* 2007) (Raitila A *et al* 2010) (Gillam MP *et al* 2017) Osim efekata na tumorigenezu na nivou hipofize na eksperimentalnim miševima nakon konstitutivne inaktivacije *AIP* gena zapažene su i anomalije na nivou perikarda (Slika 2.1) i kranijalnih krvnih sudova (Slika 2.2). (Lin BC, *et al* 2007)



Slika 2.1 Perikardni edem kod embriona miša (embrionalne starosti 14,5-15 dana) nakon konstitutivne homozigotne *AIP* inaktivacije (A) u poređenju sa neizmenjenom jedinkom (B) iz istog legla. Strelica označava perikardni zid. (Adaptirano iz: Lin BC, *et al.* J Biol Chem 2007)



Slika 2.2 Kompromitovana kranijalna vaskularizacija kod embriona miša nakon konstitutivne homozigotne *AIP* inaktivacije (A) u poređenju sa heterozigotnom inaktivacijom *AIP* (B) i neizmenjenom jedinkom (C) iz istog legla, embrionalne starosti 14,5-15 dana - levo i 18,5-19 dana - desno. Strelica označava kranijalne krvne sudove čiji kalibar se razlikuje. (Adaprirano iz: Lin BC, et al. J Biol Chem 2007)

Eksperimentalni miševi sa heterozigotnom *AIP* mutacijom preživljavaju i razvijaju AH sa punom penetrantnošću do uzrasta 15 meseci (odgovara ljudskoj starosti od 51 godina), pretežno somatotropinome (Raitila et al.2010). Na istom modelu je uočena i pojava hiperplazije hipofize (u miševa starih 3 meseca i 12 meseci) bez pojave AH (Lecoq AL *et al* 2016b).

Tumorigenetski efekat je pokazan i na mišijem modelu sa specifičnom inaktivacijom *AIP* samo u somatotrofima. (Gillam MP *et al* 2017) Životinje su počevši od 12 nedelja bile veće (duže i teže), sa krupnijim visceralnim organima (srce, jetra, bubrezi). U uzrastu od 18 nedelja pokazan je povišen HR i IGF-1. AH su bili vidljivi na NMR u 80% u uzrastu od 20 nedelja (odgovara oko 30 godina kod ljudi) ali je histološki otkriveno da je hipofizna hiperplazija (počevši od 18 nedelja) prethodila razvoju somatotropinoma. (Gillam MP *et al* 2017) Uočena

je smanjena ekspresija ciklin zavisnog kinaznog inhibitora p27 u tkivima adenoma, što ukazuje na poremećaj regulacije ćelijskog ciklusa. Isti mehanizam često je uočen u patogenezi sporadičnih humanih AH.

Rekapitulacija humanog fenotipa *AIP* zavisnih tumora hipofize eksperimentalnim modelom glodara nije potpuna. Rezultati istraživanja na miševima nalaze tumore hipofize pri inaktivaciji *AIP* gena kod odraslih jedinki i sa visokom penetrantnošću. Nasuprot ovome kod ljudi se većina somatotropinoma povezanih sa *AIP* mutacijama javlja u detinjstvu ili adolescenciji, a karakteristična je niska penetrantnost od 15-30%.

2.2 Model *Danio rerio* – ribe zebrice

Zebrica (*Danio rerio*), iz porodice *Cyprinidae*, koja pripada teleostima, popularna je akvarijumska ribica sa prirodnim staništima u tropskim slatkim vodama Indije i Burme. Životni vek zebrice je oko 3 godine a reproduktivno su sposobne 1,5 godinu. (McGonnell IM *et al* 2006)

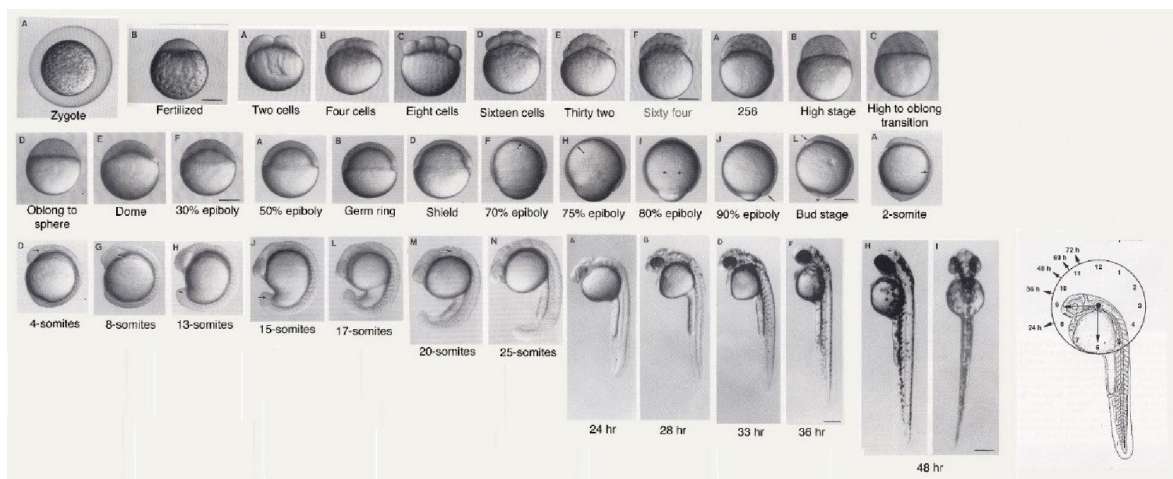


Slika 2.3 Odrasle jedinke *Danio rerio* – zebrice sorte Tupfel Long Fin. Mužjak (gore) i ženka (dole); (Preuzeto sa - (<http://cores.utah.edu/czar-zebrafish/>))

Zebrice su inicijalno razvijene kao eksperimentalni model na polju komparativne biologije kičmenjaka. Pružaju i brojne prednosti kao eksperimentalni međustadijum između *in vitro* eksperimenata na kulturama ćelija i tkiva ili *in vivo* na beskičnjacima (na primer *Drosophila*) sa jedne strane i *in vivo* eksperimenata na sisarima (miševima i pacovima) sa druge

strane. Ovakav pristup omogućava smanjenje troškova i eliminaciju grešaka pre prelaska na napredniji istraživački model.

Iako je tača razdvajanja evolutivnih puteva razvoja riba i sisara pre 450 milona godina, oni dele mnoge zajedničke razvojne i genetske obrasce. *Danio rerio* je dobro utvrđen kičmenjački model za proučavanje promena relevantnih za sisare i ljude koji ima prednosti nad drugim životinjskim eksperimentalnim modelima. Odrasle jedinke su male (2-4cm) i jednostavne za laboratorijsko gajenje na manjem prostoru i srazmerno jeftinije. Visoko su plodne i u optimalnim uslovima ishrane i temperature ženka leže oko 100-500 jaja nedeljno koja se sinhrono razvijaju. Embrioni se razvijaju u spoljnoj sredini i providni su, što sve olakšava direktno promatranje strukturnih promena i organogeneze u realnom vremenu – *in vivo imaging*. Međugeneracijsko vreme je 2-4 meseca, ali rane faze razvoja su brze i već 24h nakon oplodjenja većina tkiva i ranih formi organa je formirano. Sinhroni razvoj velikog broja embriona smanjuje varijabilnost pri primeni istraživačkih tehnika. Genom zebriice je srazmerno mali (oko 42000 gena) i dobro proučen, sa raspoloživim brojnim mutantnim linijama. (McGonnell IM, *et al* 2006)



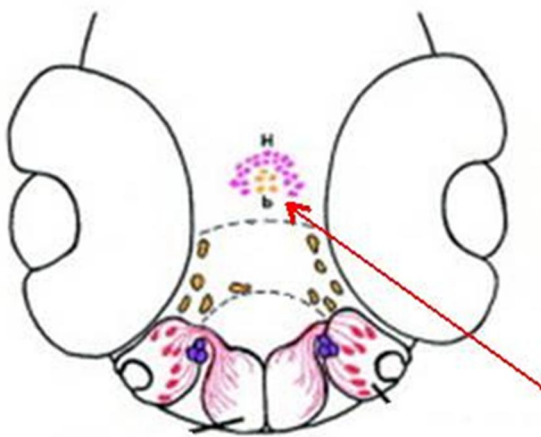
Slika 2.4: Faze razvoja embriona zebriice, od zigota do 72h nakon oplodnje. (Adaptirano iz Kimmel et al, 1995)

Sve ovo čini zebriice atraktivnim animalnim modelom za proučavanje različitih patoloških stanja kod ljudi, uključujući onkološka istraživanja. Pokazan je visok stepen histološke sličnosti između kancera koji se razvijaju kod zebriica i kod ljudi, a mnogi aspekti kancerogeneze su zajednički. Brojne neoplazije mogu se indukovati i kod zebriica izlaganjem kancerogenim hemikalijama, što je kod ovog životinjskog modela posebno olakšano time što

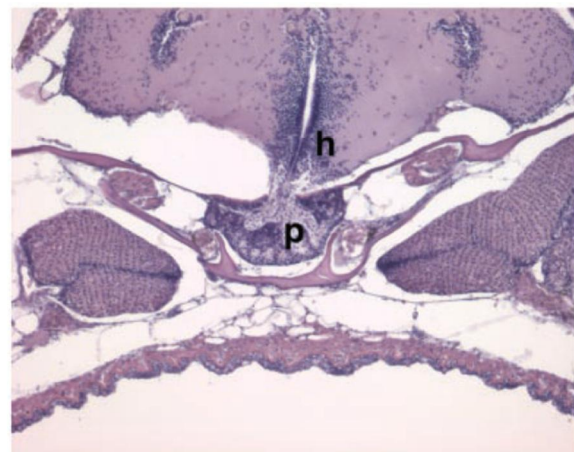
žive u vodi i jednostavno i efikasno se mogu izložiti kancerogenim rastvorima tokom dužeg perioda u različiti fazama razvoja. (Vitale G, *et al* 2014)

Dva osnovna pristupa ispitivanju genetske povezanosti sa kancerogeneom na životinjskim modelima su genetski skrining “u napred” (*forward*) i genetski skrining “u nazad” (*reverse*). Prvi podrazumeva analizu nastalih genetskih promena kod životinja kod kojih je eksperimentalno uzrokovana kancerogeneza (hemijskim mutagenima, zračenjem ili drugim metodama). Dok drugi podrazumeva praćenje fenotipskih ispoljavanja kod potomstva životinja sa eksperimentalno modifikovanim genima. Za oba pristupa su zebriце pogodan model sa dosta prednosti. (Vitale G, *et al* 2014) (Lohr H, *et al* 2011) S obzirom na ektotermnu prirodu, moguće je postići vremenski ciljanu aktivaciju određenih gena, primenom hsp70 promotera (protein toplotnog šoka) i izlaganja povišenoj temperaturi vode u odabranom trenutku. (Lohr H, *et al* 2011)

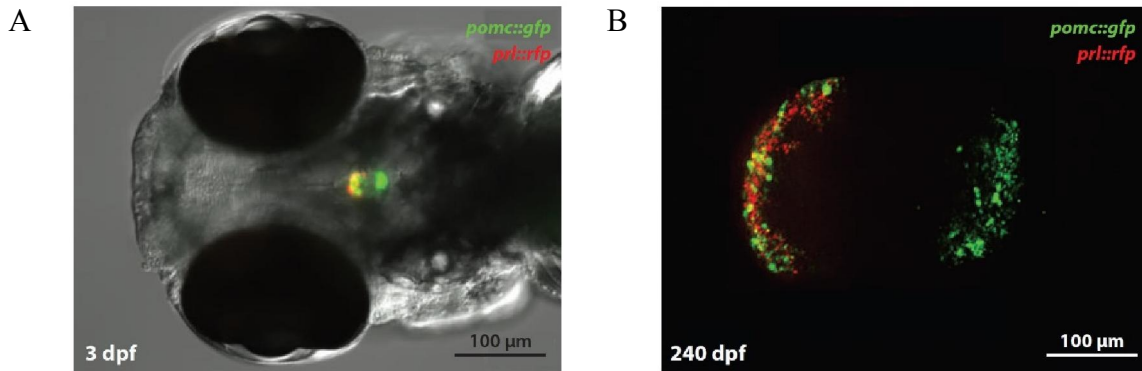
Zebriće su se pokazale kao anatomske i funkcionalno adekvatan analogni model za izučavanje ljudskog endokrinog sistema. (Lohr H, *et al* 2011) Embrionalni razvoj je veoma brz i hipofiza je potpuno formirana i funkcionalna 5 dana nakon oplodnje. Većina činilaca, puteva i povratnih sprega endokrinog sistema je visoko podudarna između zebrića i ljudi. Genetski analozi koji odgovaraju humanim za kodiranje neurohormona su identifikovani kod zebrića. (Bourque C, *et al* 2011)(Lohr H, *et al* 2011) Model zebrića našao je u istraživanjima endokrinog sistema do sada primenu u proučavanju razvoja endokrinih žlezda i tumorigeneze, obuhvatajući i studije neuroendokrinih tumora, uključujući sindrome MEN1, MEN2, VHL, neurofibromatoza tip1. (Vitale G, *et al* 2014)



Slika 2.5 *Danio rerio* – skica glave; strelica označava poziciju hipofize. (Adaptirano iz: Whitlock KE, 2005)

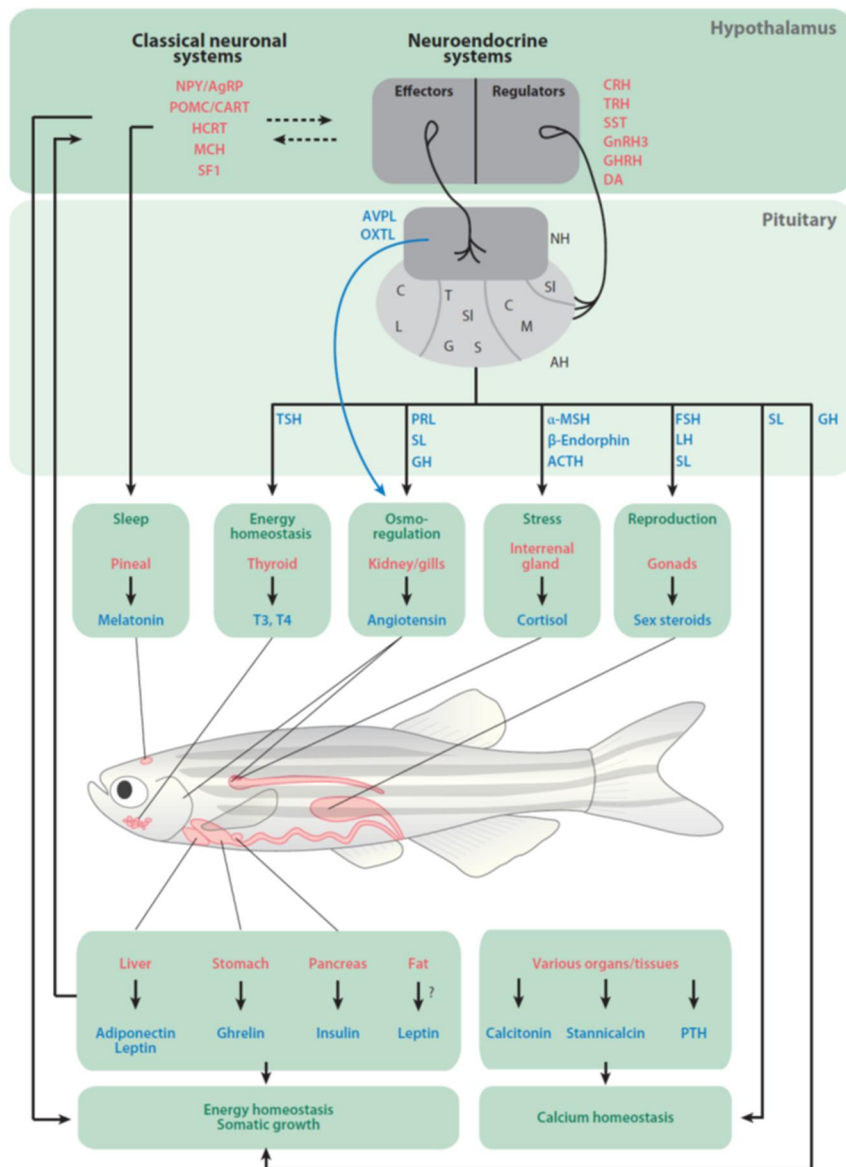


Slika 2.6 Hematoksilinsko bojenje poprečnog preseka mozga odrasle zebriće. Hipofiza (p) je locirana ventralno od hipotalamusa (h). (Preuzeto iz Liu N, 2011)



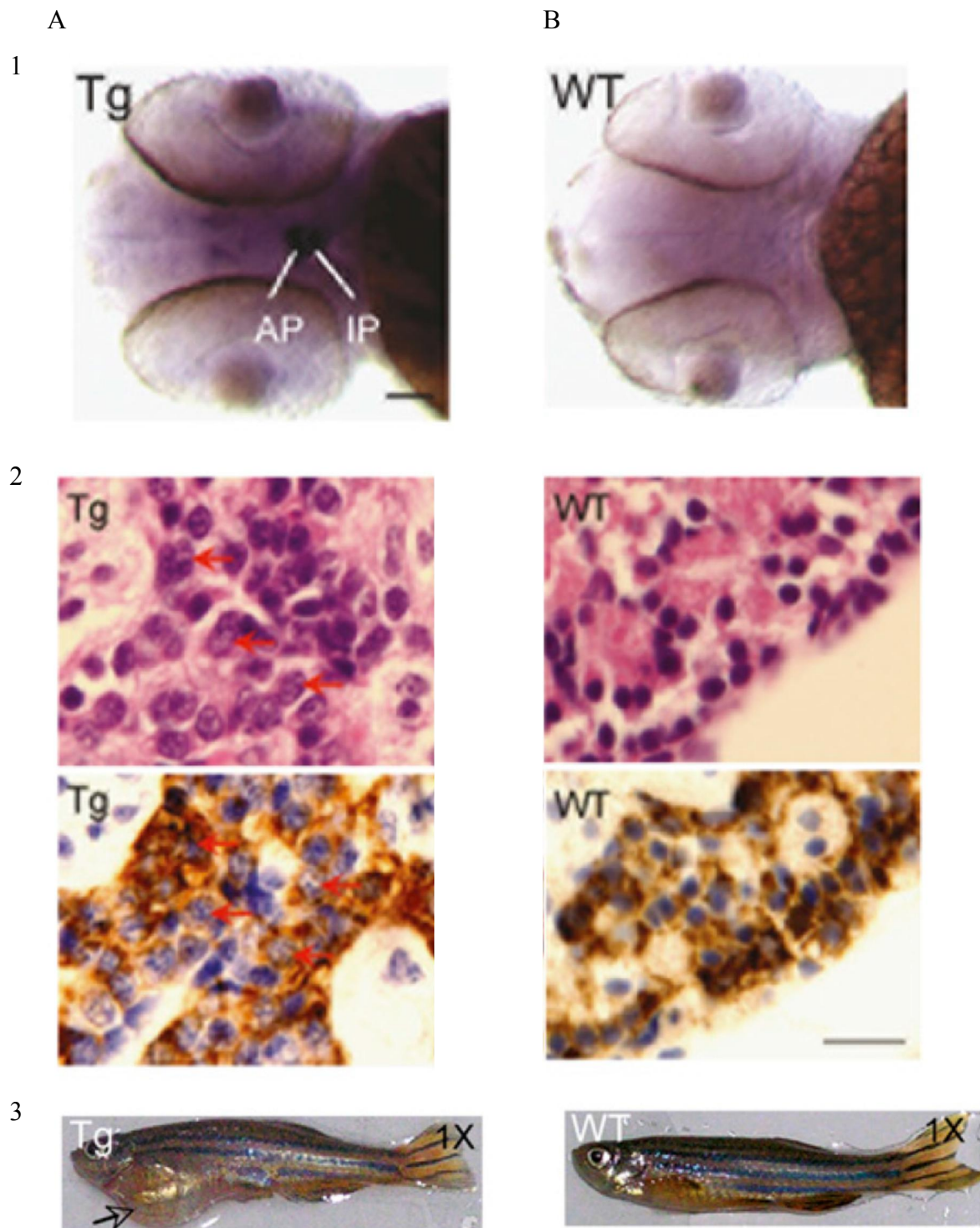
Slika 2.7: Fluorescentno obeležene PRL ćelije i POMC ćelije hipofize zebrice i POMC ćelije u hipotalamusu. 72h po oplodnji (A) i kod odrasle jedinke (B) (Preuzeto iz Lohr H et al 2011)

Unutar prvih 5 dana embrionalnog razvoja zebrice formira se postavka većine endokrinih sistema. Ekspresija gena za hipofizne hormone registruje se između 2. i 5. dana od oplodnje; za tiroksin: 4. dana; za gene uključene u sintezu steroida ekvivalentnih adrenalnim: 2. dana; a za pankreasni insulin: 1,5 dan nakon oplodnje. (Lohr H, 2011) Uz velike sličnosti endokrinog sistema i same hipofize između riba i sisara, izdvajaju se i neke osobenosti. Kao i druge ribe, zebrice pored HR i PRL sekretuju i somatolaktin (SL) koji ima ulogu u metabolizmu kalcijuma. PRL se sekretuje ali kod riba ima ulogu u osmoregulaciji. (McGonnel IM, *et al* 2006) TSH kontroliše sintezu tiroksina u folikulima lociranim uz ventralnu aortu. ACTH kao produkt POMC kontroliše sintezu kortizola u interrenalnim ćelijama. FSH i LH kontrolišu gametogenezu i sintezu polnih steroida. (McGonnel IM, *et al* 2006)



Slika 2.8: Šematski prikaz endokrinog sistema zebriica. (Preuzeto iz Lohr H et al 2011)

I u istraživanjima na polju patogeneze tumora hipofize uspešno je korišćen model zebriice. (Vitale G, *et al* 2014) Na mutantnom modelu zebriice sa povećanom ekspresijom *PTTG* (pituitary tumor transformig gene) u POMC ćelijama, zabeležen je razvoj kortikotrofnih AH sa metaboličkim posledicama analognim Kušingovoj bolesti (Liu NA *et al.* 2011) Hronična hiperkortizolemija je zabeležena tek kod odraslih jedinki ali su AH detektovani već u prvim danima embrionalnog razvoja. Zebriice sa mutacijom *Usp39* gena (ubiquitin-specific peptidase 39) razvijale su hiperplaziju hipofize. (Rios Y *et al* 2011)

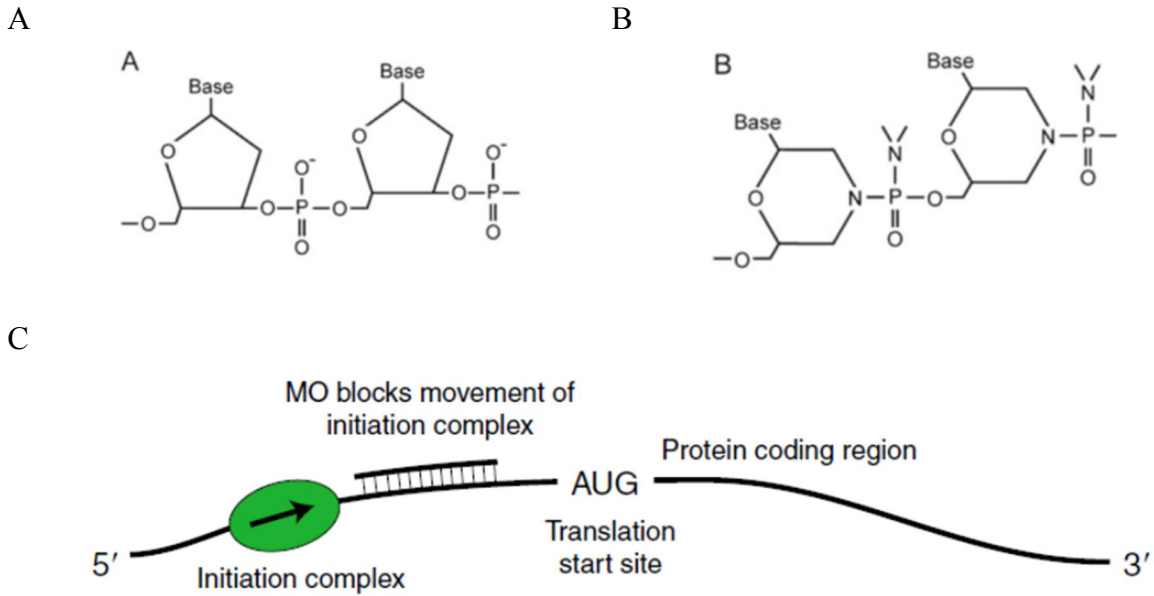


Slika 2.9: Model Kušingove bolesti kod zebrića: Odrasla zebrića (24 meseca) sa aktivirajućom *PTTG* mutacijom u POMC ćelijama – i eksperimentalno izazvanom Kušingovom bolešću (kolona A) u poređenju sa zdravom kontrolom (kolona B). 1. Hipofizna ekspresija *PTTG* kod mutančnih zebrića i kod zdravih – 72h po oplodnji. AP – adenohipofiza. 2. HE preparat hipofize (gore) i imunohistohemijsko bojenje za ACTH kod Kušingove bolesti (A) i kod zdravih (B). Streljice pokazuju ACTH ćelije sa neoplastičnom mitozom. 3. Cela jedinka. Streljica pokazuje nakupljanje perikardne tečnosti (Preuzeto iz Liu et al. 2011)

AIP gen kod zebrića nalazi se na hromozomu 1 i kodira protein čija sekvenca je veoma slična ljudskom *AIP* proteinu, naročito u segmentima ključnim za interakcije sa drugim proteinima (TPR domeni). Ekspresija *AIP* kod zebriće je zapažena u različitim fazama embrionalnog razvoja. (Aforei ED *et al*, ICE 2012)

2.3 Morfolino metoda u eksperimentalnoj genskoj inaktivaciji

Morfolino su veštački sintetisani oligonukleotidi sastavljeni od lanaca dugih 25 nukleotida koji liče na DNK ili RNK oligonukleotidne sekvence ali se od njih razlikuju po tome što sadrže N-morfolinski umesto riboznog prstena. (Slika 2.10) Morfolino sekvence zahvaljujući svojoj sličnosti podležu komplementarnom uklapanju baznih parova po modelu Votsona i Krika ali onemogućavaju smislenu translaciju iRNK ili pravilno isecanje RNK (*splicing*). Morfolino su otporniji na nukleaze i stabilniji su od RNK i DNK. Koncept dejstva morfolina je da vezivanjem za region u blizini start kodona (ATG) blokira translaciju na mestu inicijacije ili interferira sa isecanjem prekursorne iRNK što za posledicu ima smanjenje ekspresije proteina od interesa. (Slika 2.10) Odsustvo negativno naelektrisane ribozne osovine smanjuje afinitet za interakcije sa drugim ćelijskim komponentama, ali u višku morfolino može da se vezuje za druge RNK i izaziva efekte mimo željenih. (Eisen JS, *et al* 2008) Morfolino oligonukleotidi se ciljano dizajniraju za željeni gen uz izbegavanje auto-komplementarnosti i visokog sadržaja guanina. (McGonnell IM, *et al* 2006) Primenom specifičnih antisens morfolino sekvenci, moguće je ciljati odabrani genski transkript i značajno smanjiti nivo odgovarajućeg funkcionalnog proteina. Ovom metodom postiže se samo tranzitorna genska inaktivacija (*knockdown*) – steričkom blokadom transkripcione aktivnosti. Mogućnost kolateralnog efekta se smanjuje optimalnim dizajniranjem morfolino sekvence, u čemu je od velike pomoći dobro poznavanje celog genoma ispitivanog organizma (što je slučaj kod *Danio rerio*). Izazov predstavlja i precizno i reproducibilno injektiranje ekstremno malih volumena morfolino u jednoćelijskom embrionalnom stadijumu.



