



# '22

# ХЕМИЈСКИ ПРЕГЛЕД

год. 63  
бр. 3-4  
(јун-септембар)

YU ISSN 04406826  
UDC 54.011.93



**Пре 125 година**  
Основано је Српско  
хемијско друштво



Хемијски Преглед  
[www.shd.org.rs/hp.htm](http://www.shd.org.rs/hp.htm)

српско хемијско друштво

# ХЕМИЈСКИ ПРЕГЛЕД CHEMICAL REVIEW



Годиште 63

број 3-4  
јун-септембар

Editor-in-Chief  
RATKO M. JANKOV  
Deputy Editor-in-Chief  
DRAGICA TRIVIĆ

Volume 63  
NUMBER 3-4  
(June-September)

Publisher  
SERBIAN CHEMICAL SOCIETY  
Belgrade/Serbia, Karnegijeva 4

Издаје  
СРПСКО ХЕМИЈСКО ДРУШТВО

Телефон 3370-467

Карнегијева 4

излази двомесечно

ОДГОВОРНИ И ГЛАВНИ УРЕДНИК  
Ратко М. Јанков

ПОМОЋНИК ОДГОВОРНОГ И ГЛАВНОГ УРЕДНИКА  
Драгица Тривић

ЧЛАНОВИ РЕДАКЦИЈЕ  
Јелена Радосављевић, Наталија Половић и Воин Петровић

УРЕЂИВАЧКИ ОДБОР

Иван Гутман, Снежана Зарић, Јован Јовановић, Славко  
Кеврешан, Драган Марковић, Владимир Павловић,  
Радомир Саичић, Живорад Чековић (председник).

Годишња чланарина, укључује часопис „Хемијски преглед”,  
за 2022. годину износи:

- за све запослене и студенте докторских студија ..... 2.500,00
- за професоре у основним и средњим школама .....1.400,00
- за пензионере, студенте основних и мастер студија,  
ђаке и незапослене.....1.200,00
- претплата за школе и остале институције..... 5.000,00
- за чланове и институције из иностранства. .... € 70

Чланарину и претплату можете уплатити на рачун СХД:  
205-13815-62, позив на број 320.

Web site: <http://www.shd.org.rs/hp/>  
e-mail редакције: [hempred@chem.bg.ac.rs](mailto:hempred@chem.bg.ac.rs)

Припрема за штампу и штампа:  
РИЦ графичког инжењерства Технолошко-металуршког  
факултета Београд, Карнегијева 4

Насловна страна и Интернет верзија часописа:  
Слободан и Горан Ратковић,  
RatkovicDesign [www.ratkovicdesign.net](http://www.ratkovicdesign.net)  
[office@ratkovicdesign.net](mailto:office@ratkovicdesign.net)

## САДРЖАЈ

### ЧЛАНЦИ

Катарина ЖИВИЋ, Миљана ТАНИЋ  
*Katarina ŽIVIĆ, Miljana TANIĆ*

УПОТРЕБА ТЕЧНЕ БИОПСИЈЕ ЗА ДИЈАГНОСТИКУ  
МАЛИГНИХ БОЛЕСТИ: ПРИНЦИПИ И ТРЕНУТНА  
ПРАКСА  
*THE USE OF LIQUID BIOPSY FOR THE DIAGNOSIS  
OF MALIGNANT DISEASES: PRINCIPLES AND  
CURRENT PRACTICE* ..... 58

Весна В. ДРАГУТИНОВИЋ  
*Vesna V. DRAGUTINOVIĆ*

УЛОГА МИКРОЕЛЕМЕНАТА И МАТРИКСНИХ  
МЕТАЛОПРОТЕИНАЗА У КАНЦЕРОГЕНЕЗИ  
*THE ROLE OF MICROELEMENTS AND MATRIX  
METALLOPROTEINASES IN CARCINOGENESIS* ..... 68

Милена СИМИЋ, Милош ПЕТКОВИЋ, Предраг ЈОВАНОВИЋ  
*Milena SIMIĆ, Miloš PETKOVIĆ, Predrag JOVANOVIĆ*