Slika 2.10: Struktura konvencionalnog DNK nukleotida (A) i morfolino oligonukleotida (B) sa šestočlanim morfolinskim prstenom i nejonskom fosfordiamidatnom vezom između prstenova. Šematski prikaz mehanizma dejstva morfolina. (Preuzeto iz Eisen J, 2008)

U važne aspekte primene ove metode spadaju uključivanje adekvatne kontrole (radi isključivanja mogućih kolateralnih - *off-target* efekata, na primer u blokadi efekata drugih gena pored ciljanog) i metode potvrde efikasnosti. Standardna kontrola morfolino efekta sprovodi se primenom u istoj koncentraciji kontrolne morfolino sekvence koja ne utiče na gen koji se ispituje. Najčešće se primenjuje nepodudarna sekvenca koja je slična antisense morfolino sekvenci (eksperimentalnoj) ali u 5 baznih parova odudara od nje, tako da se efekat blokade gena gubi. U cilju potvrde efikasnosti mogu se koristiti: antitela za ciljani protein, fluorescentno-obeleženi ciljani protein, PCR ili *in situ* hibridizacija. (Eisen JS, *et al* 2008) Potrebno je sprovesti dozno-zavisne eksperimente da bi se ustanovila doza pri kojoj nastaju specifične fenotipske promene a ne javljaju se toksični efekti (ispoljeni masivnom ćelijskom smrću). Raspon između ovih doze može biti mali. (Mc Gonnell IM, *et al* 2006) Pri primeni morfolino oligonukleotida ne očekuje se potpuni gubitak funkcije gena, već je verovatnija gradacija težine fenotipa. Ovo može biti prednost pri proučavanju gena čija potpuna inaktivacija vodi ranoj embrionalnoj letalnosti. (Mc Gonnell IM, *et al* 2006) *AIP* gen je takav primer. S obzirom na to da primena morfolino metode dovodi do inaktivacije genskog produkta a ne do prave genetske modifikacije jedinke, za ovako izmenjene jedinke koristi se termin “morfant”, analogno terminu “mutant” – i termin *knock-down* umesto *knock-out*. (McGonnell IM, *et al* 2006) Komparativna prednost morfolino metode je u većoj brzini stvaranja jedinki sa

inaktivacijom gena, i potencijalnoj mogućnosti istovremene inaktivacije više gena. (Lohr H, *et al* 2011)

Morfolino metoda genske inaktivacije korišćena je ranije u eksperimentima na zebricama. (Vitale G, *et al* 2014) (McGonnell IM, *et al* 2006) Nakon primene morfolino sekvenci, injektiranjem u ćeliju, njihov efekat traje nekoliko dana, tako da se mogu koristiti za proučavanje efekata gubitka funkcije gena samo u embrionalnom stadijumu. (Bill B, *et al* 2009)

3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA NA ŽIVOTINJSKOM MODELU

1. Na životinjskom modelu zebrica pokazati da je *AIP* gen eksprimiran u hipofizi.
2. Ispitati posledice inaktivacije *AIP* gena na rast i razvoj embriona zebrice.
3. Ispitati posledice inaktivacije *AIP* gena na nivou hipofize zebrice.

4. MATERIJAL I METODOLOGIJA ISTRAŽIVANJA NA ŽIVOTINJSKOM MODELU

Eksperimenti na životinjskom modelu sprovedeni su u sklopu studijskog boravka doktoranta u periodu od jula 2014. do decembra 2014. u *William Harvey Research Institute (Queen Mary University of London)* pod supervizijom komentora, prof Marte Korbonits, i u *Royal Veterinary College, University of London*, pod patronatom prof Imelde McGonnell. Svi eksperimenti sprovedni su samo na embrionima sarosti do 5 dana, u skladu sa lokalnom etičkom regulativom (*UK Animal Health Act*) i pod okriljem licence Prof McGonnell za studije na životinjama.

4.1 Eksperimentalne životinje

Eksperimentalne ribice – zebrice - *Danio rario (Tupfel Longfin)* uzgajane su u plastičnim akvarijumima sa specijalno filtriranom vodom, pri konstantnoj temperaturi od +28°C, sa stalnim 12h ritmom svetlost-tama i konstantnom ishranom. Ribice za parenje (mužjak i dve ženke) nasumično su izdvajane u 17h iz zbirnih akvarijuma u pojedinačne čija manja dubina i duplo dno, prekriveno šarenim klikerima, deluju podsticajno na parenje kod zebrica. Smatra se da parenje započinje 30minuta nakon jutarnjeg izlaganja svetlosti. Narednog jutra u 09h sakupljana su obložena jaja sa dna individualnih akvarijuma. Po izleganju embrioni su praćeni u inkubaciji tokom 5 dana. Inkubirani su u akvarijumskoj vodi u Petrijevim sudovima na konstantnoj temperaturi +27°C. Digitalnom mikroskopijom praćen je rast i razvoj. Eksperimentalne životinje su fotografisane *in vivo*, nakon odvajanja horionske opne mikropincetom i dodavanja rastvora *Tricane* za reverzibilnu sedaciju. Varijable dužine ili površine odabranih regiona od interesa (ukupna dužina, površina srednjeg mozga – merena u bočnoj projekciji, površina perikarda– merena u bočnoj projekciji, površina ribljeg mehura – merena u bočnoj projekciji, površina preseka hipofize – merena u ortogonalnoj projekciji) analizirane su uz pomoć softvera NIH ImageJ 1.48v. (<https://imagej.nih.gov/ij/download.html>)

4.2 Ekspresija AIP gena

Ekspresija *AIP* gena kod zebrica ispitivana je metodom *Whole mount in situ* hibridizacije (WISH) za *AIP*. Embrioni su sedirani pa eutanazirani. Zatim je primenjena dehidracija, depigmentacija i povećanje permeabiliteta delimičnim izlaganjem proteinazama, pre fiksiranja u formaldehidu. Hibridizacija je vršena antisense RNK probama dizajniranim za

AIP zebrice a obeleženim digoksinen uridine-5'-trifosfatom. Ekspresija *AIP* je vizuelizovana imunohistohemijski anti-digoksinen antitelima. Sense RNK probe su primenjivane na kontrolnim jedinkama.

4.3 Morfolino tehnika genske inaktivacije *AIP*

AIP morfanti (*knock down*) embrioni zebrica generisani su injektiranjem antisens morfolino oligonukleotida (MO) u embrione na jednoćelijskom stadijumu. Rasporeni morfolino oligonukleotidi (sa 5 različitih baznih parova) korišćeni su kao kontrola (kontrolni morfolino) a neinjektirani embrioni iz istog legla kao neinjektirane kontrole.

Korišćene su morfolino sekvence dizajnirane za *AIP* gen zebrice tako da se vezuju za granicu prvog introna i drugog egzona, na 3' mestu isecanja *AIP* pre-iRNK. Sintetisane su od strane kompanije *Gene Tools, LLC, Philomath, USA* prema molekularnim specifikacijama prikazanim na Slici 4.1 Dizajnirani su da sterički blokiraju adekvatno isacenje, dovodeći do abnormalnog transkripta za koji se očekuje da podleže razlaganju.

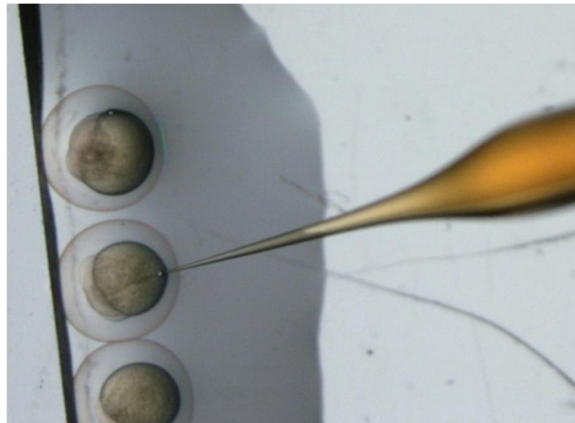
Name/Quantity	Sequence/Oligo Options/Production #	MW	Molar Abs.	Weight	OD	Holdback
MoZF AIPas 300 nmol	ACTTCACCTTTTCAGGAGAAAAAGGA 07-17Oct11A	8485	270550	2.55	81.16	300 nmol
ZF AIP Mo ctr 300 nmol	ACATGACGTTTCAGCACAAAAAGGA 08-17Oct11A	8494	273380	2.55	82.01	300 nmol

Slika 4.1: Nukleotidne karakteristike korišćenih morfolino sekvenci (*Gene Tools, LLC, Philomath, USA*)

Po rastvaranju morfolina i kontrolnih morfolina dodavan je pigmentni trejser radi praćenja konzistentnosti volumena i mesta aplikacije. Optimalna injekciona doza MO ispitivana je titracionim smanjenjem uz analizu ranog embionalnog letaliteta među tretiranim embrionima. Uspešnost inaktivacije *AIP* - *knock down* efekta procenjivana je analizom Whole mount *in situ* hibridizacije za *AIP* (na *AIP* morfantima i kontrolama: kontrolni MO i neinjektirane kontrole).

Oplođena jaja sakupljana u 9h pripremana su za injektiranje (morfolino grupa – za inaktivaciju *AIP* i kontrolni morfolino – kontrolna grupa) ili za praćenje bez intervencije (WT). Injektiranje je vršeno pod kontrolom mikroskopa pomoću posebnog aparata - mikromanipulatora sa kompresorom, sa namenski pripremljenim mikrokapilarnim staklenim injektionim iglama mikrometarskih vrhova. Pritisak kompresora podešavan je tako da se pri pojedinačnim injeksijama formiraju kapi promera ranga 0,1-0,15mm. Posledice same

injekcione procedure analizirane su poređenjem preživljavanja i razvoja kod neinjektiranih embriona i embriona injektiranih fosfatnim puferom uz dodatak trejser boje koja je korišćena i uz morfolino.



Slika 4.2: Injekciona tehnika autora.

AIP Morfant embrioni, embrioni tretirani kontrolnim morfolino sekvencama, i neinjektirani embrioni, inkubirani su odvojeno ali pod istim uslovima 5 dana nakon oplodnje i praćeni su digitalnom mikroskopijom *in vivo*, uz morfometrijsku analizu mikrofotografija pojedinačnih embriona. Statistička analiza je vršena zbirno za varijable dobijene na svim embrionima odgovarajuće ispitivane grupe iz ponavljanih eksperimenata.

4.4 Whole mount immunobojenje antitelima za PRL i HR

U cilju lokalizacije i morfološke eksploracije hipofize zebrica korišćeno je imunobojenje za HR i PRL. Embrioni zebrica su nakon eutanaziranja pripremani za imunobojenje kroz proces fiksacije kojom se stabilizuju ćelijske strukture i permeabilizacije kojom se omogućava dopiranje antitela do antigenskih lokacija. Samo imunobojenje uključuje primarna antitela (Korišćena antitela: Anti-PRL i Anti-GH (Rabbit Anti-salmon Polyclonal 1:2000, Dr Takahashi, Japan) i za njihovu detekciju sekundarna antitela obeležena peroksidazom (HRP). Po završetku imunobojenja iz svake grupe je nasumično izabrano po 5 embriona za analizu digitalnom mikroskopijom i morfometrijskom analizom mikrofotografija.

4.5 Statistička metodologija

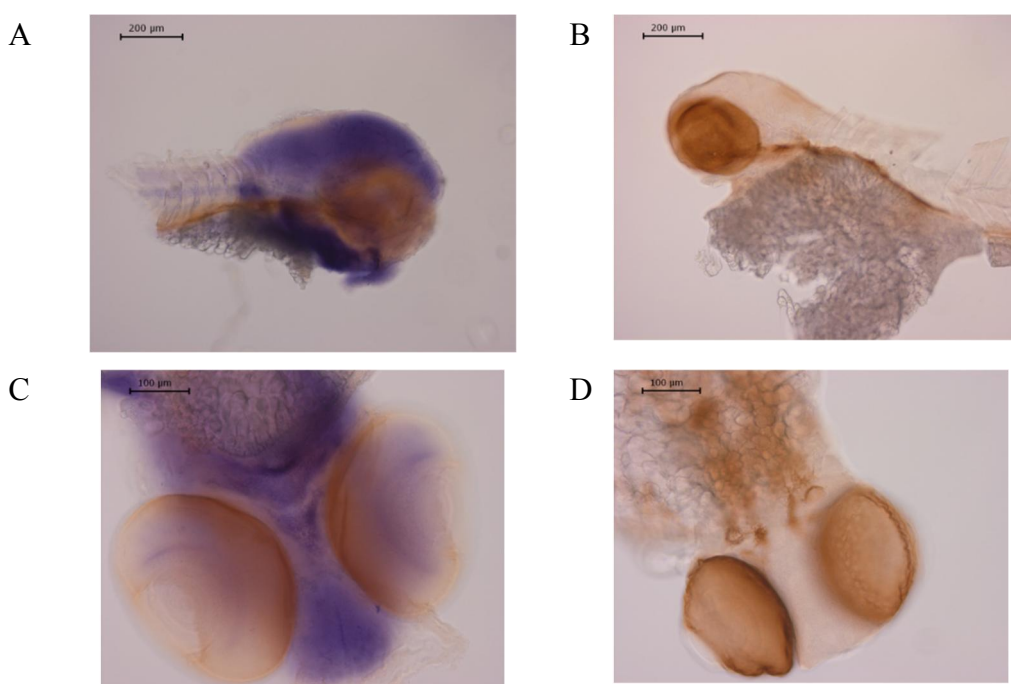
Numerički rezultati eksperimentalnih varijabli generisanih na animalnom modelu prikazani su kao aritmetička sredina i standardna greška. U proceni značajnosti razlike korišćen

je T test za među-grupna poređenja nakon primene ANOVA za ukupnu značajnosti između sve tri ispitivane grupe Statistička obrada podataka sprovedena je uz pomoć softvera SPSS Windows, verzija 20.0. Nivo statističke značajnosti od 0,05 uzet je za odbacivanje nulte hipoteze.

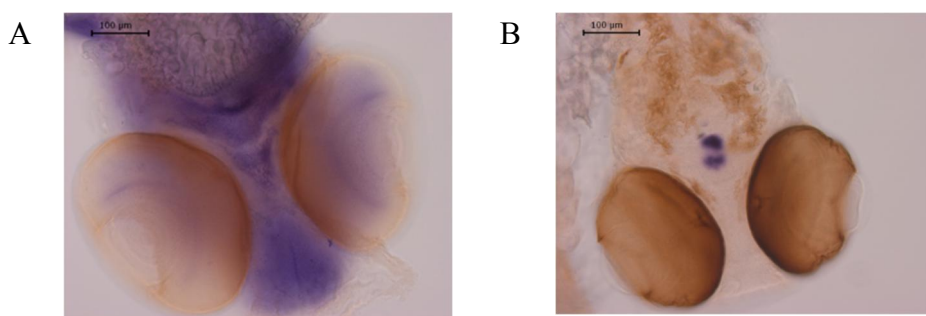
5. REZULTATI ISTRAŽIVANJA NA ŽIVOTINJSKOM MODELU

5.1 Ekspresija *AIP* gena u organizmu zebrica

Whole mount in situ hibridizacija za *AIP* u embrionima zebrice starosti od 72 do 120h nakon oplodjenja (hpo) pokazala je široko rasprostranjenu ekspresiju *AIP* u mozgu zebrica i takođe značajnu ekspresiju u regiji vilice. Whole mount in situ hibridizacija za POMC je korišćena kao pozitivna kontrola (jer je usko ograničena na hipofizu i hipotalamus) a kao negativna kontrola korišćene su *AIP*-sense RNK probe. (Slika 5.1, Slika 5.2)



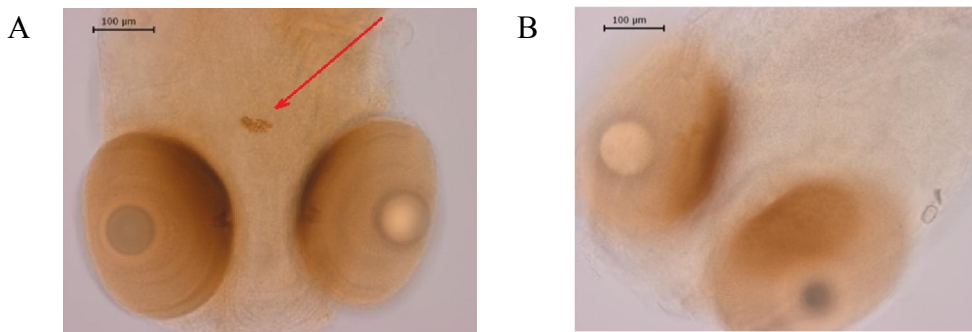
Slika 5.1: Whole mount in situ hibridizacija za *AIP* normalnih (WT) zebrica, embriona starih 72 hpo. Kontrole - sense RNK-probe; Gornji red – bočna projekcija. Donji red: vertikalna projekcija. Uvećanje 20x



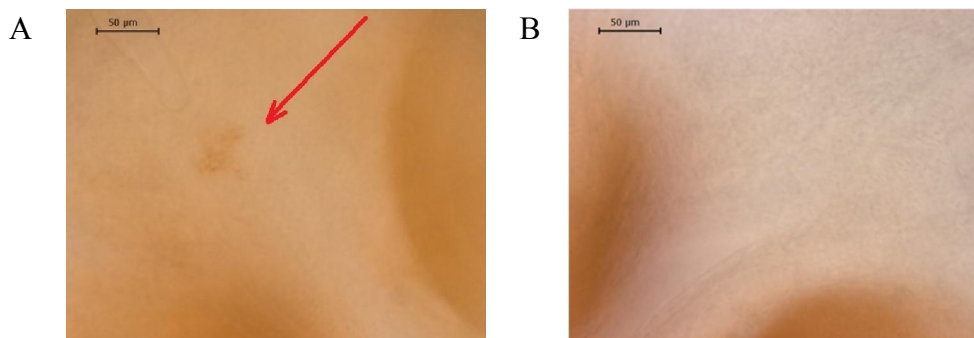
Slika 5.2: Whole mount *AIP* in situ hibridizacija u poređenju sa POMC in situ hibridizacijom – nemodifikovani WT embrioni zebrice - 72hpo. Uvećanje 20x

5.2 Lokalizacija i morfologija hipofize zebrica analizom HR i PRL imunobojenja

Whole mount imunobojenje WT embriona zebrica vršeno je 72h nakon oplodnje (hpo) korišćenjem antitela za PRL i HR (*ljubaznošću Dr Takahashi, Japan*) primenjivanih ranije samo na fiksiranim presecima uzoraka zebrica. U primeni na celim embrionima (*whole mount*) optimizovan je protokol za anti-PRL antitelo (Slika 5.3). Vezivanje anti-HR antitela bilo je nedovoljno efikasno uprkos više modifikacija protokola. (Slika 5.4)



Slika 5.3: Whole mount imunobojenje za PRL na WT embrionima zebrice - 72 hpo. Strelica pokazuje hipofizu. (Zečija anti-losos poliklonalna antitela, 1:2000. Dr Takahashi, Japan) Uvećanje 20x



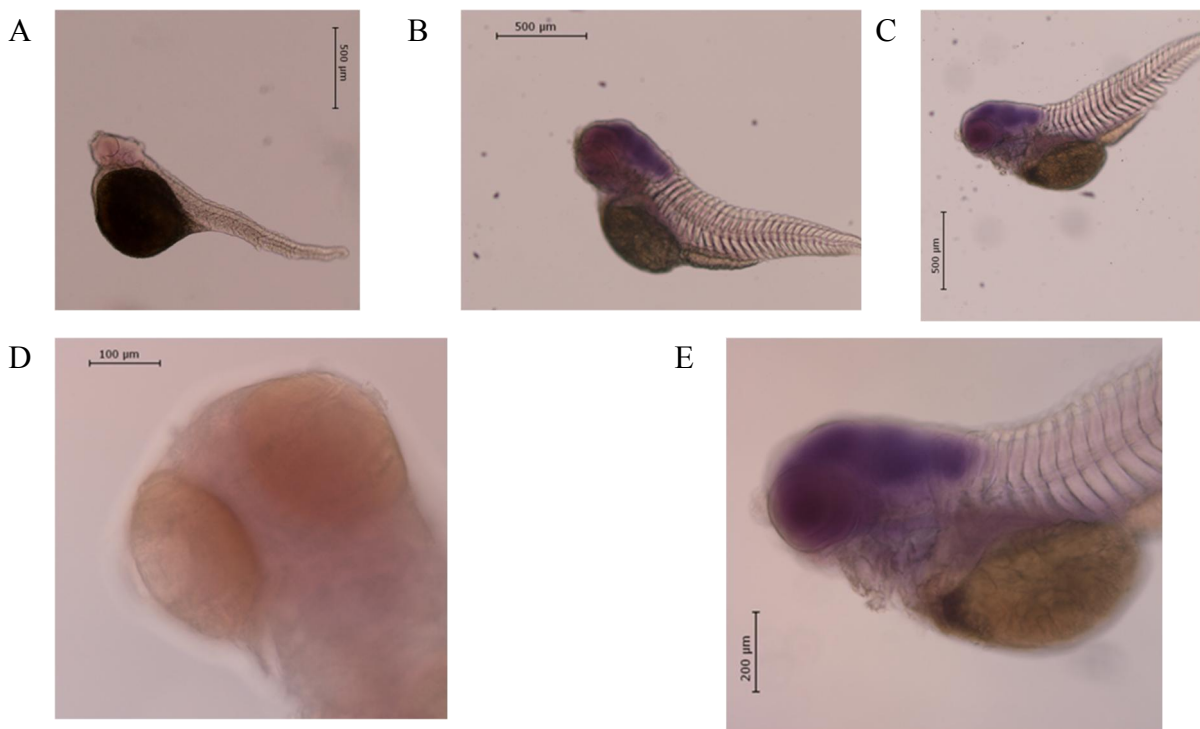
Slika 5.4: Whole mount imunobojenje za HR na WT embrionima zebrice - 72 hpo. Strelica pokazuje hipofizu. (Zečija anti-losos poliklonalna antitela, 1:2000. Dr Takahashi, Japan) Uvećanje 40x

5.3 Testiranje injekcione tehnike i optimalne koncentracije morfolina

Preživljavanje i morfometrijske karakteristike nisu se razlikovale kod neinjektiranih embriona i embriona injektiranih obojenim fosfatnim puferom u mikromililitarskoj količini, potvrđujući da sama injekciona tehnika nema neželjene efekte na rast i razvoj.

AIP morfanti (*knock down*) embrioni zebrića generisani su injektiranjem antisens morfolino oligonukleotida (MO) u embrione na jednoćelijskom stadijumu. Optimalna injekciona doza MO ustanovljena je titracionim smanjenjem sa ciljem izbegavanja ekcesivnog letaliteta među tretiranim embrionima uz zadržavanje razvoja fenotipa. Pri koncentraciji 1:48 preživljavanje je bilo 94% u 24h za antisense *AIP* KD, 98% za KMO i 100% za neinjektirane WT. Dalje preživljavanje je bilo srazmerno ovom odnosu do 120h.

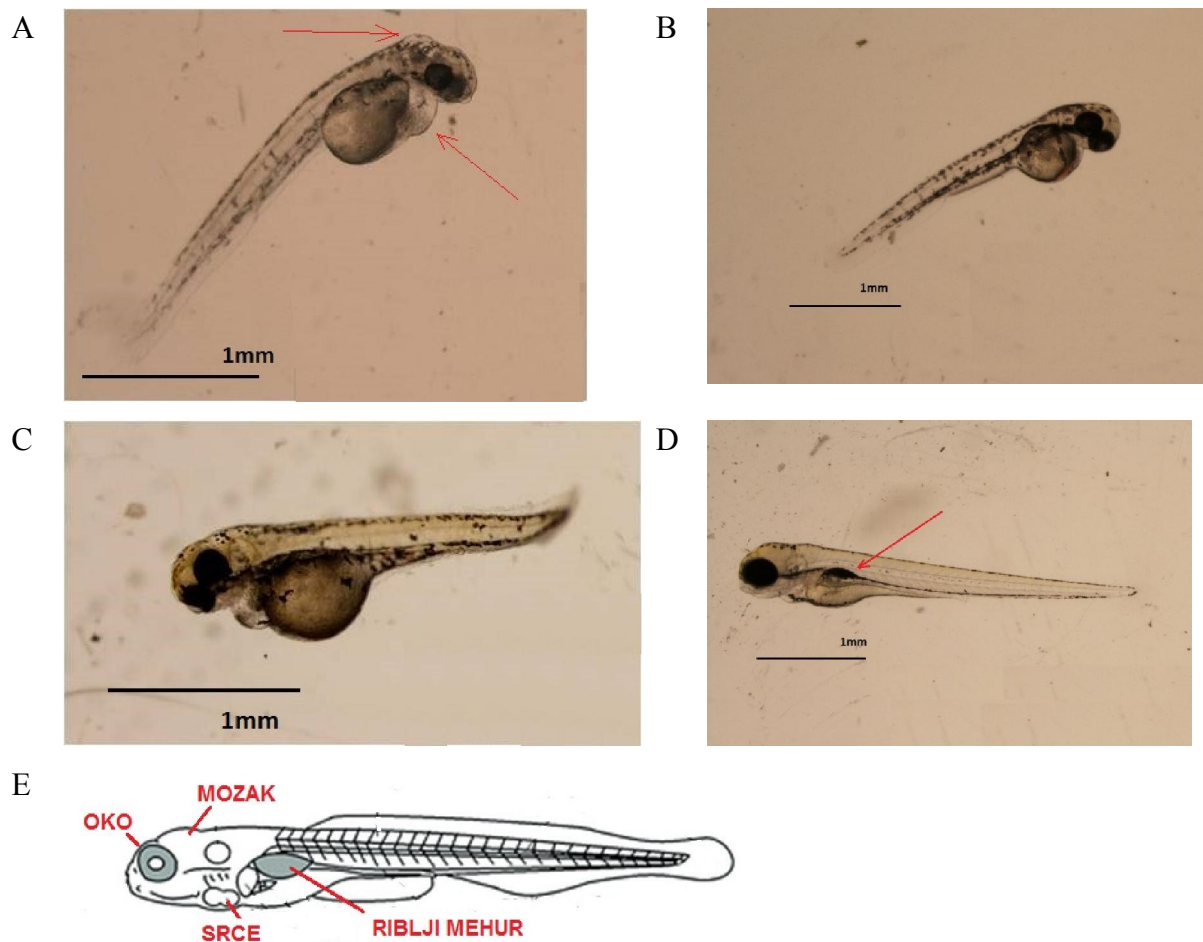
Uspešnost *knock down* efekta pokazana je analizom Whole mount in situ hibridizacije za *AIP* (na *AIP* morfantima i kontrolama – kontrolni MO i neinjektirane kontrole). (Slika 5.5)



Slika 5.5: *AIP* Whole mount in situ hibridizacija embriona zebrića 120 hpo: *AIP* KD: *AIP* morfant (inaktivisan *AIP* gen) – (A,D) u poređenju sa kontrolnim morfolinom (B) i neinjektiranim kontrolama (WT) – (C, E) – kod kojih je očuvana ekspresija *AIP* gena.

5.4 Fenotipske karakteristike rasta i razvoja zebrića sa *AIP* inaktivacijom

Tokom 5 dana praćenja nakon oplodnje zapažen je ukupni zastoj u rastu kod *AIP* morfanata, u poređenju sa obe kontrolne grupe. Incijalno su primećene smanjene veličine očiju i vilice. Posebno su se fenotipski izdvajale: uzdužna zakrivljenost tela jedinke, i anomalije u domenu: mozga, srca i ribljeg mehura. (Slika 5.6)



Slika 5.6: *AIP* morfant (A i C) u poređenju sa kontrolnim morfolinom (B i D) – 72h nakon oplodnje (gornji red) i 96h nakon oplodnje (donji red). Strelicama su označene zone srednjeg mozga i perikarda (gornji red) abnormalno razvijenih i ribljeg mehura (donji red) nedovoljno razvijenog kod *AIP* morfanta, kao i manje oči. Šematski prikaz anatomije zebrice (E)

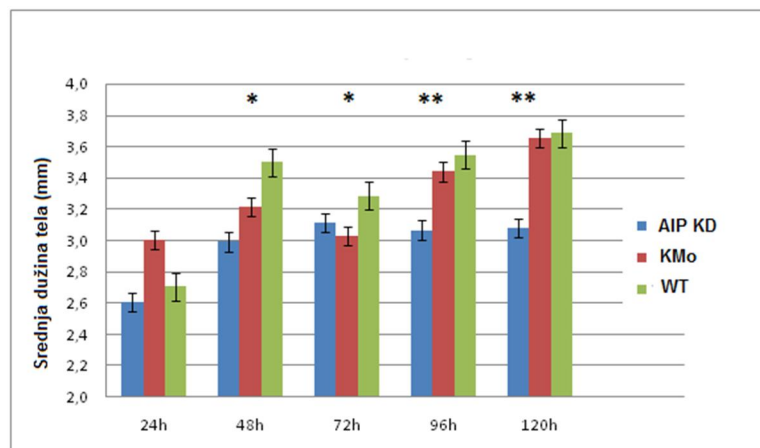
Zastoj u rastu

Ukupan zastoj u rastu kod u *AIP* morfanta zabeležen je 24h nakon oplodnje sa značajnim razlikama u srednjoj ukupnoj dužini jedinki nakon 48h i 72h i visoko značajnim 96h i 120h nakon oplodnje – u poređenju sa kontrolnim morfolinom (KMo) i neizmenjenim jedinkama (WT). Između jedinki u grupi KMo i WT nije bilo razlika u dužini tokom praćenja. (Tabela 5.1 Grafikon 5.1 Slika 5.7)

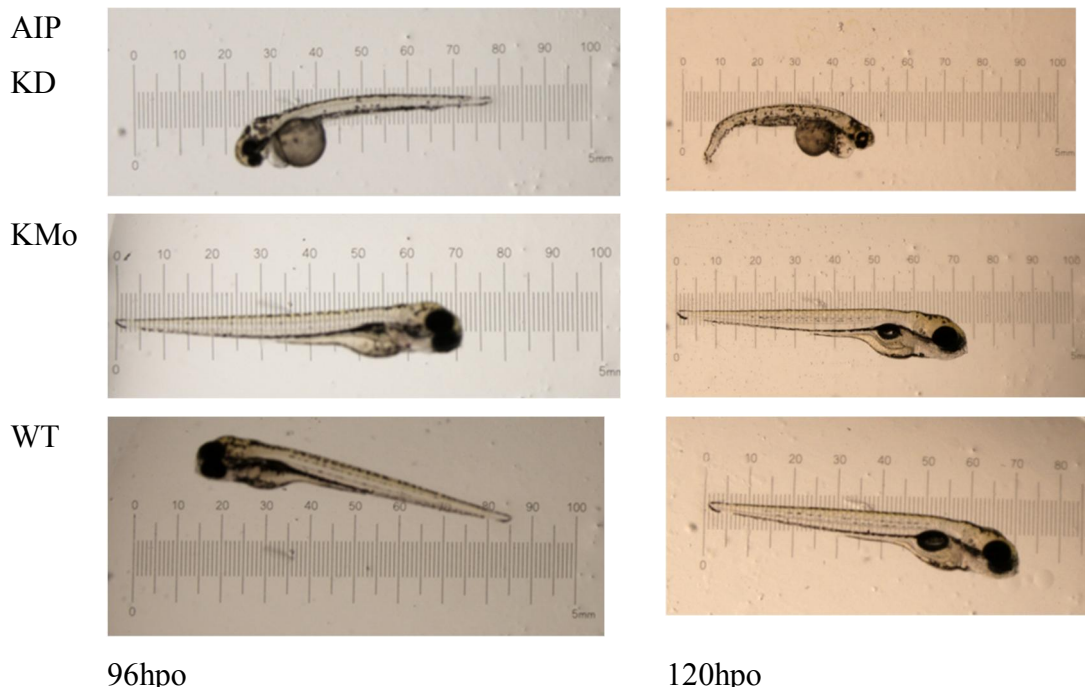
Tabela 5.1: Ukupna telesna dužina zebrića (mm) tokom 120h morfometrijskog praćenja nakon oplodjenja

Ukupna dužina (mm)										
		24hpo		48hpo		72hpo		96hpo		120hpo
	n		n		n		n		n	
AIP KD	17	2,607 ± 0,081	24	2,991 ± 0,059	22	3,114 ± 0,046	22	3,066 ± 0,093	19	3,082 ± 0,118
KMo	18	3,003 ± 0,064	24	3,216 ± 0,041	19	3,031 ± 0,075	22	3,439 ± 0,054	22	3,656 ± 0,076
WT	16	2,704 ± 0,088	19	3,498 ± 0,100	20	3,286 ± 0,066	24	3,546 ± 0,033	19	3,686 ± 0,071
		NS		p<0.05 AS vs SNS p<0.01 AS vs WT		p>0.05 AS vs SNS p<0.05 AS vs WT		p<0.01		p<0.01

*AIP KD – AIP morfanti; KMo – kontrolni morfolino; WT – netretirane jedinke
NS – nije statistički značajno*



Grafikon 5.1 Srednja dužina tela embriona ZF u razvoju od oplodjenja do 120h. *AIP* Morfanti (*AIP* KD), kontrolni morfolino (KMo) i netretirane jedinke (WT), merene 24hpo, 48hpo, 72hpo 96hpo and 120hpo. * p<0.05 ** p<0.01



96hpo

120hpo

Slika 5.7: Telesna dužina embriona zebrica u 96h i 120h po oplodjenju – *AIP* KD – *AIP* morfant KMo – kontrolni morfolino, WT – neizmenje jedinke, bez intervencije

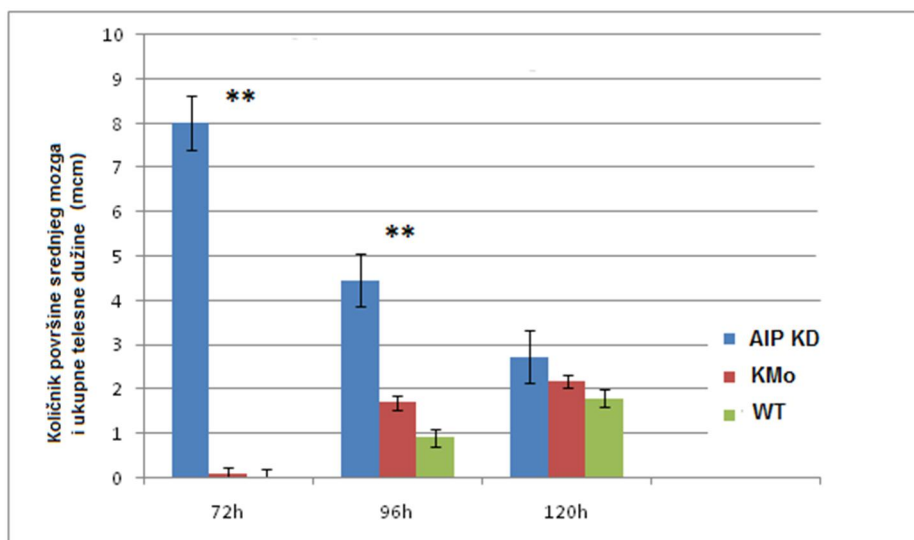
Anomalije regije mozga

Analizom embriona 72hpo i 96hpo zapažene su značajne fenotipske razlike na nivou regije srednjeg mozga. Srednja površina srednjeg mozga bila je značajno veća kod *AIP* morfanta u poređenju sa kontrolnim grupama. Opisane razlike nisu bile značajne nakon 120hpo. Prosečna površina srednjeg mozga nije se više razlikovala iako su inicijalno izmenjeni embrioni preživljavali. Ovo ukazuje na moguće tranzitorni efekat inaktivacije *AIP*. (Tabela 5.2 Grafikon 5.2 Slika 5.8)

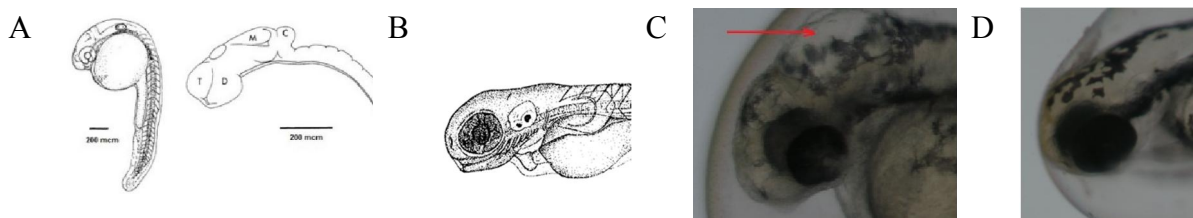
Tabela 5.2: Površina regije srednjeg mozga embriona zebrica tokom morfometrijskog praćenja razvoja

	Površina srednjeg mozga / ukupna dužina jedinke (μm)					
	72hpo		96hpo		120hpo	
	n		n	n		
AIP KD	22	$8,01 \pm 1,34$	22	$4,46 \pm 0,36$	19	$2,74 \pm 0,56$
KMo	19	$0,10 \pm 0,01$	22	$1,70 \pm 0,22$	22	$2,18 \pm 0,25$
WT	20	0	24	$0,92 \pm 0,20$	19	$1,8 \pm 0,31$
		$p < 0,01$		$p < 0,01$		NS

AIP KD – *AIP* morfanti; *KMo* – kontrolni morfolino; *WT* – netretirane jedinke
 NS – nije statistički značajno



Grafikon 5.2: Uvećanje srednjeg mozga – izraženo kao količnik površine srednjeg mozga i ukupne telesne dužine jedinice (*AIP* morfanti – *AIP* KD, kontrolni morfolino - KMo, neinjektirane WT) Merenja 72h, 96h i 120h po oplodnji. ** $p < 0.01$



Slika 5.8 Šematski prikaz embriona ZF 24hpo: M – mezencefalon, D – diencefalon, T – telencefalon, C – cerebellum; Šematski prikaz embriona ZF 72hpo (Adaptirano iz Kimmel, 1993 Ann Reviews)

Primer jedinice *AIP* morfanta u 72hpo (C)– strelica pokazuje uvećanu regiju srednjeg mozga u poređenju sa neizmenjenom WT jedinkom (D).

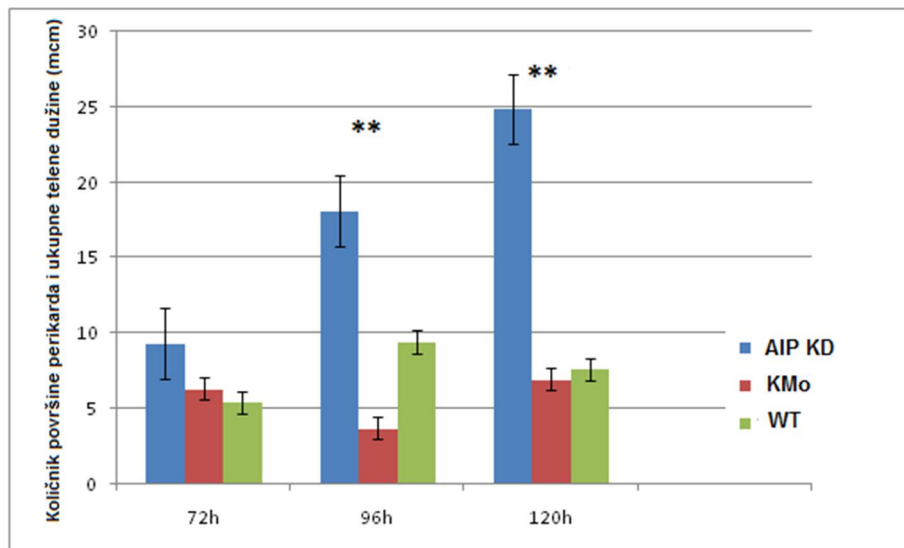
Anomalije regije srca

Uvećanje prosečne površine regije perikarda zapaženo je inicijalno 72h po oplodnji bez značajnosti razlike. Razlika je progredirala do visoko značajne u stadijumima 96hpo i 120hpo. Nije bilo značajnih razlika između kontrolnih grupa – tretiranih kontrolnim morfolinom i netretiranih. (Tabela 5.3, Grafikon 5.3, Slika 5.9)

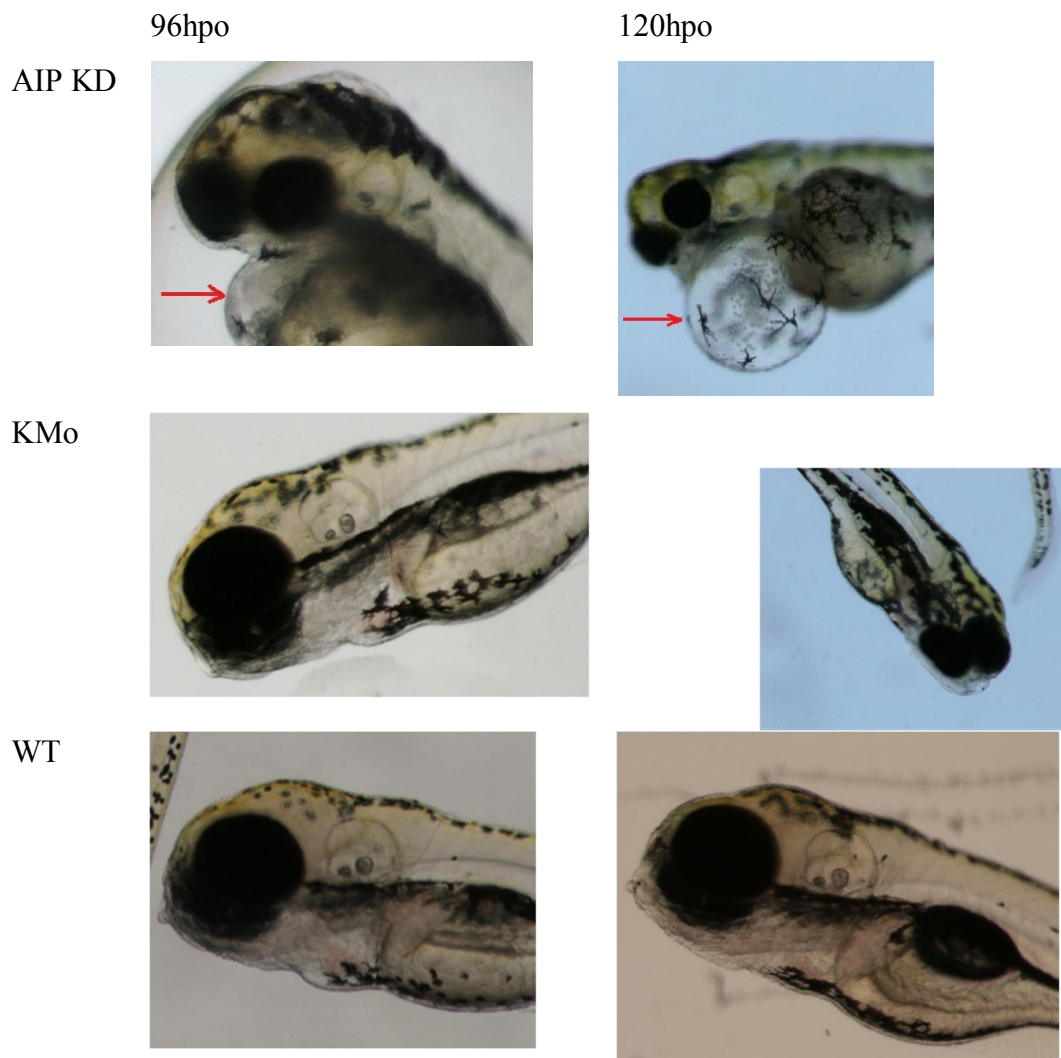
Tabela 5.3: Razvoj perikarda tokom morfometrijskog praćenja embriona zebrice

Površina perikarda / ukupna dužina jedinke (μm)						
		72hpo		96hpo		120hpo
	n		n		n	
AIP KD	22	9,35 \pm 1,73	22	18,11 \pm 1,68	19	24,86 \pm 3,62
KMo	19	6,32 \pm 0,55	22	3,71 \pm 0,79	22	6,94 \pm 0,81
WT	20	5,42 \pm 0,67	24	9,43 \pm 0,81	19	7,59 \pm 0,73
		NS		P<0.001		P<0.001

*AIP KD – AIP morfanti; KMo – kontrolni morfolino; WT – netretirane jedinke
NS – nije statistički značajno*



Grafikon 5.3: Uvećanje perikarda, izraženo kao količnik površine perikarda i ukupne telesne dužine. *AIP* Morfanti – *AIP* KD, Kontrolni morfolino - KMo, WT neinjektirani embrioni mereni u 72h, 96h i 120h nakon oplodnje. ** $p < 0.01$



Slika 5.9: Primer *AIP* morfanta embriona zebrice 72h nakon oplodnje. u poređenju sa neizmenjenom WT jedinkom. Strelicom označen proširen perikard.

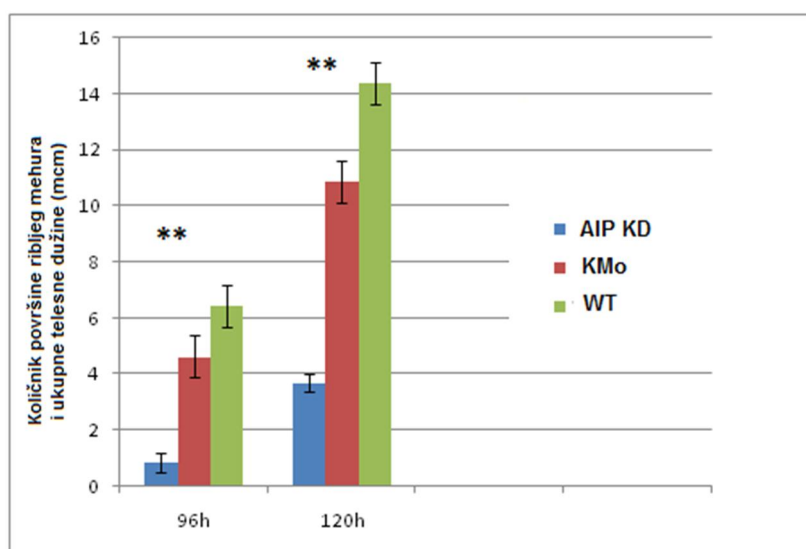
Anomalije ribljeg mehura

Nedovoljno razvijen riblji mehur zapaža se kod *AIP* morfanta 96h i 120h nakon oplodnje. Visoko značajno manja površina ribljeg mehura (korigovana za ukupnu dužinu jedinke) kod *AIP* morfanta u odnosu na kontrolni morfolino i na WT jedinke. Kontrolne grupe se nisu razlikovale međusobno. (Tabela 5.4 Grafikon 5.4)

Tabela 5.4: Razvoj ribljeg mehura tokom morfometrijskog praćenja embriona zebrica

		Površina ribljeg mehura / ukupna dužina jedinke (μm)		
		96hpo	120hpo	
		n	n	
AIP KD	22	$0,85 \pm 0,34$	19	$3,70 \pm 1,76$
KMo	22	$4,62 \pm 0,68$	22	$10,88 \pm 0,96$
WT	24	$6,44 \pm 0,42$	19	$14,38 \pm 1,32$
		$p < 0.01$		$p < 0.01$

AIP KD – *AIP* morfanti; *KMo* – kontrolni morfolino; *WT* – netretirane jedinke



Grafikon 5.4: Abnormalni razvoj ribljeg mehura – značajno manji količnik površine ribljeg mehura i ukupne dužine kod *AIP* morfanta (*AIP KD*) u odnosu na kontrolni morfolino (*KMo*) i *WT* kontrole. – merene 96h i 120h nakon oplodnje. ** $p < 0.01$

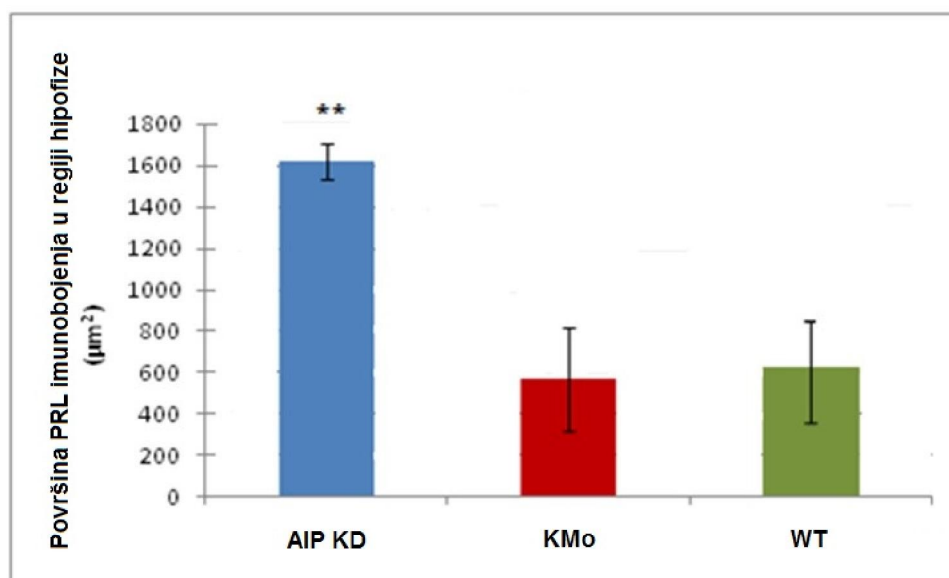
5.5 Promene na nivou hipofize zebrice usled inaktivacije *AIP* gena

Analizom whole-mount Anti PRL imunobojenja uočeno je visoko značajno uvećanje površine zone PRL bojenja kod *AIP* morfanta u odnosu na kontrolne morfolino i *WT* kontrole 120h nakon oplodnje (Tabela 5.5, Grafikon 5.5, Slika 5.10) Zapaža se da je hipofiza kod *AIP* morfanta značajno veća, okruglog oblika (u poređenju sa bubrežastim oblikom kod *WT*) i položena više ventralno.

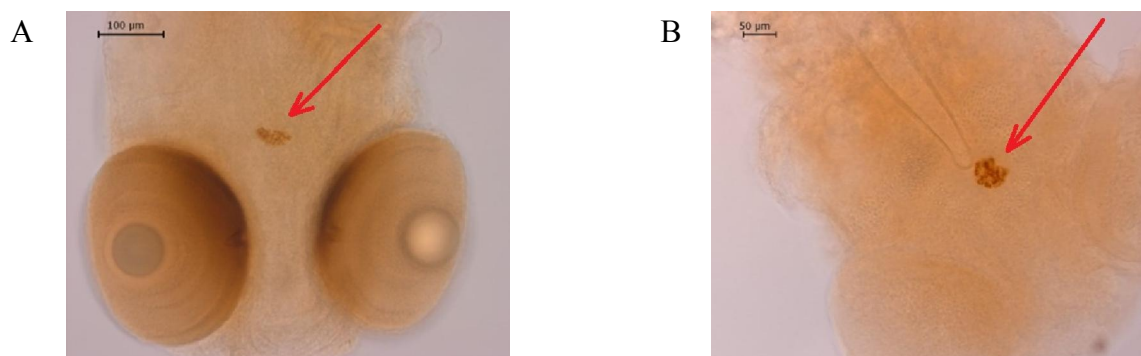
Tabela 5.5: Površina zone imunobojenja za PRL u regiji hipofize kod embriona zebrica

	n	Površina PRL imunobojenja (μm^2)	p
AIP KD	5	1621,93 \pm 87,20	p<0.01
KMo	5	626,05 \pm 223,65	NS
WT	5	574,14 \pm 357,79	NS

AIP KD – *AIP* morfanti; *KMo* – kontrolni morfolino; *WT* – netretirane jedinke
NS – nije statistički značajno



Grafikon 5.5: Visoko značajno uvećanje zone PRL imunobojenja (regije hipofize) kod *AIP* morfanta (*AIP* KD) u odnosu na kontrolne morfolino (*KMo*) i WT kontrole 120h nakon oplodnje. Bez značajne razlike između dve kontrolne grupe. ** p<0.01



Slika 5.10 Primer Whole mount imunobojenja za PRL kod neizmenjene WT zebrice i *AIP* morfanta – 120h nakon oplodnje. Anti PRL (Zečija anti-losos poliklonalna antitela Dr Takahashi, Japan) 1:2000. Strelice označavaju zonu hipofize.

6. DISKUSIJA ISTRAŽIVANJA NA ŽIVOTINJSKOM MODELU:

AIP gen je visoko evolutivno očuvan među vrstama. Osim strukturne sličnosti ovo se dokazuje i eksperimentima u kojima je nedostatak aktivnosti *AIP* gena beskičmenjaka (*Drosophila*) uspešno nadokaden prenošenjem kopije humanog *AIP* gena. (Aflori ED, *et al* 2018) Eksperimentalne životinje sa potpunom *AIP* inaktivacijom ispoljavaju ranu embrionalnu smrtnost usled kardiovaskularnih malformacija (miševi) ili smrtnost u larvalnom stadijumu (*Drosophila*) što ukazuje na važnost ovog gena i široku ekprimiranost u organizmu. (Aflori ED, *et al* 2018) (Lin BC *et al* 2007) Na eksperimentalnom modelu miša, homozigotna *AIP* inaktivacija bila je smrtonosna, a heterozigotna je vodila ranom nastanku hiperplazije ili adenoma hipofize ali i pojavi anomalija na nivou perikarda i kranijalne vaskularizacije. (Raitila A, 2010) (Lin BC, *et al* 2007) (Raitila A *et al* 2010, Gillam MP *et al.* 2017). Zebrica (*Danio rerio*) predstavlja životinjski model uspešno korišćen ranije u eksperimentima baziranim na adekvatnom stepenu sličnosti neuroendokrinog sistema zebrice s ljudskim. (Lohr H *et al* 2011)

Na eksperimentalnom modelu zebrice pokazali smo metodom Whole mount in situ hibridizacije (WISH) da je *AIP* gen eksprimiran u široj regiji mozga u toku embrionalnog razvoja, uključujući, ali ne samo u zoni hipofize, poredeći sa hipofizno-hipotalamusno specifičnom ekspresijom POMC.