ФЛУОРОВАНИ ПРИРОДНИ ПРОИЗВОДИ  
*FLUORINATED NATURAL PRODUCTS* ..... 73

ВЕСТИ из / за ШКОЛЕ

Игор МАТИЈАШЕВИЋ  
*Igor MATIJAŠEVIĆ*

ТРАНСЛАЦИЈЕ СПОЉАШЊИХ РЕПРЕЗЕНТАЦИЈА  
*TRANSLATIONS OF EXTERNAL REPRESENTATIONS* ..... 79



## УВОДНИК

После више времена поново сте у прилици да у својим рукама држите двоброј Хемијског прегледа. То се дешава пре свега због тога што је све мањи прилив нових радова у редакцију Хемијског прегледа. Зато се сада обраћамо генерацији младих хемичара и технолога за помоћ, да текстовима о својим научним победама омиле хемију генерацијама још млађих, слично као што су то за њих чиниле старије генерације. Млади истраживачи, овај позив упућујемо вама да научно-популарним чланцима за странице Хемијског прегледа, ову ситуацију недостатка радова, која није нова, али је сада кулминирала, промените. Да бисмо одржали редовност излажења, морали смо понеки број да штампамо на мањем броју страна, а сада смо дошли до тога да издајемо двоброј. Надам се да ће овај позив покренути нове, младе снаге да поделе интересантна знања из својих лабораторија или учионица, из било које области хемије на популаран начин.

\* \* \*

Годинама фокус истраживања научника представљају механизми који воде настанку канцера, као основ за развој дијагностичких приступа у његовом раном откривању и развој персонализоване терапије, а у циљу бројнијег преживљавања пацијената који болују од рака. Тренутни златни стандард дијагностике јесте биопсија туморског ткива. То има неколико ограничења, те је развој других дијагностичких приступа у све већој експанзији. Термин течна биопсија односи се на узорковање биолошког материјала који не обухвата чврсто ткиво тумора, као што су крв, урин, пљувачка, цереброспинална течност и др. Од чланака из овог броја топло вам препоручујем чланак „Употреба течне биопсије за дијагностику малигних болести: принципи и тренутна пракса“, ауторки Катарине ЖИВИЋ и Миљане ТАНИЋ, са Института за онкологију и радиологију Србије у Београду. У чланку је описана метода течне биопсије која је последњих година у центру интересовања у клиничкој онкологији, како због неинвазивног приступа, тако и због тога што отвара врата много већем подручју испитивања у односу на биопсију ткива.

\* \* \*

У ери велике раширености канцерогених обољења и кардиоваскуларних артритиса потребни су нови параметри који би указали на одређене патологије као допуна већ класичним дијагностичким методама и провереним маркерима. Показало се да промене концентрација појединих

микроелемената код канцерогених обољења, у односу на здраву популацију и на друга бенигна обољења, могу послужити као нови параметри. Одређивање концентрација микроелемената у серуму или ткиву, у комбинацији са одређеним ензимима, представља добар додатни параметар дијагностике. Тако је у овом броју Хемијског прегледа објављен још један чланак на тему канцера: „Улога микроелемената и матриксних металопротеиназа у канцерогенези“, аутора Весне В. ДРАГУТИНОВИЋ, са Института за хемију у медицини, Медицинског факултета, Универзитета у Београду.

\* \* \*

Многи организми морског и сувоземног порекла могу садржати у себи значајне количине неоргански везаног флуора. Једињења која у структури садрже халогене елементе су доста распрострањена у природи и најчешће се могу изоловати из морских организама. Међутим, за разлику од бромованих и хлорованих деривата, веома су ретки природни производи који садрже органски везан флуор. За разлику од веома распрострањеног „неорганског“ флуора, органска једињења са флуором се ретко срећу у природи; пронађена су у одређеним биљним врстама, бактеријама, док се у животињском царству појављују само код неких врста морских сунђера. О томе нам пишу Миљана СИМИЋ, Милош ПЕТКОВИЋ и Предраг ЈОВАНОВИЋ, сви са Катедре за органску хемију, Фармацеутског факултета, Универзитета у Београду, у чланку под насловом „Флуорирани природни производи“.

\* \* \*

Спољашње репрезентације (енг. external representations), као нешто што стоји уместо нечега другог, могу бити вербални искази, симболички изрази (у виду математичких, физичких и хемијских једначина), слике (цртежи и фотографије), дијаграми, графици, табеле, итд, а служе нам да формирамо нове појмове. Када се спољашње репрезентације повезују на основу уочавања њихове информационе сличности посредни је когнитивни процес назван „транслација спољашњих репрезентација“. Како се то може применити у формативној провери знања, прочитајте у чланку „Транслације спољашњих репрезентација“, аутора Игора МАТИЈАШЕВИЋА, професора хемије у Деветој гимназији „Михаило Петровић Алас“ у Београду.