Primenom morfolino antisens oligonukleotida na jednoćelijskom stadijumu embrionalnog razvoja zebrica postigli smo tranzitornu inaktivaciju *AIP* gena, potvrđenu WISH metodom. Dve kontrolne grupe činile su neinjektirane jedinke iz istog legla i jedinke injektirane rasparenim kontrolnim morfolino sekvencama. Upoređivan je rast i razvoj jedinki iz tri grupe tokom morfometrijskog praćenja do stadijuma 120h nakon oplodjenja. Analizom imunobojenja za PRL među grupama je upoređivana veličina, oblik i položaj hipofize.

AIP Morpholino Knock Down (Morfant) embrioni zebrice sa inaktivacijom *AIP* gena ispoljavaju anomalije: mozga, perikarda, oka, ribljeg mehura uz opšti zastoj u razvoju ispoljen kroz značajno smanjenu dužinu, progresivno tokom praćenja. Pokazano je značajno patološko uvećanje regije srednjeg mozga. Ova pojava bila je tranzitorna sa nastankom 72h nakon oplodnje i gubljenjem značajnosti 120h nakon oplodnje. Zapaženo je i značajno patološko uvećanje regije perikarda. Perzistiranje anomalija perikarda uz tranzitornost promena na mozgu sugeriše nezavistan mehanizam njihovog nastanka. Zapaženo je i značajno smanjenje površine ribljeg mehura. Razlike između *AIP* morfanta i obe kontrolne grupe postaju izraženije između 96h i 120h nakon oplodnje. U 120hpo *AIP* morfanti su u proseku 16% (0,6mm) kraći od neizmenjenih jedinki (3,1mm naspram 3,7mm).

Sva ova zapažanja ukazuju na široku razvojnu ulogu *AIP* gena i reafirmišu prethodna saznanja stečena na mišijem modelu. (Lin BC, *et al* 2007) Heterozigotne *AIP* mutacije kod miševa imale su za posledicu embrionalnu smrtnost, i razvijene anomalije koje su obuhvatale redukovanu kranijalnu vaskularizaciju i razvoj perikardnog edema. (Lin BC, *et al* 2007) U našim eksperimentima inaktivacije *AIP* gena na modelu zebrića, zapaženo je značajno uvećanje regije srednjeg mozga (moguće u vezi sa poremećenom vaskularizacijom) i značajno uvećanje perikarda. Zanimljivo je da su i kod eksperimentalnog modela Kušingove bolesti kod zebrića (povećana ekspresija *PTTG* gena) zapažene takođe anomalije perikarda sa makroskopski upadljivim nakupljanjem perikardne tečnosti. (Liu NA *et al* 2011)

AIP morfanti embrioni ispoljavali su snažnije imunobojenje PRL u regiji hipofize u poređenju sa nemodifikovanim jedinkama. Hipofiza jedinki sa inaktiviranom funkcijom *AIP* gena bila je značajno veće površine preseka, promenjenog oblika (okruglog nasuprot bubrežastom) i pozicionirana ventralnije. Ovi nalazi ukazuju na moguć porast proliferativne aktivnosti (hiperplaziju ili tumor) na nivou hipofize. U prethodnim eksperimentima na miševima, hiperplazija hipofize je prethodila tumorigenezi kod *AIP* mutantnih životinja (Gillam MP *et al* 2017) (Lecoq AL *et al* 2016). Za razliku od sličnih eksperimenata na modelima glodara koji nisu u potpunosti rekapitulirali humani fenotip jer su se adenomi hipofize javljali u kasnijem uzrastu i sa visokom penetrantnošću, na modelu zebrića pokazuju se promene na nivou hipofize u ranim fazama razvoja jedinke, a takođe sa visokom prevalencom.

Imunobojenje za HR bi bilo od većeg interesa s obzirom na poznatu povezanost inaktivacionih *AIP* mutacija sa razvojem somatotropnih adenoma hipofize kod ljudi i kod eksperimentalnih glodara. Međutim, u našim sprovedenim eksperimentima, dostupna antitela za HR zebrića nisu postigla zadovoljavajuću efikasnost za sprovođenje *whole-mount* imunobojenja.

Ograničenje studije je da je postizanje inaktivacionog efekta na *AIP* genu morfolino tehnikom dokazano samo *in situ* hibridizacijom za *AIP* (očuvana ekspresija u kontrolnim grupama, uz odsustvo ekspresije u eksperimentalnoj grupi) a nije potvrđeno drugim metodama. Generalno ograničenje morfolino metode je i to da se ne može u potpunosti isključiti mogućnost pojave mozaicizma s obzirom na administraciju morfolina injekcionom tehnikom. Na ovo se nadovezuje individualna aktivacija mehanizama oporavka DNK koja može biti različita među ćelijama.

Prednosti zebrića kao eksperimentalnog modela i primenjene metode kao pristupa u eksperimentalnoj inaktivaciji *AIP* gena su u mogućnosti brzog razvoja velikog broja mutantnih jedinki koje se simultano i brzo razvijaju, na malom prostoru i uz male troškove uzgajanja. Tela

su im transparentna u fazi embrionalnog razvoj što pruža pogodnosti za *in vivo* morfometrijsko praćenje u realnom vremenu tokom razvoja. Morfolino metoda kod koje se ne očekuje potpuni gubitak funkcije gena, već gradirana težina fenotipa, može imati prednost pri proučavanju gena čija potpuna inaktivacija vodi ranoj embrionalnoj letalnosti, kakav je *AIP* gen. Kao vodeni organizmi, zebrice pružaju atraktivne prednosti za izučavanje uticaja određenih hemijskih supstanci (kancerogena ili endokrinih disraptora) na ekspresiju ili funkciju *AIP* (i drugih gena) jer se lako i pouzdano mogu izlagati ispitivanim supstancama kroz dodavanje akvarijumskoj vodi. Prelazak sa eksperimentalnih modela sisara na niže životinjske modele predstavlja i humanije i istraživački racionalnije opredeljenje. Zebrice kao eksperimentalni model mogu predstavljati važan međustadijum između *in vitro* eksperimenata na kulturama ćelija i tkiva ili *in vivo* na beskičmenjacima (na primer *Drosophila*) sa jedne strane i *in vivo* eksperimenata na sisarima (na primer glodarima) sa druge strane, omogućavajući smanjenje troškova i blagovremeno uočavanje grešaka ili optimalnije formulisanje hipoteza.

7. ZAKLJUČAK ISPITIVANJA NA ŽIVOTINJSKOM MODELU

Na eksperimentalnom modelu zebriće (*Danio rerio*) pokazana je široko rasprostranjena ekspresija *AIP* gena i njegov značaj za rast i razvoj. Inaktivacija *AIP* gena na ovom modelu dovela je do zaostajanja u rastu i do ispoljavanja anomalija perikarda i srednjeg mozga. Rekapitulacija nekih elemenata fenotipa opisanih ranije na složenijim animalnim modelima (perikardni izliv kod embriona miševa) ukazuje na primenjivost ovog jednostavnijeg, jeftinijeg i praktičnijeg eksperimentalnog modela.

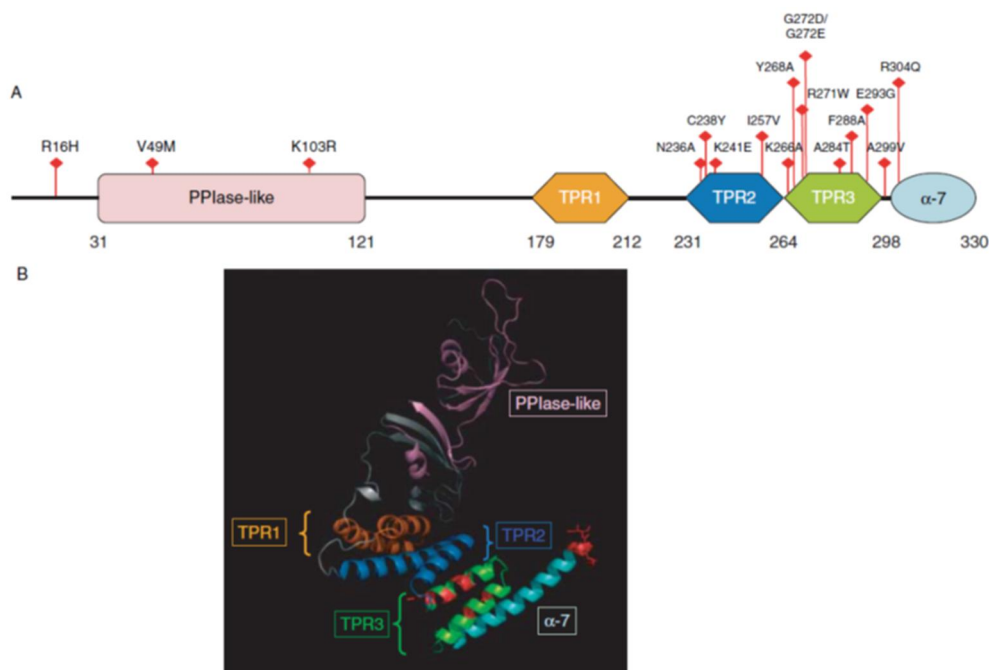
Inaktivacija *AIP* gena na modelu zebrića dovela je do uvećanja i izmene oblika i pozicije hipofize u embrionalnom razvoju koji mogu ukazivati na povećanu proliferativnu aktivnost na nivou hipofize – hiperplaziju ili tumorigenezu. Ovakvi rezultati idu u prilog ranije pretpostavljene tumor-supresorske uloge *AIP* gena u patogenezi adenoma hipofize.

8. ISPITIVANJE FIZIOLOŠKE ULOGE AIP PROTEINA NA NIVOU HIPOFIZE NA LJUDSKOM MODELU

8.1 AIP protein

Produkt *AIP* gena je protein od 330 amino-kiselina i 37 kDA sa ulogom ko-šaperona. AIP protein, prethodno označavan i kao XAP2 ili ARA-9, evolutivno je visoko očuvan, a široko rasprostranjen u organizmu. (Ibanez Costa A, *et al* 2017) Tačni mehanizmi uticaja AIP na proliferaciju hipofiznih ćelija nisu poznati, kao ni njegova eventualna uloga u normalnoj funkciji hipofize. Rezultati funkcionalnih ispitivanja *AIP* mutacija podržavaju pretpostavku o tumor-supresorskoj ulozi *AIP* gena u nastanku porodično udruženih somatotropinoma. Sa druge strane nalazi poremećene subćelijske lokalizacije i ekspresije AIP ukazuju na poremećenu regulaciju AIP i u toku tumorigeneze sporadičnih adenoma hipofize, nezavisno od *AIP* mutacija. (Leontiou CA, *et al* 2008)

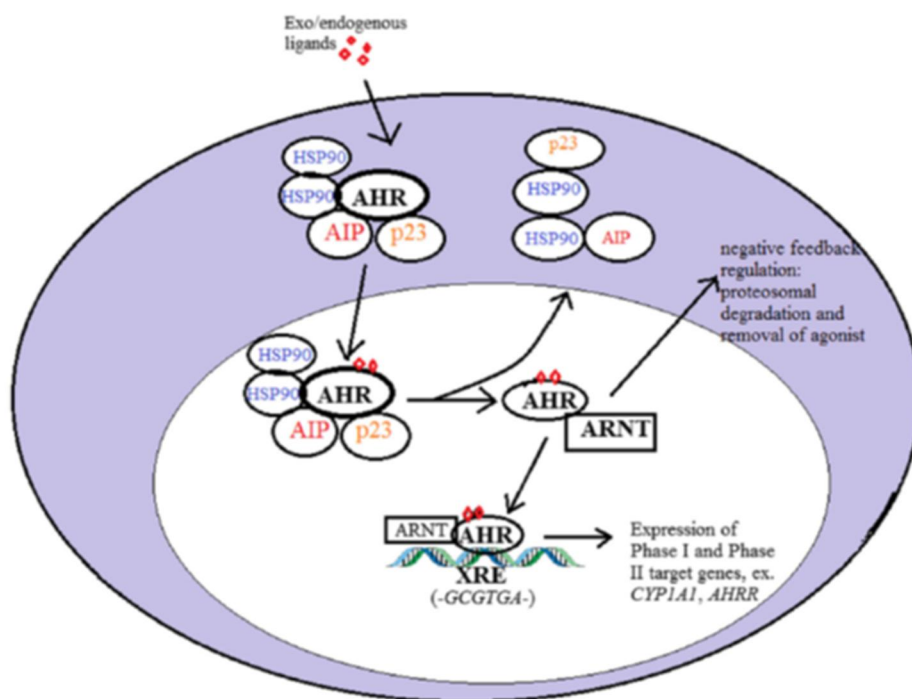
AIP protein je član porodice proteina FKBP (FK506 vezujući protein) i sadrži N-terminalni imunofilnski nastavak, peptidil-prolil cis-trans izomerazni domen (amino kiseline 31-121), tetratrikopeptidni domen (TPR) sa tri TPR motiva (amino kiseline 179-298) i C-terminalni α -7 heliks (Linnert M, *et al* 2012; Morgan RM, *et al* 2012). Evolutivno visoko očuvani C-terminalni nastavak sa tri TPR motiva posreduje u međuproteinskim interakcijama sa brojnim partnerima. (Trivellin G, Korbonits M 2011).



Slika 8.1: Shematska struktura AIP proteina (A) i trodimenzionalna struktura (B) sa naznačenim TPR domenom. (Preuzeto iz Trivellin G, 2011)

Dug poluživot AIP proteina (32,7 h za humani AIP i 30,4 h za mišiji AIP) ukazuju na obilnost i strukturnu složenost ovog proteina. (Hernández-Ramírez LC, *et al* 2016). AIP je izvorno opisan kao vezujući partner aril hidrokarbin receptora (AhR), i kao partner virusnog X-proteina. AhR je orfanski jedarni receptor poznat u prvom redu po svojoj ulozi u posredovanju uticaja toksina spoljne sredine. AhR je uključen u metabolizam stotina ksenobiotika i sredinskih zagađivača, prvenstveno dioksina i dioksinu sličnih supstanci kao što su policiklični aromatični ugljovodonici i planarni halogenirani ugljovodonici. (Ma Q, *et al* 1997, Carver LA, *et al* 1997, Mayer BK, *et al* 1999). Smatra se da AIP blokira aktivnost AhR kao transkripcionog faktora, sprečavanjem ubikvitinacije AhR.

Kasnije su otkriveni brojni interreagujući partneri AIP proteina, u vezi sa proteinima toplotnog šoka (HSP) ili nevezano za njih. (Fagerberg L, *et al* 2014). AIP je ko-šaperon Hsp90, a interreaguje i sa anti-oksidativnim i anti-proliferativnim proteinima kao što je SOD1, ili citoskeletnim proteinima kao što su TUBB i TUBB2A ili citoskeletni regulator NME1, sa mogućim posledicama na citoskeletnu organizaciju i integritet adhezivnih međucelijskih veza. (Hernández-Ramírez LC *et al* 2016). AIP protein verovatno igra različite biološke uloge posredstvom različitih interreagujućih partnera. Hsp90 je verovatno najvažniji vezujući partner AIP, preko koga teoretski može uticati na funkciju brojnih proteina sa potencijalnim značajem u anti-tumorigenetskoj funkciji AIP. (Fagerberg L *et al* 2014) Tačan mehanizam kojim AIP utiče na inhibiciju proliferacije nije poznat, niti je poznata njegova uloga u normalnoj funkciji hipofize. Pokazana interakcija AIP i fosfodiesteraza može biti značajna znajući njihovu ulogu u funkciji somatotrofa u okviru cAMP puta. (Trivellin G, Korbonits M 2011)



Slika 8.2: Mesto AIP u kaskadi AhR posredovanog odgovora na ksenobiotike (Preuzeto iz Formosa R, 2017)

AIP mRNA ekspresija pokazana je u normalnom tkivu hipofize i u sporadičnim somatotrofima, laktotrofima, kortikotrofima i nefunkcijskim adenomima hipofize. (Leontiu CA *et al* 2008) Smatra se da AIP igra ulogu u odgovoru pacijenata sa akromegalijom na terapiju analogima somatostatina (SSA). Većina pacijenata sa inaktivirajućom germinativnom *AIP* mutacijom su delimično ili potpuno rezistentni na SSA. (Kasuki L *et al* 2012) Snižena AIP ekspresija pokazana je kao prediktor invazivnosti somatotropinoma. (Kasuki L *et al* 2011) (Chalal HS, *et al* 2012) (Gadelha MR, *et al* 2013)

8.2 Primeri sekretornih produkata tumor-supresornih gena

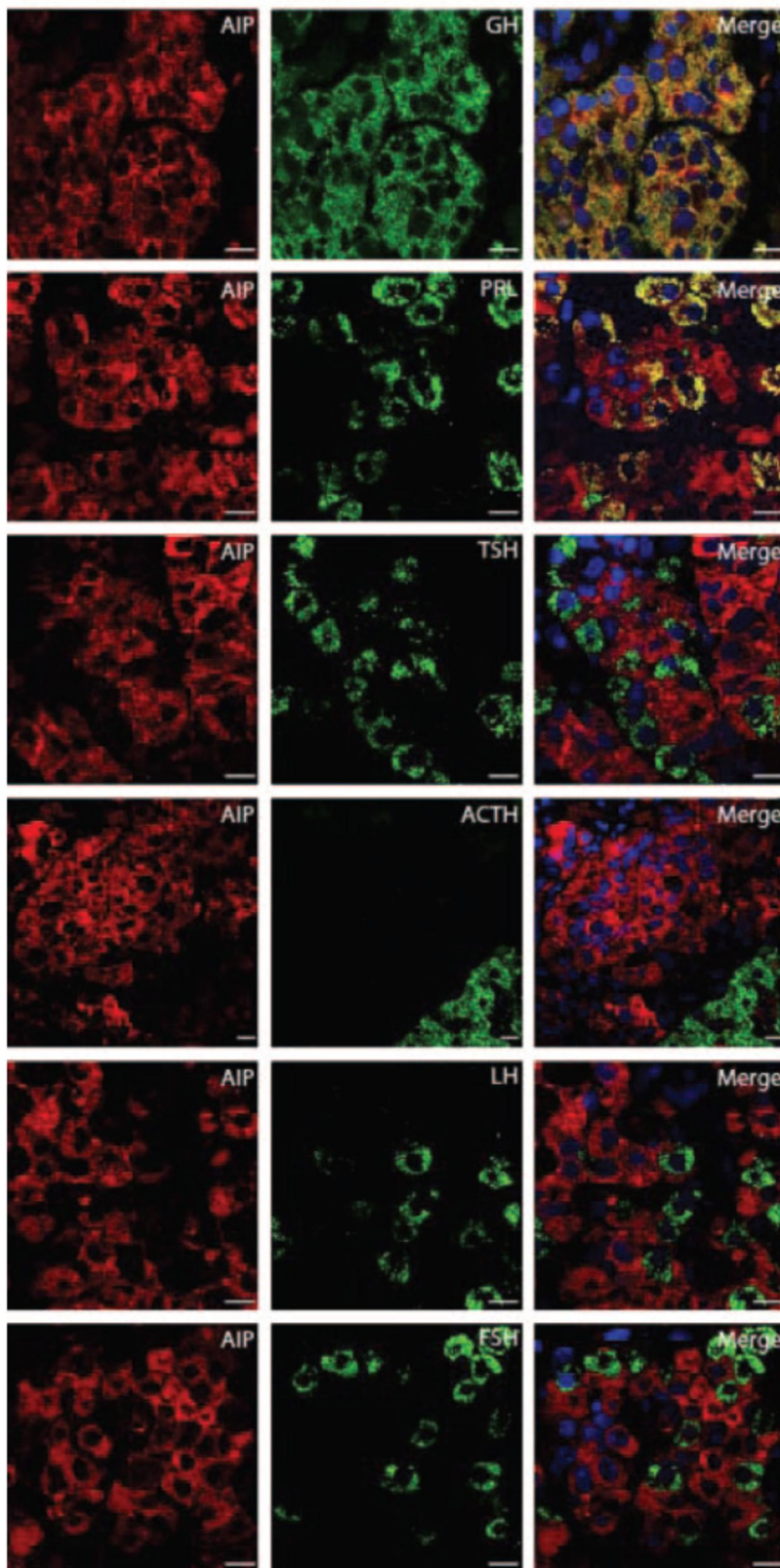
Poznati su primeri drugih tumor supresornih gena čiji peptidni produkti su takođe sekretovani iz ćelija. Neki od njih su *EPHA7* u nehoćkinskom limfomu (Mansour MR, *et al* 2011) i *maspin* povezan sa kancerogenezom u dojci, prostati, plućima, i ezofagealnom skvamoćelijskom karcinomu. (Dean I, *et al* 2017)

Galanin je molekul koji dodatno pruža primer paradigme za tumor supresorni gen koji ima i ulogu u neuroendokrinoj regulaciji uključujući i ulogu u sekreciji HR. (Bauer FE, *et al* 1986) Ova paradigma je važna za naše razmatranje uloge *AIP* gena i potencijalne uloge sekretujućeg AIP. Galanin ima svojstva tumor supresora i nađena je njegova inaktivacija u

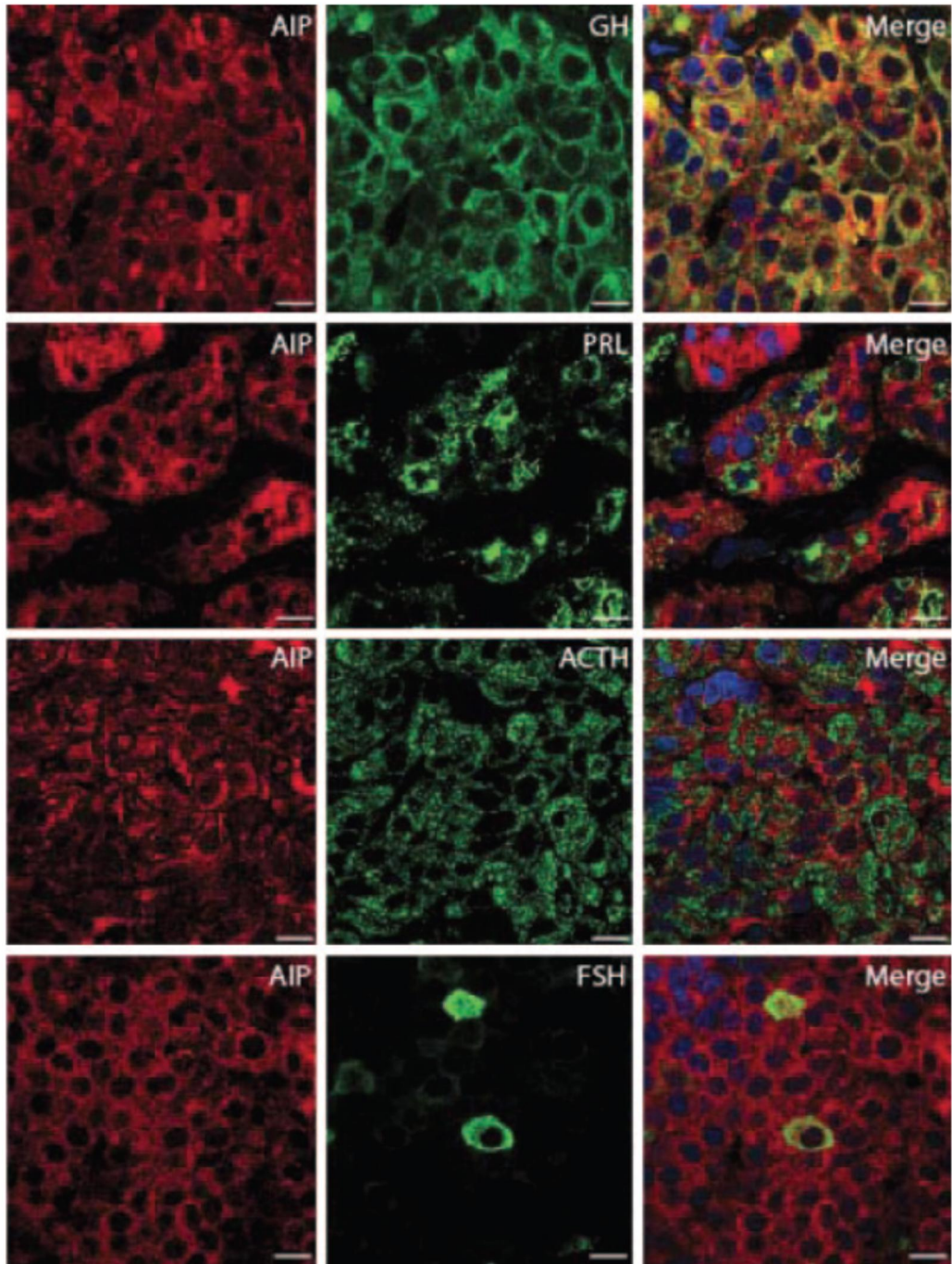
skvamocelularnim karcinomima glave i vrata (Misawa K, *et al* 2013) i u kanceru želuca (Yoon D, *et al* 2018). Galanin se proizvodi i sekretuje u ćelijama hipofize. Sekretija je zavisna od faze menstrualnog ciklusa i osetljiva na polne steroide. Smatra se da je hipofizna sekretija galanina delimično kontrolisana nivoom estradiola. Galaninu se pripisuje endokrina i parakrina uloga u reproduktivnoj funkciji. Galanin potencira oslobađanje LH izazvano od GnRH. Prisustvo galanina je dokazano u perifernoj cirkulaciji. (Peters EE, *et al* 2009) Pored toga galaninu se pripisuje i uloga u neuroendokrinnoj kontroli beta-ćelijske funkcije (Gesmundo I, *et al* 2017) Ustanovljena je uloga galanina u centralnoj regulaciji apetita i energetskog metabolizma i regulaciji reproduktivne funkcije. Na nivou hipotalamusa deluje kao neurotransmiter ili neuromodulator. Na nivou hipofize i perifernih endokrinih žlezda deluje parakrino i autokrino. (Merchenthaler I, *et al* 2010)

8.3 Osnove pretpostavke o sekretornoj prirodi AIP proteina

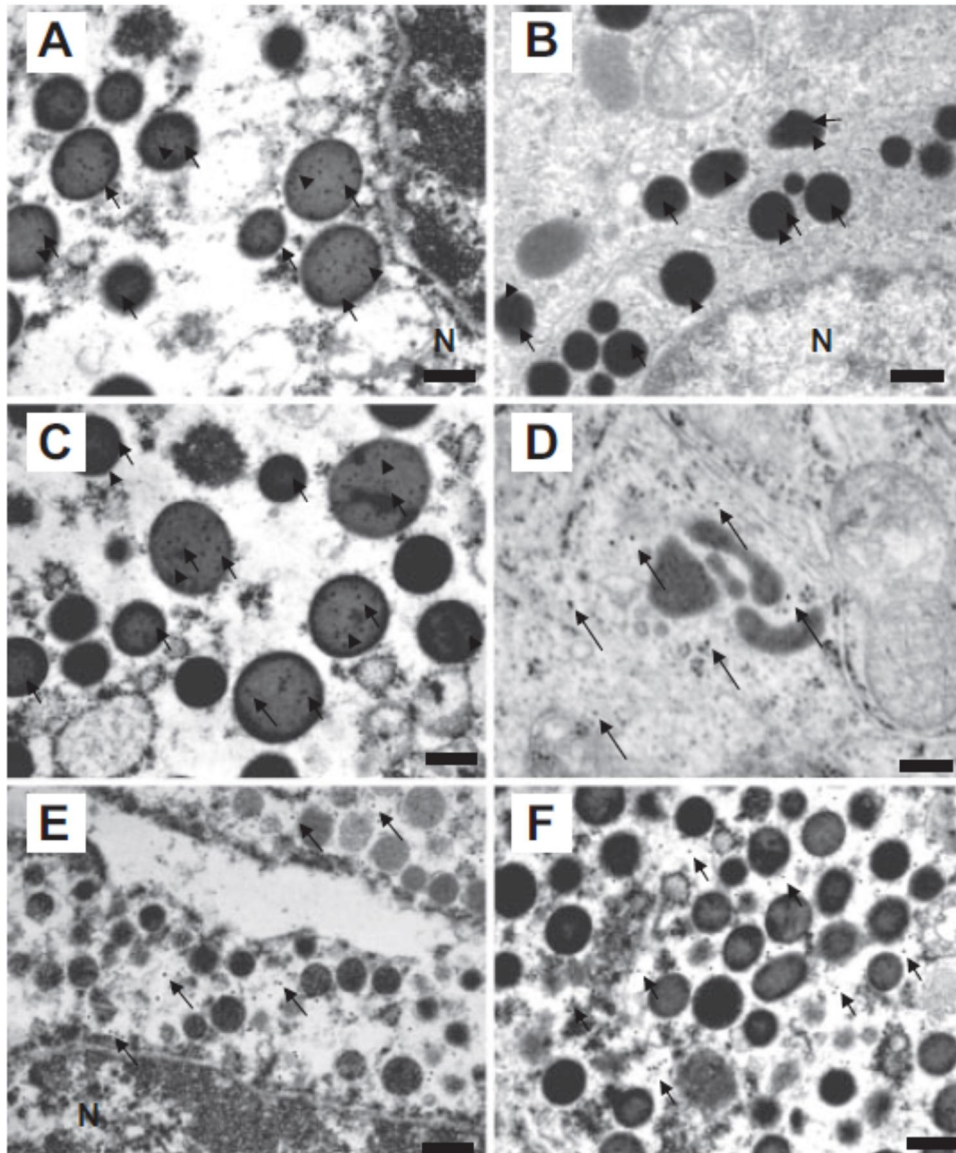
U normalnom tkivu hipofize AIP je detektovan metodom dvostruke imunofluorescencije isključivo u HR i PRL produkujućim ćelijama, a elektronskom mikroskopijom sublokalizovan u sekretorne vezikule. AIP bojenje nije pokazano u normalnim ACTH, TSH, ili LH/FSH ćelijama ili folikulostelatnim ćelijama. Nasuprot tome, imunopozitivnost za AIP je pokazana i u somotropinomima, prolaktinomima, kortikotropinomima i nefunkcijskim adenomima hipofize (NFAH). (Leontiu CA *et al.* 2008) Kod pacijenata sa FIPA imunopozitivnost adeonoma hipofize (AH) za AIP je pokazana i kod pacijenata pozitivnih i negativnih za *AIP* mutaciju. Međutim, subćelijska distribucija AIP bila je zavisna od ćelijskog podtipa AH. Samo u somatotropinomima je AIP bojenje pokazano u sekretornim vezikulama, kao u normalnim humanim HR ćelijama i GH3 hipofiznim ćelijama pacova. (Leontiu CA *et al* 2008) U drugim tipovima AH (prolaktinomi, kortikotropinomi, NFAH) metodama dvostruke imunoflorescencije i elektronske mikroskopije AIP nije detektovan udružen sa sekretornim granulama, već je bio ravnomerno prisutan u citoplazmi. (Leontiu CA *et al* 2008)



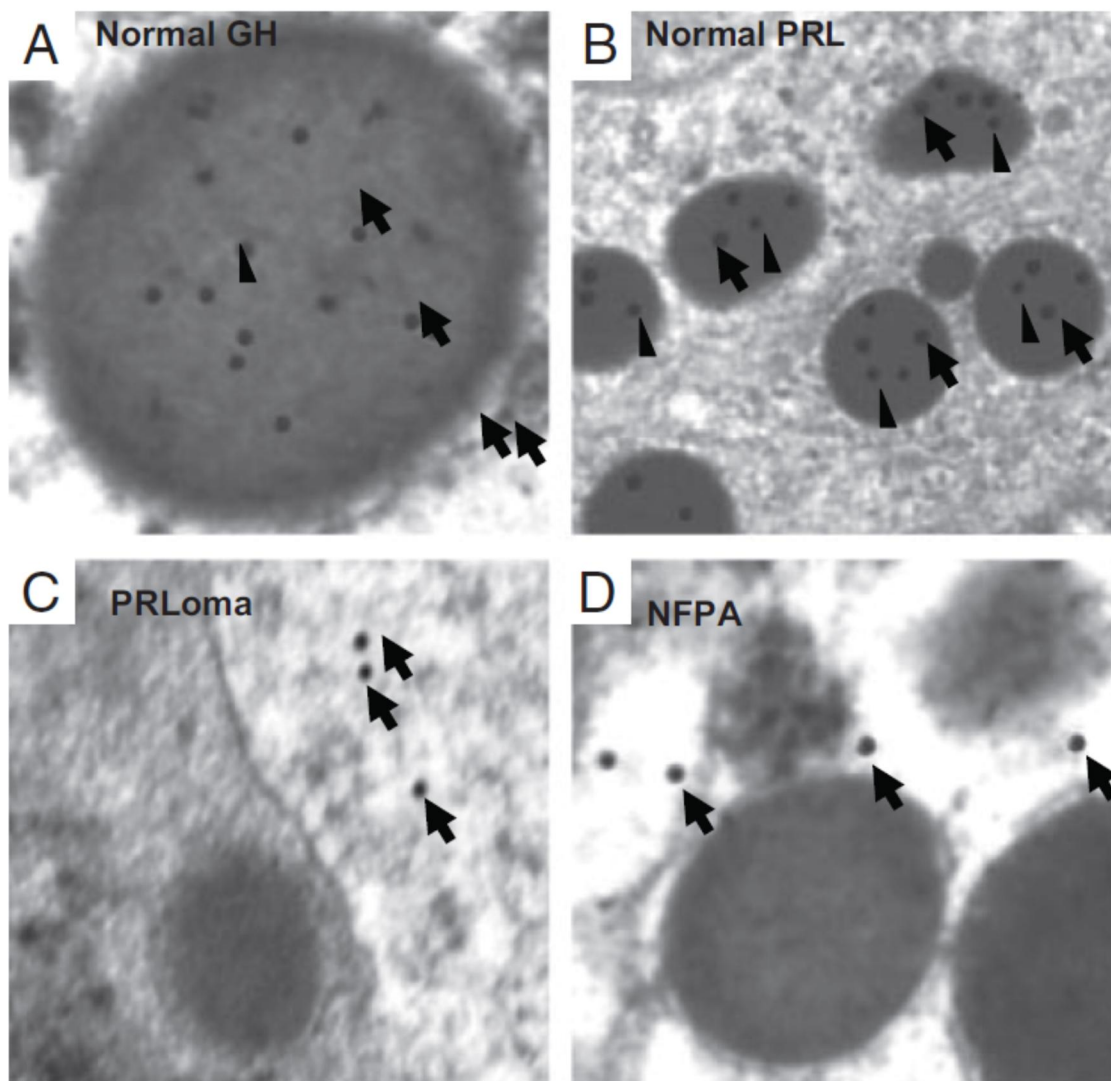
Slika 8.3: Dvostruka imunofluorescencija u normalnim hipofiznim ćelijama – koristeći antitela za AIP (crveno) HR, PRL, TSH, ACTH, FSH ili LH (zeleno) Kolokalizacija je (označena žutom bojom) prisutna samo sa HR i PRL. (Preuzeto iz: Leontiou CA et al. 2008)



Slika 8.4: Dvostruka imunofluorescencija u ćelijama sporadičnih adenoma hipofize – koristeći antitela za AIP (crveno) HR, PRL, TSH, ACTH, FSH ili LH (zeleno) Kolokalizacija je (označena žutom bojom) prisutna samo sa HR. (Preuzeto iz: Leontiou CA et al. 2008)



Slika 8.5: Nalaz elektronske mikroskopije subćelijske lokalizacije AIP u ćelijama normalnih somatotrofa (A), i laktotrofa (B), somatotropinoma (C), prolaktinoma (D), kortikotropinoma (E) i NFAH (F). AIP je lociran (označeno strelicama) u sekretornim granulama samo u normalnim i tumorskim somatotrofima i normalnim laktotrofima. (Preuzeto iz: Leontiou CA et al. 2008)

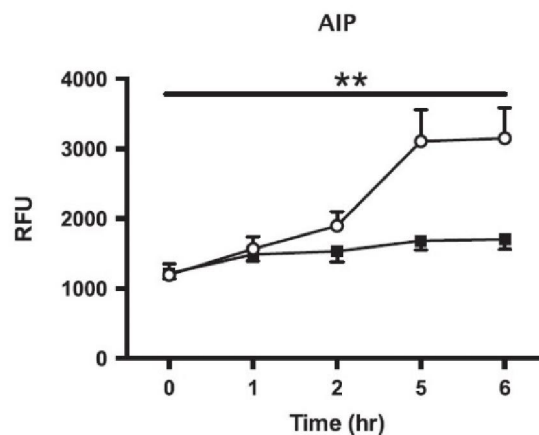


Slika 8.6: Elektronska mikroskopija sekretornih vezikula normalnih somatotrofa (A) normalnih laktotrofa (B), prolaktinoma (C) i NFAH (D). AIP je lociran (označeno strelicama) u sekretornim vezikulama laktotrofa i somatotrofa. (Preuzeto iz: Leontiou CA et al. 2008)

Rezultati dobijeni elektronskom mikroskopijom potvrdili su blisku kolokalizaciju AIP proteina i HR i PRL u sekretornim vezikulama u normalnim ćelijama adenohipofize i u ćelijama somatotrofnog adenoma hipofize (AH), a odsustvo kolokalizacije u sporadičnim laktotrofnim tumorima, kortikotrofnim i NFAH. Ekspresija AIP u podtipovima AH u odnosu na koje odgovarajući normalni ćelijski tipovi ne ekspimiraju AIP, kao i odsustvo kolokalizacije AIP sa PRL, ACTH ili FSH su protumačeni kao znak povećane ekspresije AIP tokom tumorigeneze, i deregulacije AIP proteina sa posledičnom poremećenom subćelijskom lokalizacijom. Ovi rezultati su pobudili interesovanje za potencijalnu funkciju AIP proteina udruženog sa sekretornim vezikulama normalnih somatotrofa i laktotrofa. Otvoreno je pitanje kako se specifičnost AIP za sekretorne vezikule održava i u adenomatoznim HR sekretujućim ćelijama

(kao u zdravim) a to ne važi za druge sekretorne podtipove, uključujući prolaktinome i da li je abnormalna ekspresija i lokalizacija AIP u vezi sa tumorigenozom AH. (Leontiu CA *et al* 2008) Pokazana kolokalizacija AIP i HR u sekretornim vezikulima i kod normalnih somatotrofa i kod HR sekretujućih adenoma je zbunjujuća s obzirom na suprotne efekte somatostatina i njegovih analoga na HR (supresija) i AIP (povećana ekspresija). (Chalal HS *et al* 2012)

Do sada nema objavljenih podataka o imunometrijskoj analizi serumskog AIP, ali prisustvo AIP proteina je dokazano u humanoj cirkulaciji novom SOMAmer proteomičkom metodom. (Trush AB, *et al* 2018) U studiji ispitivanja potencijalnih serumskih biomarkera odgovora na dijetu, Trush i saradnici analizirali su 1130 proteina plazme. Nakon obroka bogatog mastima, plazmatski AIP je rastao značajno više (trostruko u odnosu na baznu vrednost, tokom 6h) kod gojaznih rezistentnih na dijetu u poređenju sa gojaznima koji su odgovarali na dijetu (bez porasta AIP). (Trush AB, *et al* 2018)

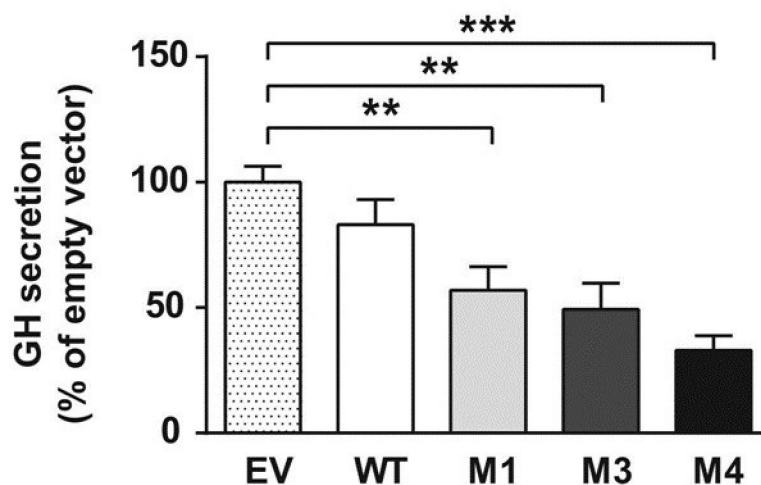


Slika 8.7: Relativna vrednosti AIP proteina u plazmi bazno i nakon obroka bogatih mastima kod gojaznih rezistentnih na dijetu (beli krugovi) i osetljivih na dijetu (crni kvadrati). RFU – Relative fluorescence units (Prilagođeno iz Thrush AB, 2005)

Sličnost u TPR proteinskom domenu između AIP i TRIP8b – proteina koji je uključen u oslobađanje ACTH, doprinela je interesovanju za moguću ulogu AIP u oslobađanju HR (sa kojim je kolokalizovan u sekretornim vezikulama), analogno ulozi TRIP8b za ACTH.. (Chen S, *et al* 2001) Utvrđeni su i ćelijski mehanizmi koji dovode AIP u vezu sa sinaptičkim vezikulama, koje dele brojne zajedničke osobine sa endokrinim sekretornim vezikulama. AIP je pokazan kao važan inhibicioni regulator sinaptičkog oslobađanja neurotransmitera. *AIP* mutacija je dovedena u vezu sa povećanjem broja sinaptičkih vezikula i povećanjem procentnog udela vezikula spremnih za oslobađanje sadržaja. (Chen B, *et al* 2017)

Proteklih decenija, za mnoge molekularne šeparone i katalizatore prostornog konformiranja proteina, pokazano je da se takođe sekretuju iz ćelija i da mogu imati, pored svoje intraćelijske, i dodatnu ulogu kao plejotropni signali preko receptora na udaljenim ćelijama, uključeni prvenstveno ali ne isključivo u imunskim i inflamatornim procesima. (Henderson B, *et al* 2010). Drugi članovi FKBP porodice, kojoj pripada AIP, dokazano se sekretuju u sistemska cirkulaciju i deluju na udaljenim membranskim receptorima, kao na primer FKBPL ili Ciklofilin A. (Zhang M, *et al* 2018) (Valentine A, *et al* 2011)

Nekoliko *in vitro* studija pokazalo je smanjenje bazalne ili stimulisane sekrecije HR u neadenomatoznim somatotrofnim ćelijama (GH3 ćelije pacova) nakon inaktivacije endogenog AIP ili transvekcije mutiranog AIP (Slika 8.8). (Formosa R, *et al* 2013, Lecoq AL, *et al* 2016). Jedno od mogućih objašnjenja za ovo zapažanje je interakcija AIP i HR sekrecije.



Slika 8.8: Smanjenje sekrecije HR u GH3 ćelijama nakon transfekcije mutiranog AIP (M1, M3, M4) u odnosu na neizmenjene ćelije (WT) (Preuzeto iz Lecoq AL, 2016)

Hipoteza o uključenosti AIP u sekreciju HR zanimljiva je u svetlu nalaza da uprkos širokoj ekspresiji AIP u raznorodnim tkivima, inaktivacione AIP mutacije manifestuju se skoro isključivo adenomima hipofize. Teoretska uloga AIP u stabilnosti HR ili sekreciji HR iz somatotrofa mogla bi da ukazuje na protektivnu ulogu nekih AIP mutacija i njihov evolutivni opstanak.

Bazirajući se na pokazanoj kolokalizaciji AIP i HR u sekretornim vezikulama normalnih somatotrofa i ćelija somatotropinoma, i na proteomički dokazanom prisustvu i dinamičnoj osetljivosti AIP proteina u plazmi, kao i na poznatoj sekretornoj prirodi drugih imunofilina

(uključujući onih srodnih AIP), formulisali smo hipotezu da se AIP kosekretuje sa HR. Usmerili smo istraživanje na dokazivanje korelacije u sekretornom odgovoru HR i AIP u dinamskim stimulacionim (ITT) i supresionim (OGTT) testovima sekrecije HR, kod ispitanika sa očuvanom sekrecijom HR, sa dokazanim deficitom HR i sa nesupresibilnom hipersekrecijom HR – aktivnom akromegalijom.

9. CILJEVI ISTRAŽIVANJA NA LJUDSKOM MODELU

1. Ispitati uticaj pola, uzrasta i uhranjenosti (indeksa telesne mase) na serumsku koncentraciju AIP proteina.
2. Ispitati razlike u serumskoj koncentraciji AIP proteina između ispitanika sa nedostatkom sekrecije hormona rasta (HR), sa očuvanom sekrecijom HR i onih sa nekontrolisanom hipersekrecijom HR (akromegalija).
3. Ispitati povezanost serumskih koncentracija AIP i HR bazno i u toku dinamskih testova stimulacije HR (ITT) ili supresije HR (OGTT).
4. Ispitati povezanost serumskih koncentracija AIP i PRL bazno i u toku testa stimulacije sekrecije PRL (ITT).
5. Ispitati povezanost serumskih koncentracija AIP i kortizola bazno i u toku testa stimulacije sekrecije kortizola (ITT).
6. Ispitati dinamički uticaj hipoglikemije (tokom ITT) i hiperglikemije (tokom OGTT) na serumske koncentracije AIP.

10. PACIJENTI I METODE

Istraživanje je sprovedeno na Odeljenju neuroendokrinologije, Klinike za endokrinologiju, dijabetes i bolesti metabolizma, Kliničkog centra Srbije, od jula 2014. do decembra 2015. u skladu sa saglasnošću Etičkog komiteta Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu (odluka 29/XII-23 od 01.12.2014). Uključeno je 88 odraslih ispitanika, podeljenih u 4 grupe na osnovu očuvanosti sekrecije HR. Grupe ispitanika su obuhvatale: pacijente sa deficitom HR (DHR; n = 13), kontrolne pacijente sa očuvanom sekrecijom HR (NDHR; n = 31), pacijente sa aktivnom akromegalijom (AA; n=26) i kontrolne pacijente sa očuvanom supresibilnošću HR (OSHR; n = 18).

10.1 Pacijenti

Demografske i antropometrijske osobine ispitanika prikazane su u **Tabeli 10.1**. Grupe ispitanika sa DHR i NDHR bile su podudarne u odnosu na uzrast i indeks telesne mase (ITM). U DHR grupi 6 pacijenata imalo je izolovan DHR a 7 je imalo i druge deficite hormona hipofize, od kojih 2 kompletan hipopituitarizam a jedan od to dvoje uz postojanje i centralnog insipidnog dijabetesa. Grupe ispitanika sa AA i OSHR bile su podudarne u odnosu na uzrast, pol i ITM. Pacijenti sa AA (16 sa makroadenomima hipofize i 10 sa mikroadenomima) imali su ili novodijagnostikovanu akromegaliju ili akromegaliju perzistentnu nakon lečenja. Sedam pacijenata lečeno je prethodno analogima somatostatina, ali ne u vreme testiranja. Jedan pacijent lečen je ranije dopaminskim agonistima. U grupi OSHR bilo je 12 pacijenata sa akromegalijom izlečenom nakon operacije i 6 pacijenta sa nefunkcijskim adenomima hipofize sa očuvanom dinamikom sekrecije HR. Deficit HR (DHR) je definisan maksimalnim odgovorom HR u testu tolerancije insulina (ITT) manjim od 3,0 ng/ml ili postojanjem kompletnog hipopituitarizma (na osnovu baznog hormonskog statusa) uz serumski IGF-1 snižen ispod uzrasno i populaciono specifičnih referentnih vrednosti. Očuvana sekrecija HR je definisana maksimalnim odgovorom HR u ITT većim od 5,0 ng/ml uz postizanje adekvatne hipoglikemije u ITT sa nalazom glikemije u venskoj krvi $\leq 2,2$ mmol/l. (Ho KK, 2007) Aktivna akromegalija je definisana prisustvom kliničkih manifestacija, nesupresibilnog HR u oralnom testu tolerancije glukoze (OGTT) (nadir HR veći od 1,0 ng/ml) i povišenog serumskog IGF-1 (iznad uzrasno-specifičnog referentnog opsega). Aktivna akromegalija isključena je na osnovu supresibilnosti HR u OGTT ispod 1,0 ng/ml. (Katznelson L, 2014) Svi ispitanici su pre uključivanja podvrgnuti rutinskom fizikalnom pregledu i rutinskim biohemijskim analizama krvi i mokraće. Pacijenti sa postojanjem teške akutne ili hronične bolesti i pacijeni sa teškom stepenom bubrežnom insuficijencijom (eGFR ispod 30ml/min) nisu uključeni u

ispitivanje. Svi ispitanici su detaljno upoznati sa planiranim procedurama i pisano su dali pristanak na svoje učešće u istraživanju u skladu sa odobrenjem Etičkog komiteta Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu (Odluka br. 29/XII-23).

Tabela 10.1: Demografske i antropometrijske karakteristike ispitanika

	Grupa		p	Grupa		p
	DHR	NDHR		AA	OSHR	
N	13	31		26	18	
Uzrast (godine)	38,8 ± 3,76	35,1 ± 2,42	0,406 ^a	50,4 ± 2,65	51,0 ± 2,60	0,882 ^a
Pol (ženski)	5 (38,5%)	22 (71,0%)	0,043 ^b	17 (65,4%)	11 (61,1%)	0,772 ^b
ITM (kg/m ²)	27,37 ± 1,54	26,18 ± 1,54	0,641 ^a	27,85 ± 0,78	29,13 ± 1,52	0,461 ^a

DHR – deficit HR; NDHR – očuvana sekrecija HR; AA – aktivna akromegalija; OSHR – očuvana supresibilnost HR;

Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina i standardna greška (uzrast i ITM) i kao % (pol)

^a t-test ^bHi-kvarat test

10.2 Dinamski testovi sekrecije HR

ITT test je sproveden nakon isključivanja kontraindikacija (anamnestički podaci o krizama svesti ili kornarnoj bolesti srca) prema standardnoj proceduri Odeljenja neuroendokrinologije: Nakon i.v. primene bolus doze brzodelujućeg Actrapid insulina u dozi od 0,15 IU/kg, uzorci venske krvi iz kubitalne vene uzeti su putem i.v. kanile u 0, 30, 60, 90, i 120 minutu nakon primene insulina, za analize serumskog nivoa HR, PRL, kortizola i AIP. Test je započinjan u 8 sati ujutru, u ležećem položaju, nakon celonoćnog gladovanja i mirovanja. (Sarlos S, *et al* 2013)

OGTT test je sproveden nakon isključenja kontraindikacija (dijabetes melitus) prema standardnoj proceduri Odeljenja neuroendokrinologije: oralnom primenom rastvora 75g glukoze u 8h ujutru, nakon celonoćnog gladovanja i mirovanja. Potom su u sedećem položaju uzimani kubitalni uzorci venske krvi, korišćenjem i.v. kanile, za analizu serumskog nivoa HR i AIP 0, 30, 60, 90 i 120 minuta nakon primene glukoznog opterećenja. (Cazbat L, *et al* 2008)

10.3 Hormonske analize

Svi uzorci seruma skladišteni su u zamrzivaču na temperaturi od -80 °C do uzimanja u analizu za određivanje serumskog HR, kortizola i PRL na Klinici za endokrinologiju, dijabetes i bolesti metabolizma KCS. HR je određivan imunoradiometrijskim esejom HGH-RIA CT Cisbio Bioassays, Codolet, Francuska (Kalibrator WHO IS 98/574; donja granica detekcije (LOD) 0,01ng/ml Interni koeficijent varijacije (CV) 2,1% (za koncentraciju 1,4ng/ml) i 1,3% (za koncentraciju 21,0ng/ml) Eksterni CV 4,5% (za koncentraciju 1,3ng/ml) 5,0% (za koncentraciju 5,9 ng/ml) 3,8% (za koncentraciju 8,1ng/ml) i 4,8% (za koncentraciju 12,4ng/ml). Kortizol je određivan metodom CORT-CT2 Cisbio Bioassays, Codolet, Francuska (Intra-esej CV 5,3% (za koncentraciju 64nmol/l) 3,6% (za koncentraciju 251nmol/l) 3,7% (za koncentraciju 686 nmol/l); Inter-esej CV 5,7% (za koncentraciju 63nmol/l) 8,1% (za koncentraciju 222nmol/l) i 6,7% (za koncentraciju 565nmol/l) LOD 6,6nmol/l). Prolaktin je meren imunoradiometrijskim esejom PRL-IRMA DIAsource ImmunoAssays, Louvain-la-Neuve, Belgija (Intra-esej CV 3,3% (za koncentraciju 7,5ng/ml) 5,2% (za koncentraciju 26,6ng/ml) Inter-esej CV 9,2% (za koncentraciju 7,4ng/ml) i 4,5% (za koncentraciju 49,1ng/ml). IGF-1 je meren metodom Siemens Immulite 2000 esej (kalibrator WHO IS 87/518), LOD 20ng/ml, Najviša merljiva vrednost 1600 ng/ml, Intra-esej CV: 3,9% za koncentraciju 77 ng/ml; 6,5% za 169 ng/ml; 2,9% za 380 ng/ml; 3,0% za 689 ng/ml; 2,3% za 1053 ng/ml; 2,4% za 1358 ng/ml; Inter-esej CV: 7,7% za koncentraciju 77 ng/ml; 5,4% za 169 ng/ml; 7,4% za 380 ng/ml; 8,1% za 689 ng/ml; 3,7% za 1053 ng/ml i 4,7% za 1358 ng/ml.