Ратко М. Јанков



## ЧЛАНЦИ



Катарина ЖИВИЋ, истраживач-приправник,  
Миљана ТАНИЋ, виши научни сарадник

Институт за онкологију и радиологију Србије, Пастерова 14, Београд,  
Република Србија.

Е-пошта: zivickatarinakaca@gmail.com

# УПОТРЕБА ТЕЧНЕ БИОПСИЈЕ ЗА ДИЈАГНОСТИКУ МАЛИГНИХ БОЛЕСТИ: ПРИНЦИПИ И ТРЕНУТНА ПРАКСА

## КРАТКИ ИЗВОД

Годинама, фокус истраживања научника представљају механизми који воде настанку канцера, као основ за даљи развој дијагностичких приступа у његовом раном откривању, као и развој персонализоване терапије и повећања нивоа преживљавања пацијената који болују од рака. Тренутни златни стандард дијагностике јесте биопсија туморског ткива, што има неколико ограничења, те је развој других дијагностичких приступа у све већој експанзији. Течна биопсија, последњих година, постала је центар истраживања у клиничкој онкологији, како због неинвазивног приступа, тако и због тога што отвара врата много већем подручју испитивања, него што то даје биопсија ткива. Термин течна биопсија односи се на узорковање биолошког материјала који не обухвата чврсто ткиво тумора, као што су крв, урин, пљувачка, цереброспинална течност и др. Три су основна маркера течне биопсије, циркулишуће туморске ћелије, циркулишућа ДНК и егзозоми, који заједно чине огромну област истраживања која нуди велики напредак на пољу дијагностификовања, праћења болести и предвиђања адекватне циљане терапије.

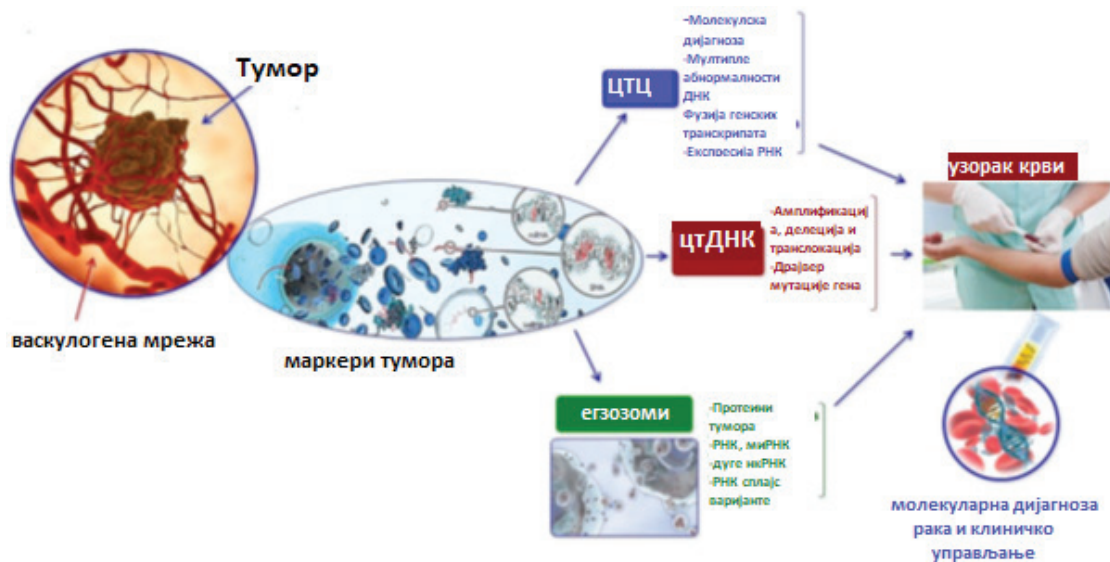
## УВОД

Карцином је у већини случајева генетичка болест која настаје као последица молекуларних промена у генима који учествују у ћелијском преживљавању, пролиферацији и диференцијацији, при чему код ћелија изостаје регуларни ћелијски циклус и оне формирају тумор који утиче на физиологију органа. [1] Прогноза ове болести је у великој мери повезана са испитивањем примарног тумора или колоније ћелија карцинома које мигрирају на друга места у телу.

[2] Тренутна молекуларна дијагностика пацијената који болују од канцера, заснована на биопсијама ћелија из датог ткива (енгл. „*needle biopsy*“), налази на бројна ограничења који могу водити погрешним закључцима.[3] Појединачни тумори се састоје од различитих субпопулација ћелија, и мала количина тумора добијена помоћу биопсије, могуће, не представља најагресивније подколоније.[3] Поред овог, постоји још разлога због којих се овај начин дијагностификовања узима са резервом, као што су локација појединих тумора, нетачне информације о метастазама на основу информација о примарном тумору, карактеристике удаљених метастаза које се не подударују са примарним тумором, итд.