10.4 Analiza serumskog AIP

Svi uzorci seruma skladišteni su u zamrzivaču na temperaturi od -80 °C do transportovanja u uslovima temperaturne stabilnosti na analizu u *Department of Medicine for Endocrinology, Diabetes and Nutritional Medicine, Charité Universitätsmedizin, Campus Mitte, Berlin, Nemačka*. Svi uzorci su analizirani pod istim uslovima, u jednoj seriji, koristeći autohtono razvijeni imunometrijski AIP esej. Donja granica detekcije AIP eseja je 0,068 ng/ml. Intra-esej CV je 3,1% do 4,9%. Intra-esej CV je 8,2% do 13,5%. AIP esej je za potrebe ovog istraživanja razvijen u laboratoriji profesora Christian Strasburgera, *Department of Medicine for Endocrinology, Diabetes and Nutritional Medicine, Charité Universitätsmedizin, Campus Mitte, Berlin, Nemačka*. Rekombinantni humani AIP korišćen je za proizvodnju IgG monoklonalnih AIP antitela u organizmu laboratorijskog miša. Poliklonalna anti-AIP antitela

su dobijena na modelu zeca. Prečišćena monoklonalna anti-AIP antitela su podvrgnuta biotinizaciji. Rekombinantni AIP u serijskom razblaženju je korišćen kao kalibrator za sendvič esej. Za postizanje visoke senzitivnosti AIP eseja (i detekciju AIP molekula u mogućim različitim glikoziliranim formama) sendvič esej je konstruisan sa kombinacijom poliklonalnih i monoklonalnih antitela. Europijumom obeležen streptavidin korišćen je za detektovanje biotinom obeleženih antitela.

10.5 Statistička analiza

Serumske koncentracije hormona analizirane su kao bazne vrednosti, i kao maksimalne vrednosti (pik) za HR, kortizol i PRL u ITT, i kao najmanja vrednost (nadir) HR u OGTT, kao površina-pod krivom ($AUC_{0-120min}$) za HR, kortizol i PRL u ITT i za HR u OGTT. U zavisnosti od distribucije varijable, rezultati su prikazani kao ukupni broj i procenat (%), kao aritmetička sredina i standardna greška, ili kao medijana i interkvartilni opseg (25-75. percentil). Vrednosti AIP prikazane su kao medijana i interkvartilni opseg izvornih nemodifikovanih vrednosti. Vrednosti serumskog AIP su analizirane kao bazne, maksimalne i minimalne vrednosti u dinamski testovima sekrecije HR, i kao AIP $AUC_{0-120min}$ u ITT i u OGTT, i kao AIP Delta porast u toku testa, koji je računat kao količnik razlike maksimalne i bazalne vrednosti i bazalne vrednosti ($AIP\ Delta = (AIP_{max}-AIP_{bas})/AIP_{bas}$). Integrisane vrednosti sekrecije . površine pod krivom ($AUC_{0-120min}$) su izračunavane trapezoidalnim metodom.

Normalnost distribucije varijabli testirana je Kolmogorov-Smirnov testom i Shapiro-Wilk testom. Varijable koje nisu normalno raspodeljene su transformisane koristeći logaritamsku transformaciju (\log_{10}). Grupe su poređene za značajnost razlike koristeći parametarske (t-test) i neparametarske testove (Hi kvadrat, Man-Vitni U test, Fridman test). Za procenu značajnosti korelacije među varijablama korišćena je Spirmanova korelacija. Fridmanov test je korišćen za procenu značajnosti promene vrednosti serumskog AIP tokom ITT testa i OGTT testa. Softverski paket SPSS je korišćen u statističkoj analizi. P vrednosti manje od 0,05 su smatrane statistički značajnim.

11. REZULTATI ISTRAŽIVANJA NA LJUDSKOM MODELU

11.1 Hormonski odgovor u ITT

Pik HR u ITT bio je značajno niži u DHR grupi u odnosu na NDHR grupu: $1,42 \pm 0,22$ ng/ml vs. $15,09 \pm 6,26$ ng/ml ($p < 0,01$)

Pik PRL u ITT bio je značajno niži u DHR grupi u odnosu na NDHR grupu: $26,76 \pm 3,69$ ng/ml vs. $114,59 \pm 14,17$ ng/ml ($p < 0,01$)

Pik kortizola u ITT nije se značajno razlikovao u DHR grupi u odnosu na NDHR grupu: $710,0 \pm 51,3$ ng/ml vs. $636,9 \pm 23,6$ ng/ml ($p = 0,21$)

11.2 Odgovor HR na supresiju

Nadir HR u OGTT bio je značajno niži u OSHR grupi u odnosu na AA grupu: $0,29 \pm 0,05$ ng/ml vs. $11,27 \pm 2,90$ ng/ml ($p < 0,01$)

11.3 Koncentracije AIP u serumu

Preliminarna analiza je pokazala da vrednosti AIP ne podležu normalnoj raspodeli. Stoga su sve AIP vrednosti logaritamski transformisane (\log_{10}) pre primene parametarskih statističkih testova. Rezultati nisu pokazali razliku u odnosu na rezultate dobijene primenom neparametarskih testova na netransformisanim podacima. Sve vrednosti AIP prikazane su kao medijana i interkvartilni opseg (25 - 75 percentil) izvornih netransformisanih vrednosti.

11.3.1 Uticaj pola na serumski AIP

Bazni AIP, maksimalna vrednost AIP (AIP max), AIP AUC i AIP Delta nisu se razlikovale značajno između polova u bilo kojoj od grupa. (Tabela 11.2).

Tabela 11.2. Poređenje između polova u baznim i dinamičkim vrednostima AIP

		Ž	M	p*
AIP bazno (ng/ml)	DHR	0,170 (0,155-0,203)	0,136 (0,083-0,318)	0,354
	NDHR	0,181 (0,103-0,474)	0,124 (0,072-0,238)	0,292
	AA	0,090 (0,068-0,114)	0,115 (0,068-0,230)	0,339
	OSHR	0,176 (0,069-0,331)	0,108 (0,068-0,293)	0,559
AIPmax (ng/ml)	DHR	0,278 (0,155-0,405)	0,266 (0,149-0,563)	1,000
	NDHR	0,337 (0,160-0,584)	0,210 (0,173-0,587)	0,623
	AA	0,141 (0,106-0,219)	0,204 (0,149-0,331)	0,263
	OSHR	0,203 (0,134-0,380)	0,145 (0,125-0,520)	1,000
AIP AUC (ng/ml/120min)	DHR	25,91 (16,11-26,34)	25,99 (12,21-50,03)	0,943
	NDHR	30,11 (13,17-51,99)	19,89 (16,70-40,04)	0,716
	AA	13,26 (10,26-20,30)	12,04 (11,68-27,75)	0,751
	OSHR	17,79 (9,80-32,52)	11,49 (10,68-23,82)	1,000
AIP Delta	DHR	0,64 (0,00-1,00)	0,33 (0,10-0,66)	0,943
	NDHR	0,53 (0,18-1,03)	0,81 (0,66-1,58)	0,174
	AA	0,39 (0,28-0,57)	0,21 (0,00-0,72)	0,792
	OSHR	0,13 (0,00-0,35)	0,25 (0,00-1,03)	0,479

DHR – deficit HR; NDHR – očuvana sekrecija HR; AA – aktivna akromegalija; OSHR – očuvana supresibilnost HR; Ž - ženski pol M – muški pol

Vrednosti prikazane kao medijane i interkvartilni opseg

* u svim poređenjima korišćen je Mann-Whitney U test

11.3.2 Uticaj godina starosti na serumski AIP

Korelacija vrednosti baznog AIP, AIP max, AIP AUC i AIP Delta sa godinama starosti nije bila značajna ni u jednoj od grupa (Tabela 11.3).

Tabela 11.3. Korelacija godina starosti sa baznim i dinamičkim vrednostima serumskog AIP;

	AIP bazno (ng/ml)	Uzrast (godine)	R	p
DHR	0,155 (0,112-0,326)	38,85±3,76	0,296	0,326
NDHR	0,143 (0,087-0,339)	35,10±2,42	-0,139	0,457
AA	0,096 (0,067-0,159)	50,42±2,65	-0,056	0,788
OSHR	0,153 (0,068-0,302)	51,00±2,60	-0,297	0,231
	AIPmax (ng/ml)	Uzrast (godine)	R	p
DHR	0,292 (0,160-0,587)	38,85±3,76	0,221	0,467
NDHR	0,278 (0,146-0,562)	35,10±2,42	-0,068	0,715
AA	0,190 (0,106-0,247)	50,42±2,65	-0,235	0,249
OSHR	0,190 (0,132-0,415)	51,00±2,60	-0,302	0,224
	AIP AUC (ng/ml/120min)	Uzrast (godine)	R	p
DHR	25,90 (13,03-50,03)	38,85±3,76	0,274	0,365
NDHR	24,58 (13,32-46,46)	35,10±2,42	-0,093	0,617
AA	12,85 (9,97-22,16)	50,42±2,65	-0,269	0,184
OSHR	16,63 (10,46-26,00)	51,00±2,60	-0,296	0,232
	AIP Delta	Uzrast (godine)	R	p
DHR	0,43 (0,03-0,90)	38,85±3,76	0,197	0,518
NDHR	0,69 (0,23-1,32)	35,10±2,42	0,085	0,648
AA	0,38 (0,00-0,74)	50,42±2,65	-0,233	0,252
OSHR	0,14 (0,00-0,59)	51,00±2,60	0,061	0,811

DHR – deficit HR; NDHR – očuvana sekrecija HR; AA – aktivna akromegalija; OSHR – očuvana supresibilnost HR; R- Spearman Rho koeficijent korelacije;

Podaci su prikazani kao medijana i interkvartilni opseg (vrednosti AIP) ili kao aritmetička sredina i standardna greška (godine starosti)

11.3.3 Uticaj ITM na serumski AIP

Korelacija vrednosti baznog AIP, AIP max, AIP AUC i AIP Delta sa ITM nije bila značajna ni u jednoj od ispitivanih grupa (Tabela 6.4).

Tabela 11.4. Korelacija baznih i dinamičkih vrednosti AIP sa indeksom telesne mase (ITM);

	AIP bazno (ng/ml)	ITM (kg/m ²)	R	p
DHR	0,155 (0,112-0,326)	27,37 ± 1,54	-0,275	0,363
NDHR	0,143 (0,087-0,339)	26,18 ± 1,54	-0,062	0,751
AA	0,096 (0,067-0,159)	29,13±1,52	0,115	0,628
OSHR	0,153 (0,068-0,302)	29,13 ± 1,52	-0,448	0,072
	AIPmax (ng/ml)	ITM (kg/m ²)	R	p
DHR	0,292 (0,160-0,587)	27,37 ± 1,54	0,074	0,809
NDHR	0,278 (0,146-0,562)	26,18 ± 1,54	0,019	0,920
AA	0,190 (0,106-0,247)	29,13±1,52	-0,045	0,850
OSHR	0,190 (0,132-0,415)	29,13 ± 1,52	-0,282	0,273
	AIP AUC (ng/ml/120min)	ITM (kg/m ²)	R	p
DHR	25,90 (13,03-50,03)	27,37 ± 1,54	0,044	0,886
NDHR	24,58 (13,32-46,46)	26,18 ± 1,54	0,025	0,898
AA	12,85 (9,97-22,16)	29,13±1,52	0,085	0,721
OSHR	16,63 (10,46-26,00)	29,13 ± 1,52	-0,350	0,168
	AIP Delta	ITM (kg/m ²)	R	p
DHR	0,43 (0,03-0,90)	27,37 ± 1,54	0,210	0,491
NDHR	0,69 (0,23-1,32)	26,18 ± 1,54	0,026	0,895
AA	0,38 (0,00-0,74)	29,13±1,52	-0,007	0,977
OSHR	0,14 (0,00-0,59)	29,13 ± 1,52	0,338	0,185

DHR – deficit HR; NDHR – očuvana sekrecija HR; AA – aktivna akromegalija; OSHR – očuvana supresibilnost HR; R- Spearman Rho koeficijent korelacije;

Podaci su prikazani kao medijana i interkvartilni opseg (vrednosti AIP) ili kao aritmetička sredina i standardna greška (vrednosti ITM)

11.3.4 Uticaj očuvanosti sekrecije HR na serumski AIP

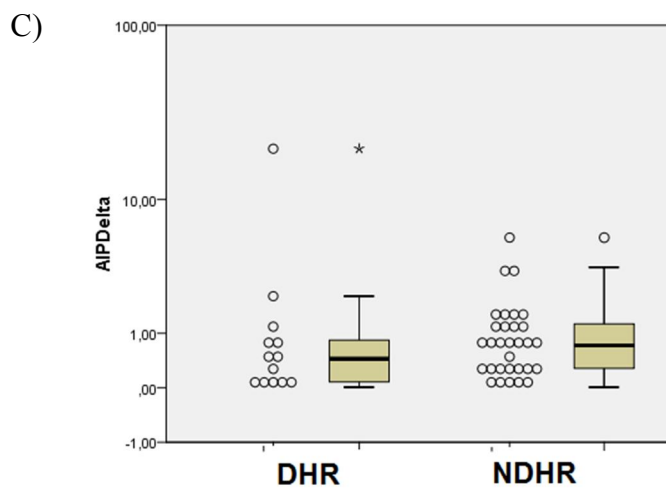
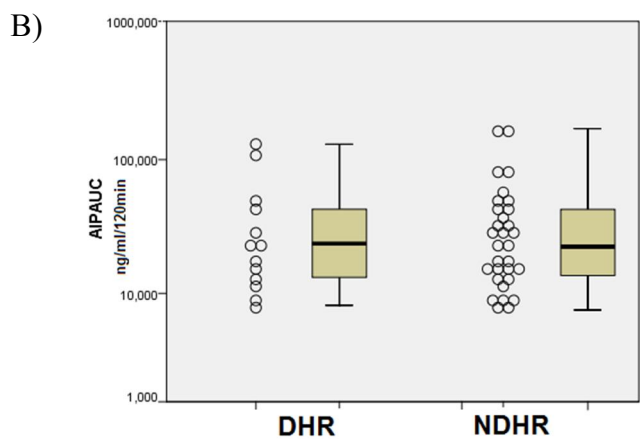
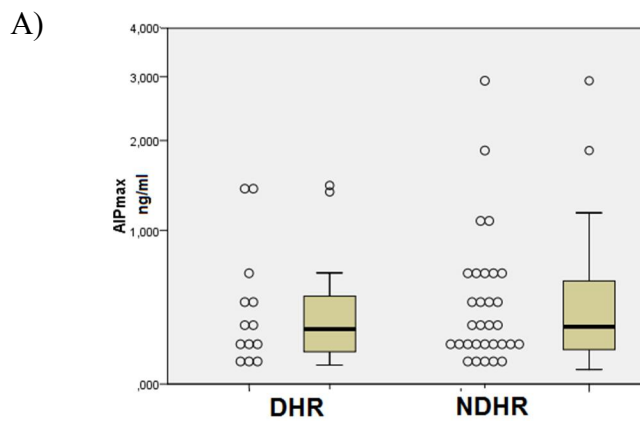
Vrednosti baznog AIP, AIP max, AIP AUC ili AIP Delta nisu se razlikovale značajno između grupe DHR i NDHR (Tabela 11.5, Slika 11.1).

Tabela 11.5. Poređenje baznih i dinamičkih vrednosti AIP između pacijenata sa deficitom HR (DHR) i ispitanika sa očuvanom sekrecijom HR (NDHR).

	DHR	NDHR	p*
AIP bazno (ng/ml)	0,155 (0,129-0,203)	0,143 (0,087 -0,339)	0,738
AIPmax (ng/ml)	0,278 (0,155 -0,481)	0,292 (0,160-0,587)	0,738
AIP AUC (ng/ml/120min)	25,90 (14,44-46,35)	24,58 (13,32-46,46)	0,928
AIP Delta	0,43 (0,07 -0,81)	0,69 (0,23 – 1,32)	0,262

**Man-Whitney U Test;*

Podaci su izraženi kao medijane i interkvartilni opseg



Slika 11.1:

A) Maksimalna vrednost AIP u ITT (ng/ml, log skala) kod pacijenata sa deficitom HR (DHR) i ispitanika sa očuvanom sekrecijom HR (NDHR)

B) AIP AUC u ITT (ng/ml/120min, log skala) za grupe DHR i NDHR

C) Delta AIP u ITT (log skala) za grupe DHR i NDHR

11.3.5 Uticaj očuvane supresibilnosti HR na serumski AIP

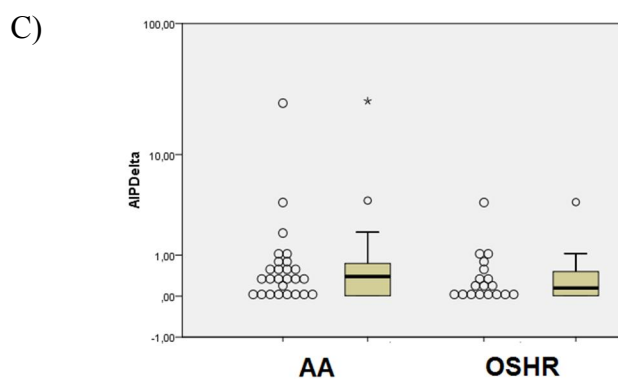
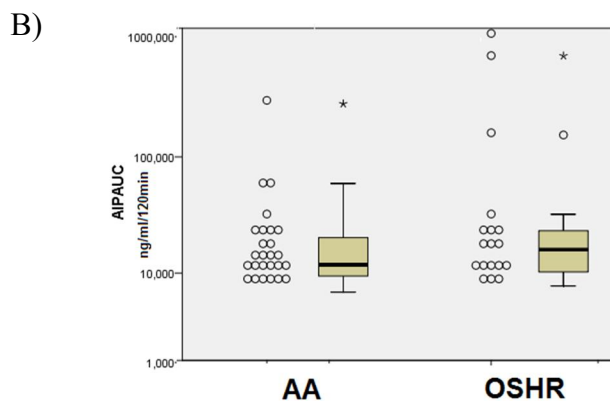
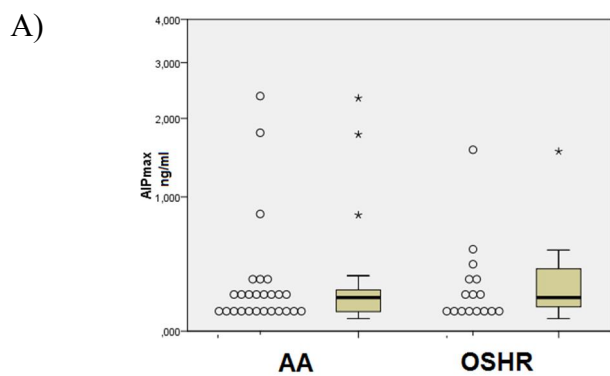
Vrednosti AIP bazno, AIP max, AIP AUC ili AIP Delta nisu se razlikovale značajno između grupa AA i OSHR (Tabela 11.6, Slika 11.2).

Tabela 11.6. Poređenje baznih i dinamičkih vrednosti AIP između pacijenata sa aktivnom akromegalijom (AA) i ispitanika sa očuvanom supresibilnosti HR (OSHR).

	AA	OSHR	p*
AIP bazno (ng/ml)	0,097 (0,068 - 0,151)	0,153 (0,069 -0,293)	0,148
AIPmax (ng/ml)	0,190 (0,106 - 0,237)	0,190 (0,134 - 0,380)	0,371
AIP AUC (ng/ml/120min)	12,85 (10,26-21,88)	16,63 (10,68-23,82)	0,567
AIP Delta	0,380 (0,00-0,722)	0,139 (0,00-0,500)	0,180

**Man-Whitney U Test;*

Podaci su izraženih kao medijane i intrerkvartilni opseg



Slika 11.2:

A) Maksimalna vrednost AIP u toku OGTT (ng/ml, log skala) kod pacijenata sa aktivnom akromegalijom (AA) i ispitanika sa očuvanom sekrecijom HR (OSHR)

B) AIP AUC u OGTT (ng/ml/120min, log skala) u grupama AA i OSHR

C) Delta AIP u OGTT (log skala) u grupama AA i OSHR

11.3.6 Korelacija serumskih nivoa AIP i HR u ITT

Bazne vrednosti AIP nisu značajno korelirale sa baznim vrednostima HR kod pacijenata sa deficitom HR (DHR) niti kod ispitanika sa očuvanom sekrecijom HR (NDHR). Maksimalna

vrednosti AIP u toku ITT (AIPmax) nije korelirala značajno sa maksimalnom vrednošću HR u ITT (HRmax) u grupama DHR ili NDHR. AIP AUC nije korelirala značajno sa vrednošću HR AUC u grupama DHR ili NDHR (Tabela 11.7).

Tabela 11.7. Korelacija baznih i dinamičkih vrednosti AIP i HR u ITT; R- Spearman Rho koeficijent korelacije;

	AIP bazno (ng/ml)	HR bazno (ng/ml)	R	p
DHR	0,155 (0,112-0,326)	0,28 ±0,06	0,121	0,694
NDHR	0,143 (0,087-0,339)	0,45 ±0,11	0,440	0,816
	AIPmax (ng/ml)	HR max (ng/ml)	R	p
DHR	0,292 (0,160-0,587)	1,42 ±0,22	0,385	0,194
NDHR	0,278 (0,146-0,562)	15,09 ±1,12	0,008	0,967
	AIP AUC (ng/ml/120min)	HR AUC (ng/ml/120min)	R	p
DHR	25,90 (13,03-50,03)	89,78 ±13,82	0,462	0,112
NDHR	24,58 (13,32-46,46)	952,44 ±78,15	0,198	0,286

Rezultati su prikazani kao medijane i interkvartilni opseg (vrednosti AIP) ili kao aritmetička sredina i standardna greška (vrednosti HR)

11.3.7 Korelacija vrednosti AIP i PRL u ITT

Korelacija bazne vrednosti AIP sa baznom vrednosti PRL nije bila značajna kod pacijenata sa deficitom HR (DHR) niti kod ispitanika sa očuvanom sekrecijom HR (NDHR). Korelacija maksimalne vrednosti AIP u ITT (AIPmax) i maksimalne vrednosti PRL u ITT (PRLmax) nije bila značajna u grupama DHR niti NDHR. Korelacija AIP AUC u ITT i PRL AUC u ITT nije bila značajna u grupama DHR niti NDHR (Tabela 11.8).

Tabela 11.8 Korelacija baznih i dinamskih vrednosti AIP i PRL u ITT; R- Spearman Rho koeficijent korelacije;

	AIP bazno (ng/ml)	PRL bazno (ng/ml)	R	p
DHR	0,155 (0,112-0,326)	600,69 ±85,22	0,440	0,887
NDHR	0,143 (0,087-0,339)	1355,97 ±279,86	0,154	0,409
	AIPmax (ng/ml)	PRL max (ng/ml)	R	p
DHR	0,292 (0,160-0,587)	776,15±107,09	0,302	0,316
NDHR	0,278 (0,146-0,562)	3323,29±410,88	0,212	0,253
	AIP AUC (ng/ml/120min)	PRL AUC (ng/ml/120min)	R	p
DHR	25,90 (13,03-50,03)	77944,62±10974,36	0,363	0,223
NDHR	24,58 (13,32-46,46)	272615,32±37440,48	0,222	0,231

Rezultati su prikazani kao medijane i interkvartilni opseg (vrednosti AIP) ili kao aritmetička sredina i standardna greška (vrednosti PRL)

11.3.8 Korelacija vrednosti AIP i kortizola u ITT

Korelacija baznih vrednosti AIP i kortizola nije bila značajna kod pacijenata sa deficitom HR (DHR) niti kod ispitanika sa očuvanom sekrecijom HR (NDHR). Korelacija maksimalne vrednosti AIP u ITT (AIPmax) i maksimalne vrednosti kortizola u ITT (kortizol max) nije bila značajna kod pacijenata sa deficitom HR (DHR) niti kod ispitanika sa očuvanom sekrecijom HR (NDHR). Korelacija vrednosti AIP AUC u ITT i kortizol AUC u ITT nije bila značajna kod pacijenata sa deficitom HR (DHR) niti kod ispitanika sa očuvanom sekrecijom HR (NDHR). (Tabela 11.9).

Tabela 11.9. Korelacija baznih i dinamskih vrednosti AIP i kortizola u ITT; R- Spearman Rho koeficijent korelacije;

	AIP bazno (ng/ml)	Kortizol bazno (ng/ml)	R	p
DHR	0,155 (0,112-0,326)	354,08±33,71	-0,119	0,713
NDHR	0,143 (0,087-0,339)	337,48±21,70	-0,058	0,755
	AIPmax (ng/ml)	Kortizol max (ng/ml)	R	p
DHR	0,292 (0,160-0,587)	710,02±51,34	-0,084	0,795
NDHR	0,278 (0,146-0,562)	636,89±23,57	0,216	0,252
	AIP AUC (ng/ml/120min)	Kortizol AUC (ng/ml/120min)	R	p
DHR	25,90 (13,03-50,03)	64674,25±4134,00	0,147	0,649
NDHR	24,58 (13,32-46,46)	58583,81±1972,07	0,208	0,262

Rezultati su prikazani kao medijane i interkvartilni opseg (vrednosti AIP) ili kao aritmetička sredina i standardna greška (vrednosti kortizola)

11.3.9 Korelacija vrednosti AIP i HR u OGTT

Korelacija baznih vrednosti AIP i bazne vrednosti HR ili najniže vrednosti HR (HR nadir) u OGTT nije bila značajna kod pacijenata sa aktivnom akromegalijom (AA) niti kod ispitanika sa očuvanom supresibilnošću HR (OSHR). Korelacija maksimalne vrednosti AIP (AIPmax) u OGTT sa maksimalnom vrednošću HR (HRmax) u OGTT nije bila značajna kod pacijenata sa AA niti u grupi OSHR. Korelacija AIP AUC sa HR AUC ili sa HRnadir u OGTT nije bila značajna u grupi AA niti u grupi OSHR (Tabela 6.10).

Tabela 11.10. Korelacija baznih i dinamskih vrednosti AIP i HR u OGTT; R- Spearman Rho koeficijent korelacije;

	AIP bazno (ng/ml)	HR bazno (ng/ml)	R	p
AA	0,096 (0,067-0,159)	14,73±3,25	0,061	0,768
OSHR	0,153 (0,068-0,302)	0,56±0,08	0,204	0,416
	AIP bazno (ng/ml)	HR nadir (ng/ml)	R	p
AA	0,096 (0,067-0,159)	11,27±2,90	0,079	0,702
OSHR	0,153 (0,068-0,302)	0,29±0,05	0,140	0,580
	AIPmax (ng/ml)	HR max (ng/ml)	R	p
AA	0,190 (0,106-0,247)	17,23±3,46	0,195	0,340
OSHR	0,190 (0,132-0,415)	0,82±0,18	0,087	0,731
	AIP AUC (ng/ml/120min)	HR AUC (ng/ml/120min)	R	p
AA	12,85 (9,97-22,16)	1692,46±378,23	0,263	0,194
OSHR	16,63 (10,46-26,00)	52,57±7,71	0,176	0,484
	AIP AUC (ng/ml/120min)	HR nadir (ng/ml)	R	p
AA	12,85 (9,97-22,16)	11,27±2,90	0,273	0,178
OSHR	16,63 (10,46-26,00)	0,29±0,05	0,141	0,577

Rezultati su prikazani kao medijane i interkvartilni opseg (vrednosti AIP) ili kao aritmetička sredina i standardna greška (vrednosti HR)

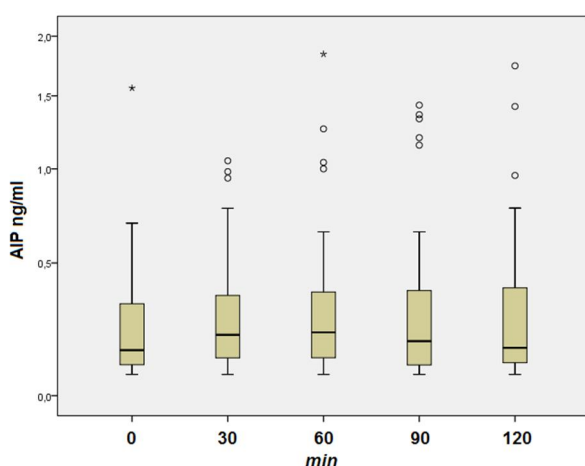
11.3.10 Dinamika serumskog AIP u toku ITT

Razlika između vrednosti serumskog AIP u 0, 30, 60, 90 i 120 minutu ITT nije bila značajna kod pacijenata sa deficitom HR (DHR) niti kod ispitanika sa očuvanom sekrecijom HR (NDHR) niti zajedno kod svih ispitanika kod kojih je sproveden ITT (n=44) (Tabela 11.11, Slika 11.3).

Tabela 11.11. Vrednosti serumskog AIP bazno i u toku ITT

	DHR (n=13)	NDHR (n=31)	Svi (n=44)
AIP _{0min} (ng/ml)	0,155 (0,129-0,203)	0,143 (0,087-0,339)	0,149 (0,097-0,332)
AIP _{30min} (ng/ml)	0,140 (0,99-0,385)	0,210 (0,128-0,341)	0,204 (0,120-0,367)
AIP _{60min} (ng/ml)	0,198 (0,127-0,299)	0,245 (0,119-0,382)	0,214 (0,121-0,377)
AIP _{90min} (ng/ml)	0,192 (0,084-0,331)	0,173 (0,103-0,511)	0,181 (0,096-0,397)
AIP _{120min} (ng/ml)	0,155 (0,133-0,405)	0,160 (0,088-0,375)	0,158 (0,105-0,398)
p*	0,962	0,174	0,293

*Friedman test; DHR – deficit HR; NDHR – očuvana sekrecija HR; Rezultati su prikazani kao medijane i interkvartilni opseg



Slika 11.3: Serumski AIP (ng/ml, log skala) u 0, 30, 60, 90 i 120 minutu ITT (svih 44 ispitanika)

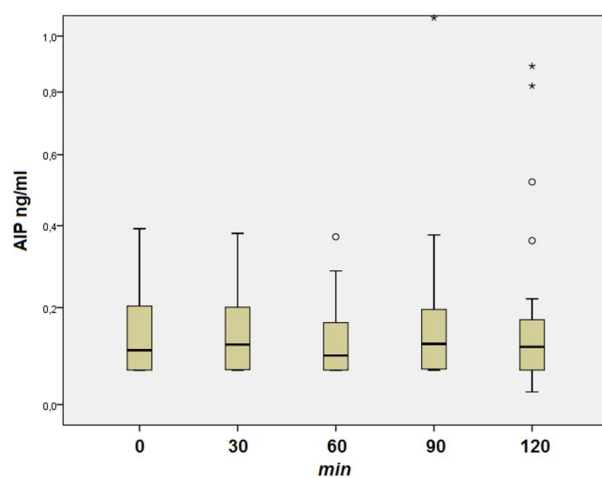
11.3.11 Dinamika serumskog AIP u toku OGTT

Razlika između vrednosti serumskog AIP u 0, 30, 60, 90 i 120. minutu OGTT nije bila značajna kod pacijenata sa aktivnom akromegalijom (AA) niti kod ispitanika sa očuvanom supresibilnošću HR (OSHR) niti kod svih ispitanika zajedno kod kojih je sproveden OGTT (n=44) (Tabela 6.12, Slika 6.4).

Tabela 11.12. Vrednosti serumskog AIP bazno i u toku OGTT;

	AA (n=26)	OSHR (n=18)	Svi (n=44)
AIP _{0min} (ng/ml)	0,097 (0,068-0,151)	0,153 (0,069-0,293)	0,108 (0,068-0,204)
AIP _{30min} (ng/ml)	0,110 (0,069-0,184)	0,148 (0,068-0,224)	0,120 (0,068-0,178)
AIP _{60min} (ng/ml)	0,076 (0,068-0,189)	0,125 (0,102-0,145)	0,096 (0,068-0,178)
AIP _{90min} (ng/ml)	0,105 (0,084-0,197)	0,127 (0,068-0,190)	0,121 (0,068-0,196)
AIP _{120min} (ng/ml)	0,104 (0,068-0,155)	0,126 (0,068-0,361)	0,114 (0,068-0,175)
p*	0,118	0,152	0,188

* Friedman test AA – aktivna akromegalija; OSHR – očuvana supresibilnost HR; Rezultati su prikazani kao medijane i interkvartilni opseg



Slika 11.4: Serumski AIP (ng/ml, log skala) u 0, 30, 60, 90 i 120 minutu OGTT (svih 44 ispitanika)

12. DISKUSIJA REZULTATA ISTRAŽIVANJA NA LJUDSKOM MODELU

Protein koji interreaguje sa aril hidrokarbon receptorom (AIP), ko-šaperon povezan sa funkcionisanjem aril hidrokarbon receptora (AhR) pokazuje veliki stepen evolutivne očuvanosti među vrstama, kao i veliku rasprostanjenost širom organizma sa uključivanjem u širok spektar međuproteinskih interakcija. (Ibanez Costa A *et al* 2017) Homozigotne inaktivacione *AIP* mutacije dovode do embrionalne smrtnosti kod eksperimentalnih miševa usled kardiovaskularnih malformacija (Lin BC *et al* 2007) i do smrtnosti u larvalnom stadijumu eksperimentalnih insekata (*Drosophila*) (Aforei ED *et al* 2018) Heterozigotne inaktivacione mutacije *AIP* gena povezane su sa nastankom adenoma hipofize (AH) (Aforei ED *et al* 2014, Lim CT *et al* 2018) Uloga i mehanizmi uticaja AIP proteina u tumorigenezi AH se intenzivno istražuju, dok je njegova uloga u normalnoj funkciji hipofize velikim delom nepoznata. Mnogi drugi molekularni ko-šaperoni se, pored svojih intraćelijskih uloga, takođe sekretuju i imaju ulogu udaljenih medijatora uključenih između ostalog u imunskim i inflamatornim procesima. (Henderson B, *et al* 2010) AIP je pokazan kao regulator funkcije sinaptičkih vezikula koje dele mnoge zajedničke odlike sa endokrinim sekretornim vezikulama. (Chen B, *et al* 2017) AIP protein je identifikovan i analiziran u humanoj plazmi proteomičkom metodom, i pokazan je njegov porast vezan za obrok u podgrupi gojaznih osoba. (Trush AB, *et al* 2018) Tačan izvor, uloga i značaj cirkulišućeg AIP nisu ranije ispitivani. U objavljenoj literaturi, nema podataka o istraživanjima koja su uključivala imunometrijski AIP esej. Metodama elektromikroskopije i dvostruke imunofluorescencije pokazana je kolokalizacija AIP sa HR ili PRL (u sekretornim vezikulama) u normalnim ćelijama hipofize i u ćelijama somatotropinoma. (Leontiu CA *et al* 2008) Iako je AIP protein identifikovan u brojnim humanim tkivima, subćelijska lokalizacija u sekretorne vezikule je pokazana jedino kod somatotrofa i laktotrofa. (Leontiu CA, *et al* 2008)

Na osnovu rezultata prethodnih istraživanja koja su ukazivala na kolokalizaciju AIP sa HR u sekretornim vezikulama somatotrofa u normalnoj i adenomatoznoj hipofizi (Leontiu CA *et al* 2008), kao i na osnovu saznanja o prisustvu i mogućem dinamičnom ponašanju molekula AIP proteina u plazmi (Trush AB, *et al* 2018) i poznate uloge AIP u vezi sa sinaptičkim vezikulama, kao i poznate endokrine uloge molekula blisko srodnih AIP (FKBP porodica) – (Zhang M, *et al* 2018) (Valentine A, *et al* 2011) ova studija je preduzeta sa ciljem utvrđivanja serumskih cirkulišućih vrednosti AIP i testiranja hipoteze o mogućoj paralelnoj kosekreciji AIP i HR na *in vivo* ljudskim modelima: očuvane sekrecije HR, deficita sekrecije HR, nekontrolisane hipersekrecije HR (akromegalija) i uredne supresibilnosti HR. Dinamika serumskog AIP u testovima stimulacije HR (ITT) ili supresije HR (OGTT) je proučavana u

poređenju sa odgovorom HR u istim testovima, poredeći ispitanike sa očuvanom sekrecijom HR, sa deficitom HR, nesupresibilnom hipersekrecijom HR ili urednom supresibilnošću HR. Grupe ispitanika se nisu razlikovale u odnosu na uzrast i ITM.

Koristeći novorazvijeni autohtoni imunometrijski AIP esej (razvijen u laboratoriji Prof Christian Strasburgera, Berlin, Nemačka), serumski AIP je uspešno i pouzdano meren u serumu 88 ispitanika u 5 vremenskih uzoraka u dinamskim testovima. Kod svih ispitanika je vrednost serumskog AIP konzistentno bila u koncentraciji reda veličine 0,1 ng/ml. Bazne vrednosti AIP bile su nezavisne od uzrasta, pola i ITM. Serumski AIP je u svim ispitivanim grupama bio stabilan u uzorcima uzetim u intervalima od 30 minuta tokom 2 sata, i nije se menjao pod uticajem značajne hipoglikemije (u ITT testu) ili hiperglikemije (u OGTT).

Uprkos prethodno pokazanoj kolokalizaciji AIP i HR u sekretornim vezikulama, rezultati naše studije pokazuju da su serumske koncentracije AIP nezavisne od koncentracije HR bilo bazno ili pri stimulaciji sekrecije HR (u ITT) ili pri supresiji sekrecije HR (u OGTT). Nije bilo značajne razlike u vrednostima AIP (baznoj, maksimalnoj ili integrisanoj) između ispitanika sa deficitom HR (DHR) i ispitanika sa očuvanom sekrecijom HR (NDHR), niti između ispitanika sa aktivnom akromegalijom (AA – nesupresibilna hipersekrecija HR) i ispitanika sa očuvanom supresibilnošću HR (OSHR). Koncentracije serumskog AIP i HR nisu značajno korelirale niti bazno, niti u toku ITT ili OGTT. Rezultati našeg istraživanja direktno pokazuju da je AIP stabilan u ljudskoj cirkulaciji tokom vremena (pet uzoraka unutar 2h) i da ne podleže uticaju značajne hipoglikemije ili hiperglikemije, značajnog porasta HR, kortizola i PRL (direktno pokazano) ili ACTH (indirektno, na osnovu fiziologije odgovora osovine hipotalamus-hipofiza-nadbubreg u ITT).

Prethodna studija u kojoj je istraživan AIP u plazmi, proteomičkom metodom (SOMAmer) ukazala je na značajan porast relativnog nivoa AIP nakon obroka bogatog mastima (trostruko u odnosu na baznu vrednost, tokom 6 sati) kod gojaznih otpornih na dijetu (nasuprot odsustvu porasta kod gojaznih osetljivih na dijetu). (Thrush AB *et al.* 2018) Naši rezultati na ispitanicima prosečnog ITM $28,4 \pm 0,8$ kg/m² (svh 44 ispitanika podvrgnutih OGTT) pokazuju odsustvo promene koncentracije serumskog AIP tokom 2 sata nakon oralnog opterećenja glukozom.

Nekoliko mogućih hipoteza objašnjava neslaganje između odsustva kosekrecije AIP i HR, koje smo dokazali, i prethodnih nalaza dokazane kolokalizacije AIP i HR u sekretornim vezikulama somatotrofa. Kolokalizacija dva molekula u istom subćelijskom regionu ne mora nužno da bude potvrda njihove interakcije ili paralelizma u sekreciji. Tehnike prostorne kolokalizacije ne mogu da nedvosmisleno razdvoje funkcionalnu interakciju od slučajne

kolokalizacije. Na osnovu same kolokalizacije se ne može tvrditi o postojanju bilo kakve povezanosti među molekulima, i ona se mora dokazati drugim metodama. (Moser B, 2017)

Nekoliko drugih primera vezanih za hipofizne i druge endokrine ćelije, pružaju moguću paradigmu za tumačenje naših nalaza. (Nilsson O, *et al.* 1991) (Ceresini G, *et al.* 1997)(Moore JP, *et al.* 1999) (Abel MH, *et al.* 2014) (Stamatiades GA, Kaiser UB 2018) (Martinez-Moreno CG, *et al.* 2015)(Wang Z, *et al.* 2015).

FSH i LH sekretuju se iz iste gonadotropne ćelije, ali pokazuju različitu sekretornu dinamiku u toku menstrualnog ciklusa, u različitom odgovoru molekulske sekretorne kaskade na razlike u amplitudi i frekvenci pulsa GnRH. (Abel MH *et al.* 2014)(Stamatiades GA. Kaiser UB 2018). Ovo se pripisuje razlikama u podtipu sekretornih vezikula u zavisnosti od njihovog sastava (samo FSH ili LH ili oba hormona), sadržaja sekretornih granina (sekretogranin-II ili hromogranin A) i udaljenosti od ćelijske membrane (Abel MH *et al.* 2014) (Stamatiades GA, Kaiser UB 2018).

Za sekretoneurin, derivat sekretogranina, elektronskom mikroskopijom je pokazano da je uskladišten zajedno sa HR u sekretornim vezikulama retinalnih ganglionarnih ćelija i da podleže zajedničkoj konstitutivnoj sekreciji sa HR. Međutim, za razliku od HR sekretoneurin nije *in vitro* pokazivao odgovor na stimulaciju sa GHRH. (Martinez-Moreno CG *et al.* 2015).

Galanin, modulatorni neuropeptid, kolokalizovan je u zdravim i adenomatoznim ljudskim kortikotrofima, a u laktotrofima, somatotrofima i tireotrofima glodara. *In vitro* sekrecija HR i granina pod stimulacijom sa GHRH pokazana je na mutantnim ćelijama hipofize pacova. Međutim, pokazano je odsustvo kosekrecije galanina i hormona prednjeg režnja hipofize, što je pripisano ili oslobađanju pod dejstvom različitih stimulusa ili ograničenim doprinosom hipofizne sekrecije ukupnoj koncentraciji cirkulišućeg galanina. (Ceresini G *et al.* 1997) (Moore JP *et al.* 1999).

Insulin i glukagon su kolokalizovani u ćelijama insulinoma i u razvojnim fazama pankreasnih endokrinih ćelija, ali njihova diskordantna sekrecija je tumačena činjenicom da se čuvanju u različitim sekretornim vezikulama (Wang Z *et al.* 2015).

PYY i GLP-1 su kolokalizovani u ćelijama creva ali sa preferencijalnim oslobađanjem jednog od dva molekula u različitim uslovima. (Nilsson O *et al.* 1991).

S obzirom na ubikvitarnu ekspresiju AIP, učešće hipofizne sekrecije AIP u ukupnoj cirkulatornoj koncentraciji AIP možda je samo delimično ili čak zanemarljivo. Rezultati drugih studija pokazuju RNK ekspresiju AIP u 36 tkiva čoveka. (Su AI, *et al.* 2004). Naši rezultati o postojanju merljivih serumskih koncentracija AIP na nivou proseka cele ispitivane grupe, čak i kod dvoje pacijenata sa kompletnom insuficijencijom prednjeg režnja hipofize (od kojih jedan

i sa insuficijencijom zadnjeg režnja hipofize - centralnim dijabetes insipidusom) dalo bi na snazi ovakvom mogućem objašnjenju. Nedavno je pokazana uloga AIP u limfocitima koji takođe mogu predstavljati izvor cirkulišućeg AIP (Sun D, *et al* 2018).

Uska korelacija između cirkulišućeg nivoa AIP i HR može takođe da bude pomućena velikom diskrepancom u dužini polu-života ova dva proteina. Poluživot AIP je ranga 30h a HR samo 16 minuta.

Moguće ograničenje dizajna naše studije je što su uzorci krvi za serumsku analizu AIP uzimani (prema standardnim protokolima za ITT i OGTT) iz periferne vene. Istovremena analiza periferne venske krvi i uzoraka iz petroznih venskih sinusa, bolje bi razjasnila moguće hipofizno poreklo cirkulatornog AIP, analizom centralno-perifernog gradijenta. Ipak, dug poluživot AIP navodi na očekivanje da ovaj molekul bude pouzdano merljiv i u perifernoj venskoj krvi bez obzira na izvor.

Moguće je da AIP ima prevashodno autokrinu ili parakrinu ulogu (možda u modulaciji sekrecije HR, s obzirom na kolokalizaciju) te da su merljive serumske koncentracije samo posledica ćelijske smrti ili oštećenja i curenja iz ćelija, a ne regulisani sekretorni fenomen. AIP molekulu nedostaju neke od tipičnih odlika sekretornih peptida, na primer signalna sekvenca ili mesta glikozilacije. Ipak, postoje i drugi molekuli koji se sekretuju bez mesta glikozilacije (n.pr feritin) ili bez signalnih peptida (n. pr FGF1 ili IL-6) uključujući i srodnike AIP proteina iz porodice imunofilina (n. pr. FKBPL ili ciklofilin A) (Yakkundi A, *et al* 2015) (Zhang M *et al.* 2018). U endokrinim ćelijama kosekretujući molekuli koji nisu deo glavnog prohormona su najčešće prisutni u koncentracijama 100 do 1000 puta manjim od osnovnog sekretornog proizvoda, i uglavnom su odgovorni za autokrine ili parakrine efekte. Naši rezultati pokazuju za serumski AIP da je konzistentno u koncentracijama istog reda veličine kao i serumski HR (kod zdravih).

Stimulacija HR u ITT je dominantno posredovana promenama na supra-hipotalamusnom nivou sa posledičnim oslobađanjem GHRH i inhibicijom somatostatina, uz manji uticaj delovanja direktno na hipofiznom nivou. (Salvatori R, *et al* 2006). Drugi stimulusi sekrecije HR (n. pr grelin) teoretski bi mogli biti zanemareni korišćenjem hipoglikemije kao stimulusa (ITT u našoj studiji) a možda bi imali drugačiji uticaj na sekreciju HR. Pored toga, dokazana heterogenost subpopulacija hipofiznih HR ćelija sa različitom osetljivošću na različite stimulse, takođe bi teoretski mogla biti u osnovi diskrepance u sekreciji HR i AIP. (Dobado-Berrios PM, *et al* 1996).

Moguće je da individualna izloženost pacijenata ksenobioticima može uticati na sekretorni odgovor AIP. U našoj studiji nismo prikupljali niti analizirali podatke o izloženosti

ispitanika štetnim agensima spoljne sredine. Hipotetički, stepen angažovanja AhR u detoksikaciji mogao bi da utiče na intraceljsku distribuciju AIP a time i na njegovu sekreciju.

Analiza serumskog cirkulišućeg AIP mogla bi naći potencijalnu primenu u polju istraživanja hemijskih endokrinih disratora – hemijskih jedinjenja iz spoljne sredine koja utiču na poremećaj endokrinog sistema ljudi.

Sva ova pitanja najbolje bi bila razjašnjena daljim istraživanjima u ovoj oblasti. Naši rezultati ostavljaju otvorenim pitanje o fiziološkom značaju cirkulišućeg AIP ali pružaju solidnu platformu pouzdane *in vivo* analitike humanog cirkulišućeg AIP proteina imunometrijskim esejom. Pokazana je nezavisnost serumskog AIP od uzrasta, pola i ITM kao i značajna stabilnost u cirkulaciji nezavisno od hipoglikemije, hiperglikemije i porasta koncentracije serumskog HR, PRL, kortizola i ACTH.

13. ZAKLJUČAK ISTRAŽIVANJA NA LJUDSKOM MODELU

Serumski aril hidrokarbon receptor interreagujući protein (AIP) po prvi put je pouzdano meren *in vivo* u ljudskom serumu imunometrijskom metodom. Serumski nivo AIP nezavistan je od uzrasta, pola i ITM i na njega ne utiču hipoglikemija niti hiperglikemija. Porast serumskog HR, ACTH, kortizola i PRL nije praćen promenama serumske koncentracije AIP. Nasuprot očekivanjima baziranim na studijama o njihovoj kolokalizaciji u sekretornim vezikulama, nije pokazano postojanje bilo konstitutivne ili stimulisane kosekrecije HR i AIP. S obzirom na to da je AIP evolutivno visoko očuvan protein, široke rasprostranjenosti u organizmu i neophodan za preživljavanje, sada uspostavljena pouzdana platforma za imunometrijsku analizu njegove serumske koncentracije pružiće osnovu za dalje istraživanje njegovog izvora, uloge i značaja.

14. ZAKLJUČCI:

1. Rasprostranjenost ekspresije *AIP* gena na modelu zebrice (*Danio rerio*) i posledice inaktivacije *AIP* na rast i razvoj (značajan zaostatak u rastu i anomalije mozga i perikarda) ukazuju na važnost ovog gena za opstanak i njegovu široku ulogu u embrionalnom razvoju.
2. Uticaj inaktivacije *AIP* gena na modelu zebrica na uvećanje i izmene oblika i pozicije hipofize sugerišu tumor-supresorsku ulogu *AIP* gena na nivou hipofize.
3. Humani AIP protein prisutan je u serumu, stabilan i nezavistan od pola, uzrasta, uhranjenosti, hiper ili hipoglikemije.
4. Serumski AIP je nezavistan od sekrecije HR, uprkos ranije dokazanoj kolokalizaciji u sekretornim vezikulama somatotrofa.

15. LITERATURA:

Abel MH, Widen A, Wang X, Huhtaniemi I, Pakarinen P, Kumar TR, Christian HC. Pituitary gonadotrophic hormone synthesis, secretion, subunit gene expression and cell structure in normal and follicle-stimulating hormone β knockout, follicle-stimulating hormone receptor knockout, luteinising hormone receptor knockout, hypogonadal and ovariectomised female mice. *J Neuroendocrinol.* 2014 Nov;26(11):785-95.

Aflorei ED, Chen C, McGonnel IM et al. Development of Novel AIP (Aryl Hydrocarbon Receptor Interacting Protein) Gene Study Models Using the Fruitfly and the Zebrafish. 15th International Congress of Endocrinology, Florence, Italy 2012;5-9 May.

Aflorei ED, Klapholz B, Chen C, Radian S, Dragu AN, Moderau N, Prodromou C, Ribeiro PS, Stanewsky R, Korbonits M. In vivo bioassay to test the pathogenicity of missense human AIP variants. *J Med Genet.* 2018 Aug;55(8):522-529.

Aflorei ED, Korbonits M. Epidemiology and etiopathogenesis of pituitary adenomas. *J Neurooncol.* 2014;117(3):379-94.

Agustsson TT, Baldvinsdottir T, Jonasson JG, Olafsdottir E, Steinthorsdottir V, Sigurdsson G, Thorsson AV, Carroll PV, Korbonits M, Benediktsson R. The epidemiology of pituitary adenomas in Iceland, 1955-2012: a nationwide population-based study. *Eur J Endocrinol.* 2015 Nov;173(5):655-64.

Asa SL. Practical pituitary pathology: what does the pathologist need to know? *Arch Pathol Lab Med.* 2008 Aug;132(8):1231-40

Ballmann C, Thiel A, Korah HE, Reis AC, Saeger W, Stepanow S, Kohrer K, Reifenberger G, Knobbe-Thomsen CB, Knappe UJ, et al. USP8 mutations in pituitary cushing adenomas-targeted analysis by nextgeneration sequencing. *Journal of the Endocrine Society* 2018 (2) 266–278.

Bauer, F.E., Ginsberg, L., Venetikou, M., MacKay, D.J., Burrin, J.M., Bloom, S.R., Growth hormone release in man induced by galanin, a new hypothalamic peptide. 1986.*Lancet* (2), 192–195.

Beckers A, Aaltonen LA, Daly AF, Karhu A. Familial isolated pituitary adenomas (FIPA) and the pituitary adenoma predisposition due to mutations in the aryl hydrocarbon receptor interacting protein (AIP) gene. *Endocr Rev.* 2013 Apr;34(2):239-77.

Bertagna X, Guignat L, Groussin L, Bertherat J. Cushing's disease. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2009 Oct;23(5):607-23.

Bill BR, Petzold AM, Clark KJ, Schimmenti LA, Ekker SC. A primer for morpholino use in zebrafish. *Zebrafish* 2009 (6) 69–77.

Bourque C, Houvras Y. Hooked on zebrafish: insights into development and cancer of endocrine tissues. *Endocrine-Related Cancer* 2011 (18) R149–R164.

Brandriff BF, Gordon LA, Trask BJ. DNA sequence mapping by fluorescence in situ hybridization. *Environ Mol Mutagen.* 1991;18(4):259-62.

Caimari F, Korbonits M. Novel Genetic Causes of Pituitary Adenomas. *Clin Cancer Res.* 2016;22(20):5030-5042.

Cannavò S, Ferrau F, Ragonese M, Curtò L, Torre ML, Magistri M, Marchese A, Alibrandi A, Trimarchi F. Increased prevalence of acromegaly in a highly polluted area. *Eur J Endocrinol.* 2010;163(4):509-13.

Cannavo S, Ragonese M, Puglisi S, Romeo PD, Torre ML, Alibrandi A, Scaroni C, Occhi G, Ceccato F, Regazzo D, De Menis E, Sartorato P, Arnaldi G, Trementino L, Trimarchi F, Ferrau F. Acromegaly Is More Severe in Patients With AHR or AIP Gene Variants Living in Highly Polluted Areas. *J Clin Endocrinol Metab.* 2016;101(4):1872-9.

Cannavo S, Trimarchi F, Ferrau F. Acromegaly, genetic variants of the aryl hydrocarbon receptor pathway and environmental burden. *Mol Cell Endocrinol.* 2017; 457:81-88.

Carreno G, Gonzalez-Meljem JM, Haston S, Martinez-Barbera JP. Stem cells and their role in pituitary tumorigenesis. *Mol Cell Endocrinol.* 2017;445:27-34.

Carver LA & Bradfield CA. Ligand-dependent interaction of the aryl hydrocarbon receptor with a novel immunophilin homolog in vivo. *Journal of Biological Chemistry* 1997 272 11452-11456

Cazabat L, Souberbielle JC, Chanson P. Dynamic tests for the diagnosis and assessment of treatment efficacy in acromegaly. *Pituitary.* 2008;11(2):129-39.

Ceresini G, Marchini L, Fabbo A, Freddi M, Pasolini G, Reali N, Troglio G, Valenti G. Evaluation of circulating galanin levels after exercise-induced pituitary hormone secretion in man. *Metabolism.* 1997;46(3):282-6.

Chahal HS, Trivellin G, Leontiou CA, Alband N, Fowkes RC, Tahir A, Igreja SC, Chapple JP, Jordan S, Lupp A, Schulz S, Ansorge O, Karavitaki N, Carlsen E, Wass JA, Grossman AB, Korbonits M. Somatostatin analogs modulate AIP in somatotroph adenomas: the role of the ZAC1 pathway. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012;97(8)

Chen B, Liu P, Hujber EJ, Li Y, Jorgensen EM, Wang ZW. AIP limits neurotransmitter release by inhibiting calcium bursts from the ryanodine receptor. *Nat Commun.* 2017;8(1):1380.

Chen S, Liang MC, Chia JN, Ngsee JK, Ting AE. Rab8b and its interacting partner TRIP8b are involved in regulated secretion in AtT20 cells. *J Biol Chem.* 2001 20;276(16):13209-16.

Chesnokova V, Zonis S, Ben-Shlomo A, Wawrowsky K, Melmed S. Molecular mechanisms of pituitary adenoma senescence. *Front Horm Res.* 2010;38:7-14.

Daly AF, Tichomirowa MA, Petrossians P, Heliövaara E, Jaffrain-Rea ML, Barlier A, Naves LA, Ebeling T, Karhu A, Raappana A, et al. 2010 Clinical characteristics and therapeutic responses in patients with germ-line AIP mutations and pituitary adenomas: an international collaborative study. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 95 E373-383. (10.1210/jc.2009-2556)

Daly AF, Vanbellinhen JF, Khoo SK, Jaffrain-Rea ML, Naves LA, Guitelman MA, Murat A, Emy P, Gimenez-Roqueplo AP, Tamburrano G, et al. 2007 Aryl hydrocarbon receptor-interacting protein gene mutations in familial isolated pituitary adenomas: analysis in 73 families. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 92 1891-1896.

Dean I, Dzinic SH, Bernardo MM, Zou Y, Kimler V, Li X, Kaplun A, Granneman J, Mao G, Sheng S. The secretion and biological function of tumor suppressor maspin as an exosome cargo protein. *Oncotarget.* 2017;8(5):8043-8056.

Dobado-Berrios PM, Ruiz-Navarro A, Lopez-Pedreira R, Gonzalez de Aguilar JL, Torronteras R, Hidalgo-Diaz C, Gracia-Navarro F. Heterogeneity of growth hormone (GH)-producing cells in aging male rats: in vitro GH releasing activity of somatotrope subpopulations. *Mol Cell Endocrinol.* 1996;123(2):127-37.

Eisen JS, Smith JC. Controlling morpholino experiments: don't stop making antisense. *Development.* 2008 May;135(10):1735-43.

Fagerberg L, Hallstrom BM, Oksvold P, Kampf C, Djureinovic D, Odeberg J, Habuka M, Tahmasebpour S, Danielsson A, Edlund K, Asplund A, Sjöstedt E, Lundberg E, Szigartyo CA,

Skogs M, Takanen JO, Berling H, Tegel H, Mulder J, Nilsson P, Schwenk JM, Lindskog C, Danielsson F, Mardinoglu A, Sivertsson A, von Feilitzen K, Forsberg M, Zwahlen M, Olsson I, Navani S, Huss M, Nielsen J, Ponten F, Uhlén M. Analysis of the human tissue-specific expression by genome-wide integration of transcriptomics and antibody-based proteomics. *Molecular and Cellular Proteomics* 2014 13 397–406.

Foley KP, Leonard MW, Engel JD. Quantitation of RNA using the polymerase chain reaction. *Trends Genet.* 1993 Nov;9(11):380-5.

Formosa R, Vassallo J. The Complex Biology of the Aryl Hydrocarbon Receptor and Its Role in the Pituitary Gland. *Horm Cancer.* 2017;8(4):197-210

Formosa, R., Xuereb-Anastasi, A., Vassallo, J., 2013. AIP regulates cAMP signalling and growth hormone secretion 1 in GH3 cells. *Endocr. Relat. Cancer* 20, 495–505.

Fortunati N, Guaraldi F, Zunino V, Penner F, D'Angelo V, Zenga F, Pecori Giraldi F, Catalano MG, Arvat E. Effects of environmental pollutants on signaling pathways in rat pituitary GH3 adenoma cells. *Environ Res.* 2017;158:660-668.

Gadella MR, Kasuki L, Korbonits M. Novel pathway for somatostatin analogs in patients with acromegaly. *Trends Endocrinol Metab.* 2013;24(5):238-46.

Gesmundo I, Villanova T, Banfi D, Gamba G, Granata R. Role of Melatonin, Galanin, and RFamide Neuropeptides QRFP26 and QRFP43 in the Neuroendocrine Control of Pancreatic β -Cell Function. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2017;8:143

Gillam MP, Ku CR, Lee YJ, Kim J, Kim SH, Lee SJ, Hwang B, Koo J, Kineman RD, Kiyokawa H, Lee EJ. Somatotroph-Specific Aip-Deficient Mice Display Pretumorigenic Alterations in Cell-Cycle Signaling. *J Endocr Soc.* 2017 13;1(2):78-95.

Henderson B, Pockley AG. Molecular chaperones and protein-folding catalysts as intercellular signaling regulators in immunity and inflammation. *J Leukoc Biol.* 2010;88(3):445-62.

Hernández-Ramírez LC, Gabrovská P, Dénes J, Stals K, Trivellin G, Tilley D, Ferraù F, Evanson J, Ellard S, Grossman AB, et al. 2015 Landscape of familial isolated and young-onset pituitary adenomas: prospective diagnosis in AIP mutation carriers. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 100 E1242-1254. (10.1210/jc.2015-1869)

Hernández-Ramírez LC, Martucci F, Morgan RM, Trivellin G, Tilley D, Ramos-Guajardo N, Iacovazzo D, D'Acquisto F, Prodromou C, Korbonits M. Rapid Proteasomal Degradation of

Mutant Proteins Is the Primary Mechanism Leading to Tumorigenesis in Patients With Missense AIP Mutations. *J Clin Endocrinol Metab.* 2016;101(8):3144-54.

Hernandez-Ramirez LC, Morgan RML, Barry S, D'Acquisto F, Prodromou C & Korbonits M Multi-chaperone function modulation and association with cytoskeletal proteins are key features of the function of AIP in the pituitary gland. *Oncotarget* 2018 (9) 9177–9198.

Ho KK, Consensus guidelines for the diagnosis and treatment of adults with GH deficiency II: a statement of the GH Research Society in association with the European Society for Pediatric Endocrinology, Lawson Wilkins Society, European Society of Endocrinology, Japan Endocrine Society, and Endocrine Society of Australia. *Eur J Endocrinol.* 2007;157(6):695-700.

Ibáñez-Costa A, Korbonits M. AIP and the somatostatin system in pituitary tumours. *J Endocrinol.* 2017;235(3):R101-R116.

Igreja S, Chahal HS, King P et al. Characterization of aryl hydrocarbon receptor interacting protein (AIP) mutations in familial isolated pituitary adenoma families. *Hum Mutat* 2010;31:950960.

Jaffrain-Rea ML, Rotondi S, Turchi A, Occhi G, Barlier A, Peverelli E, Rostomyan L, Defilles C, Angelini M, Oliva MA, et al. 2013 Somatostatin analogues increase AIP expression in somatotropinomas, irrespective of Gsp mutations. *Endocrine-Related Cancer* 20 753-766. (10.1530/ERC-12-0322)

Kannan S, Kennedy L. Diagnosis of acromegaly: state of the art. *Expert Opin Med Diagn.* 2013 Sep;7(5):443-53.

Kasuki Jomori de Pinho L, Vieira Neto L, Armondi Wildemberg LE, et al. Low aryl hydrocarbon receptor-interacting protein expression is a better marker of invasiveness in somatotropinomas than Ki-67 and p53. *Neuroendocrinology.* 2011;94(1):39-48

Kasuki L, Vieira Neto L, Wildemberg LE, Colli LM, de Castro M, Takiya CM, Gadelha MR. AIP expression in sporadic somatotropinomas is a predictor of the response to octreotide LAR therapy independent of SSTR2 expression. *Endocr Relat Cancer.* 2012; 24;19(3):L25-97.

Katznelson L, Laws ER Jr, Melmed S, Molitch ME, Murad MH, Utz A, Wass JA; Endocrine Society. Acromegaly: an endocrine society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab.* 2014;99(11):3933-51.

Kazlauskas A, Poellinger L, Pongratz I. The immunophilin-like protein XAP2 regulates ubiquitination and subcellular localization of the dioxin receptor. *J Biol Chem*. 2000 Dec 29;275(52):41317-24.

Lecoq AL, Viengchareun S, Hage M, Bouligand J, Young J, Boutron A, Zizzari P, Lombès M, Chanson P, Kamenický P. AIP mutations impair AhR signaling in pituitary adenoma patients fibroblasts and in GH3 cells. *Endocr Relat Cancer*. 2016;23(5):433-43.

Lecoq AL, Zizzari P, Hage M, Decourtye L, Adam C, Viengchareun S, Veldhuis JD, Geoffroy V, Lombès M, Tolle V, Guillou A, Karhu A, Kappeler L, Chanson P, Kamenický P. Mild pituitary phenotype in 3- and 12-month-old Aip-deficient male mice. *J Endocrinol*. 2016;231(1):59-69.

Leontiou CA, Gueorguiev M, van der Spuy J, Quinton R, Lolli F, Hassan S, Chahal HS, Igreja SC, Jordan S, Rowe J, Stolbrink M, Christian HC, Wray J, Bishop-Bailey D, Berney DM, Wass JA, Popovic V, Ribeiro-Oliveira A Jr, Gadelha MR, Monson JP, Akker SA, Davis JR, Clayton RN, Yoshimoto K, Iwata T, Matsuno A, Eguchi K, Musat M, Flanagan D, Peters G, Bolger GB, Chapple JP, Frohman LA, Grossman AB, Korbonits M. The role of the aryl hydrocarbon receptor-interacting protein gene in familial and sporadic pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;93:2390-2401.

Lim CT, Korbonits M. Update on the clinicopathology of pituitary adenomas. *Endocr Pract*. 2018;24(5):473-488.

Lin BC, Sullivan R, Lee Y, Moran S, Glover E, Bradfield CA. Deletion of the aryl hydrocarbon receptor-associated protein 9 leads to cardiac malformation and embryonic lethality. *J Biol Chem* 2007;282:35924-35932.

Linnert M, Haupt K, Lin YJ, Kissing S, Paschke AK, Fischer G, Weiwad M, Lucke C NMR assignments of the FKBP-type PPIase domain of the human aryl-hydrocarbon receptor-interacting protein (AIP). *Biomolecular NMR Assignments* 2012; 6 209–212.

Liu NA, Huang H, Yang Z, Herzog W, Hammerschmidt M, Lin S, Melmed S. *Mol Endocrinol*. 2003;17(5):959-66.

Liu NA, Jiang H, Ben-Shlomo A, Wawrowsky K, Fan XM, Lin, Melmed S. Targeting zebrafish and murine pituitary corticotroph tumors with a cyclin-dependent kinase (CDK) inhibitor. *PNAS* (2011) 108 8414–8419.

Lloyd C, Grossman A. The AIP (aryl hydrocarbon receptor-interacting protein) gene and its relation to the pathogenesis of pituitary adenomas. *Endocrine* 2014; 46:387-396.

Lohr H, Hammerschmidt M. Zebrafish in endocrine systems: recent advances and implications for human disease. *Annual Review of Physiology* 2011 (73) 183–211.

Ma Q & Whitlock JP. A novel cytoplasmic protein that interacts with the AH receptor, contains tetratricopeptide repeat motifs, and augments the transcriptional response to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Journal of Biological Chemistry* 1997 272 8878-8884

Manojlovic-Gacic E, Skender-Gazibara M, Popovic V, Soldatovic I, Borcic N, Raicevic S, Pekic S, Doknic M, Miljic D, Alafuzoff I, Pontén F, Casar-Borota O. Oncogene-Induced Senescence in Pituitary Adenomas--an Immunohistochemical Study. *Endocr Pathol.* 2016 Mar;27(1):1-11.

Mansour MR, Look AT. Discovery of a secreted tumor suppressor provides a promising therapeutic strategy for follicular lymphoma. *Cancer Cell.* 2011;20(5):559-61.

Martinez-Moreno CG, Trudeau VL, Harvey S. Co-storage and secretion of growth hormone and secretoneurin in retinal ganglion cells. *Gen Comp Endocrinol.* 2015;220:124-32.

McGonnell IM, Fowkes RC. Fishing for gene function--endocrine modelling in the zebrafish. *J Endocrinol* 2006;189:425-439.

Melmed S. Mechanisms for pituitary tumorigenesis: the plastic pituitary. *J Clin Invest.* 2003 Dec;112(11):1603-18

Melmed, S., 2006. Medical progress: Acromegaly. *N. Engl. J. Med.* 355, 2558–2573.

Melmed S, Casanueva FF, Hoffman AR, Kleinberg DL, Montori VM, Schlechte JA, Wass JA; Endocrine Society. Diagnosis and treatment of hyperprolactinemia: an Endocrine Society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011 Feb;96(2):273-88.

Merchenthaler I. Galanin and the neuroendocrine axes. *Exp Suppl.* 2010;102:71-85.

Meyer BK & Perdew GH. Characterization of the AhR-hsp90-XAP2 core complex and the role of the immunophilin-related protein XAP2 in AhR stabilization. *Biochemistry* 1999 38 8907-8917

Misawa K, Kanazawa T, Misawa Y, Uehara T, Imai A, Takahashi G, Takebayashi S, Cole A, Carey TE, Mineta H. Galanin has tumor suppressor activity and is frequently inactivated by aberrant promoter methylation in head and neck cancer. *Transl Oncol.* 2013;6(3):338-46.

Moore JP Jr, Cai A, Maley BE, Jennes L, Hyde JF. Galanin within the normal and hyperplastic anterior pituitary gland: localization, secretion, and functional analysis in normal and human growth hormone-releasing hormone transgenic mice. *Endocrinology.* 1999;140(4):1789-99.

Morgan RM, Hernández-Ramírez LC, Trivellin G, Zhou L, Roe SM, Korbonits M, Prodromou C Structure of the TPR domain of AIP: lack of client protein interaction with the C-terminal alpha-7 helix of the TPR domain of AIP is sufficient for pituitary adenoma predisposition. *PLoS ONE* 2012; 7 e53339.

Nilsson O, Bilchik AJ, Goldenring JR, Ballantyne GH, Adrian TE, Modlin IM. Distribution and immunocytochemical colocalization of peptide YY and enteroglucagon in endocrine cells of the rabbit colon. *Endocrinology.* 1991;129:139–148.

Pepe S, Korbonits M, Iacovazzo D. Germline and mosaic mutations causing pituitary tumours: genetic and molecular aspects. *J Endocrinol.* 2019;240(2):R21-R45.

Peters EE, Towler KL, Mason DR, Evans JJ. Effects of galanin and leptin on gonadotropin-releasing hormone-stimulated luteinizing hormone release from the pituitary. *Neuroendocrinology.* 2009;89(1):18-26.

Peverelli E, Mantovani G, Lania AG, Spada A . cAMP in the pituitary: an old messenger for multiple signals. *Journal of Molecular Endocrinology* 2014 (52) R67–R77.

Raappana A, Koivukangas J, Ebeling T, Pirilä T. Incidence of pituitary adenomas in Northern Finland in 1992-2007. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010 Sep;95(9):4268-75.

Raitila A, Lehtonen HJ, Arola J et al. Mice with inactivation of aryl hydrocarbon receptor-interacting protein (Aip) display complete penetrance of pituitary adenomas with aberrant ARNT expression. *Am J Pathol* 2010;177:1969-1976.

Rios Y, Melmed S, Lin S, Liu NA. Zebrafish *usp39* mutation leads to *rb1* mRNA splicing defect and pituitary lineage expansion. *PLoS Genetics* 2011 (7) e1001271.

Salvatori R, Serpa MG, Parmigiani G, Britto AV, Oliveira JL, Oliveira CR, Prado CM, Farias CT, Almeida JC, Vicente TA, Aguiar-Oliveira MH. GH response to hypoglycemia and

clonidine in the GH-releasing hormone resistance syndrome. *J Endocrinol Invest.* 2006;29(9):805-8.

Sarlos S, Inder WJ. Selective use of the insulin tolerance test to diagnose hypopituitarism. *Intern Med J.* 2013;43(1):89-93.

Stamatiades GA, Kaiser UB. Gonadotropin regulation by pulsatile GnRH: Signaling and gene expression. *Mol Cell Endocrinol.* 2018 Mar 5;463:131-141.

Stiles CE, Korbonits M. Familial Isolated Pituitary Adenoma. In: Feingold KR, Anawalt B, Boyce A, Chrousos G, Dungan K, Grossman A, Hershman JM, Kaltsas G, Koch C, Kopp P, Korbonits M, McLachlan R, Morley JE, New M, Perreault L, Purnell J, Rebar R, Singer F, Trencle DL, Vinik A, Wilson DP, editors. *Endotext* [Internet]. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.; 2000-. 2016 Nov 11.

Stojanovic M, Aflorei ED, McGonnell I, Korbonits M. AIP inactivation leads to pituitary enlargement in the Zebrafish embryo model. 18th European Congress of Endocrinology, 28-31 May 2016, Munich, Germany, *Endocrine Abstracts* vol 41, EP854

Su AI, Wiltshire T, Batalov S, Lapp H, Ching KA, Block D, Zhang J, Soden R, Hayakawa M, Kreiman G, Cooke MP, Walker JR, Hogenesch JB. A gene atlas of the mouse and human protein-encoding transcriptomes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Apr 20;101(16):6062-7.

Sun D, Stopka-Farooqui U, Barry S, Aksoy E, Parsonage G, Vossenkamper A, Capasso M, Wan X, Norris S, Marshall JL, et al. 2018 AIP maintains germinal center B cells through suppression of BCL6 degradation. *Cell Reports* *in press*.

Tapella L, Sesta A, Cassarino MF, Zunino V, Catalano MG, Pecori Giraldi F. Benzene and 2-ethyl-phthalate induce proliferation in normal rat pituitary cells. *Pituitary.* 2017;20(3):311-318.

Thrush AB, Antoun G, Nikpay M, Patten DA, DeVlugt C, Mauger JF, Beauchamp BL, Lau P, Reshke R, Doucet É, Imbeault P, Boushel R, Gibbings D, Hager J, Valsesia A, Slack RS, Al-Darbashi OY, Dent R, McPherson R, Harper ME. Diet-resistant obesity is characterized by a distinct plasma proteomic signature and impaired muscle fiber metabolism. *Int J Obes (Lond).* 2018;42(3):353-362.

To TT, Hahner S, Nica G et al. Pituitary-interrenal interaction in zebrafish interrenal organ development. *Mol Endocrinol* 2007;21:472-485.

Trivellin G, Korbonits M. AIP and its interacting partners. *J Endocrinol* 2011;210:137-155.

Tuominen I, Heliövaara E, Raitila A, Rautiainen MR, Mehine M, Katainen R, Donner I, Aittomäki V, Lehtonen HJ, Ahlsten M, Kivipelto L, Schalin-Jääntti C, Arola J, Hautaniemi S, Karhu A. AIP inactivation leads to pituitary tumorigenesis through defective G α i-cAMP signaling. *Oncogene*. 2015;34(9):1174-84.

Valentine A, O'Rourke M, Yakkundi A, Worthington J, Hookham M, Bicknell R, McCarthy HO, McClelland K, McCallum L, Dyer H, McKeen H, Waugh DJ, Roberts J, McGregor J, Cotton G, James I, Harrison T, Hirst DG, Robson T. FKBPL and peptide derivatives: novel biological agents that inhibit angiogenesis by a CD44-dependent mechanism. *Clin Cancer Res*. 2011;17(5):1044-56.

Vierimaa O, Georgitsi M, Lehtonen R, Vahteristo P, Kokko A, Raitila A, Tuppurainen K, Ebeling TM, Salmela PI, Paschke R, Gündogdu S, De Menis E, Mäkinen MJ, Launonen V, Karhu A, Aaltonen LA. Pituitary adenoma predisposition caused by germline mutations in the AIP gene. *Science* 2006;312:1228-1230.

Wang Z, You J, Xu S, Hua Z, Zhang W, Deng T, Fang N, Fang Q, Liu H, Peng L, Wang P, Lou J. Colocalization of insulin and glucagon in insulinoma cells and developing pancreatic endocrine cells, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 461 (2015) 598e604

Yakkundi A, Bennett R, Hernández-Negrete I, Delalande JM, Hanna M, Lyubomska O, Arthur K, Short A, McKeen H, Nelson L, McCrudden CM, McNally R, McClements L, McCarthy HO, Burns AJ, Bicknell R, Kissenpfennig A, Robson T. FKBPL is a critical antiangiogenic regulator of developmental and pathological angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2015;35(4):845-54.

Yoon D, Bae K, Lee MK, Kim JH, Yoon KA. Galanin is an epigenetically silenced tumor suppressor gene in gastric cancer cells. *PLoS One*. 2018;13(2):e0193275

Zhang M, Tang J, Yin J, Wang X, Feng X, Yang X, Shan H, Zhang Q, Zhang J, Li Y. The clinical implication of serum cyclophilin A in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. 2018 19;13:357-363.

SKRAĆENICE

ACTH – adrenokortikotropni hormon

AH – adenomi hipofize

AhR - Aryl hydrocarbon receptor

AIP - Aryl hydrocarbon receptor-interacting protein

cAMP – ciklični adenzin monofosfat

DNK – deoksiribonukleinska kiselina

FIPA – familijarni izolovani adenomi hipofize

FSH – folikulostimulirajući hormon

HR – hormon rasta

ITM – indeks telesne mase

LH – luteinizirajući hormon

NFAH – nefunkcijski adenom hipofize

NMR – nuklearna magnetna rezonanca

PCR – reakcija lančane polimerizacije

POMC – pro-opio-melanokortin

PRL – prolaktin

PTTG - pituitary tumor transforming gene

RNK – ribonukleinska kiselina

SSA – somatostatinski analog

Usp39 – ubikvitin specifična peptidaza

Biografija kandidata

Marko Stojanović rođen je 1976. u Beogradu. Prvi razred gimnazije završio je u Cambridge Rindge and Latin School u Kembridžu, SAD sa prosečnom ocenom 97/100. Maturirao je u Prvoj beogradskoj gimnaziji u Beogradu sa prosečnom ocenom 4,9. Prva praktična iskustva u kliničkoj endokrinologiji stekao je 2001. na razmeni studenata u Meksiku, na Odeljenju endokrinologije Hospital Universitaria, Monterrey. Diplomirao je na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu (MFUB) 2003. sa prosečnom ocenom 9,23. Od 2004. nadalje radi na Odeljenju neuroendokrinologije Klinike za endokrinologiju, dijabetes i bolesti metabolizma KCS. Poslediplomske studije upisao je na MFUB kao stipendista Ministarstva nauke. Magistrirao je 2008. sa temom “Procena funkcije prednjeg režnja hipofize kod obolelih od hemoragijske groznice sa bubrežnim sindromom” pod mentorstvom profesorke Vere Popović. Na MFUB izabran je 2009. u zvanje Istraživač saradnik za oblast endokrinologija. Specijalistički ispit iz Interne medicine položio je 2011. sa odličnom ocenom. Stekao je 2018. zvanje subspecijaliste endokrinologije na MFUB, odobranom rada uže specijalizacije sa temom “Određivanje populaciono i uzrasno specifičnih referentnih vrednosti IGF-1 kod zdravih odraslih u Srbiji i značaj njihove primene u kliničkom radu”, pod mentorstvom prof dr Vere Popović. Na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu 2015. odobrena mu je tema doktorske disertacije pod nazivom “Ispitivanje uloge AIP gena u patogenezi adenoma hipofize na životinjskom i ljudskom modelu” pod mentorstvom prof dr Vere Popović i komentorstvom prof dr Marte Korbonits (Queen Mary University London). Uz stipendije udruženja Royal College of Physicians, British Society for Neuroendocrinology, Society for Endocrinology i European Society of Endocrinology u toku 2014. realizovao je šestomesečni studijski boravak na Odeljenju endokrinologije William Harvey Research Institute i St Bartholomew's Hospital, u Londonu. U toku ovog studijskog boravka, čiji domaćin je bila Prof M. Korbonits, sprovodio je eksperimentalni deo doktorata na životinjskom modelu. Na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu izabran je 2015. za Kliničkog asistenta u oblasti Interna medicina - endokrinologija. Od 2004. je aktivno učestvovao u projektima Ministarstva nauke 145019 i 175033 - nosilac prof dr V. Popović. U oblasti neuroendokrinologije objavio je kao prvi autor ili koautor 32 rada u celini u recenziranim međunarodnim časopisima (sa kumulativnim IF 96), i jednog poglavlja u stranom udžbeniku. Učestvovao je kao predavač po pozivu na evropskom kongresu endokrinologa 2016. i poslediplomskom kursu Evropskog udruženja endokrinologa 2018. kao i velikom broju simpozijuma kontinuirane medicinske edukacije. Stekao je 2018. zvanje Primarijus koje dodeljuje Ministarstvo zdravlja Republike Srbije.

Prilog 1.

Izjava o autorstvu

Potpisani-a Marko Stojanović

broj upisa _____

Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom

ISPITIVANJE ULOGE AIP GENA U PATOGENEZI ADENOMA HIPOFIZE NA ŽIVOTINJSKOM I LJUDSKOM MODELU

- rezultat mog sopstvenog istraživačkog rada,
- da predložena disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršio/la autorska prava i koristio intelektualnu svojinu drugih lica.

Potpis doktoranda

U Beogradu, 01.04.2019.

Marko Stojanović

Prilog 2.

Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije
doktorskog rada

Ime i prezime autora Marko Stojanović

Broj upisa _____

Studijski program _____

Naslov rada ISPITIVANJE ULOGE AIP GENA U PATOGENEZI ADENOMA
HIPOFIZE NA ŽIVOTINJSKOM I LJUDSKOM MODELU

Mentor prof dr Vera Popović

Potpisani Marko Stojanović

izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao/la za objavljivanje na portalu **Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu**.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

Potpis doktoranda

U Beogradu, 01.04.2019.

Marko Stojanović

Prilog 3.

Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

ISPITIVANJE ULOGE AIP GENA U PATOGENEZI ADENOMA HIPOFIZE NA ŽIVOTINJSKOM I LJUDSKOM MODELU

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim priložima predao/la sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio/la.

1. Autorstvo
2. Autorstvo - nekomercijalno
3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima
5. Autorstvo – bez prerade
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci, kratak opis licenci dat je na poledini lista).

Potpis doktoranda

U Beogradu, 01.04.2019.

Moruo Bogdanović

1. Autorstvo - Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence, čak i u komercijalne svrhe. Ovo je najslobodnija od svih licenci.
2. Autorstvo – nekomercijalno. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.
3. Autorstvo - nekomercijalno – bez prerade. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela. U odnosu na sve ostale licence, ovom licencom se ograničava najveći obim prava korišćenja dela.
4. Autorstvo - nekomercijalno – deliti pod istim uslovima. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada.
5. Autorstvo – bez prerade. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.
6. Autorstvo - deliti pod istim uslovima. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada. Slična je softverskim licencama, odnosno licencama otvorenog koda.