Биопсија ткива, која се сматрала златним стандардом типизације карцинома, пружа тренутни приказ болести. Неспецифични налази који се при том добијају утичу на постављање дијагнозе пацијената и последично резултују неефикасном терапијом.[2] Напредак биомедицинских технологија у истраживању канцера омогућио је развој нових дијагностичких алата који подразумевају неинвазивне процедуре, тојест узорковање телесних течности. Ти алати једним су именом названи течна биопсија.[2] Течна биопсија доноси нове могућности када су у питању дијагностификовање канцера и његово лечење.[1]

Термин течна биопсија односи се на узорковање биолошког материјала који не обухвата чврсто ткиво тумора, као што су крв, урин, пљувачка, цереброспинална течност и др.[4] У телесним течностима анализирају се молекули који се сматрају биомаркерима канцера, укључујући циркулишуће туморске ћелије (енгл. CTC-*circulating tumor cells*), циркулишућу туморску ДНК (енгл. ctDNA-*circulating tumor DNA*), микроРНК (miRNA) и екстрацелуларне везикуле (енгл. EXV-*extracellular vesicles*).[2] Ови молекули бивају отпуштени у



Слика 1. Биомаркери течне биопсије и њихова употреба. (прилагођено из *Palmirotta et al. 2018*)

циркулацију од стране апоптотских и некротичних ћелија, као и од виталних ћелија нормалног ткива, тумора и метастатских маса. На Слици 1. приказани су биомаркери течне биопсије и њихова примена у персонализованој медицини. [5]

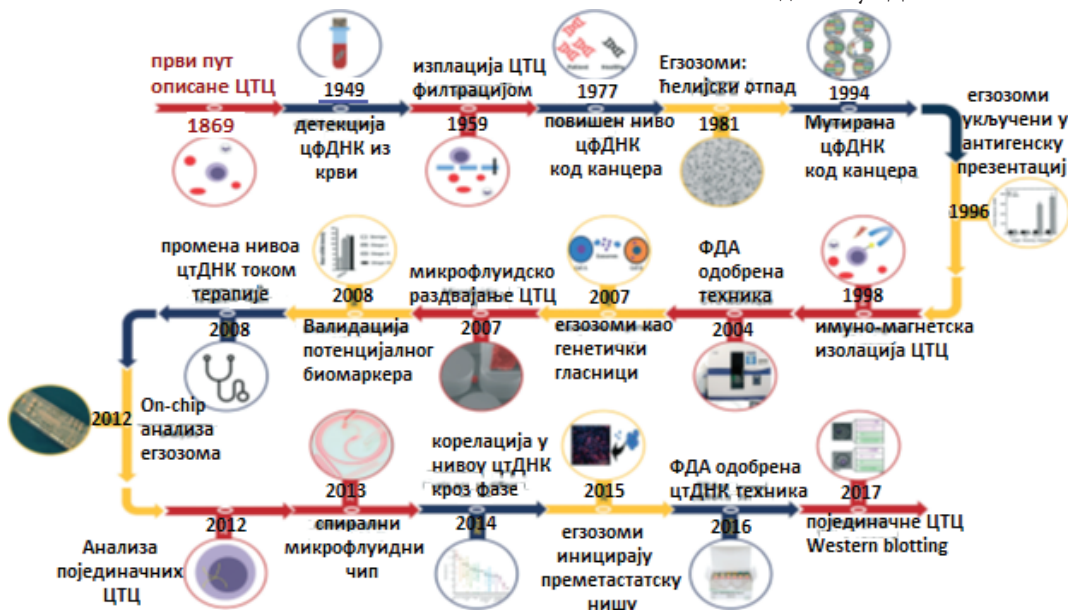
Изоловање ових компонената добијених из тумора, и њихова генетичка и протеомска анализа представља нови дијагностички алат.

## 1. МАРКЕРИ ТЕЧНЕ БИОПСИЈЕ

Горепоменути биомаркери откривени су у различитим временским периодима, а сваки од њих како појединачно тако и у комбинацији са другим биомаркерима, представља изузетан потенцијал као биомаркер течне биопсије у дијагностификовању

канцера. На Слици 2. су приказани кључни догађаји који приказују развој ових биомаркера. [2]

Течне биопсије доносе нове могућности за дијагностификовање и лечење рака: одговор на лечење одређеном терапијом може се лако пратити, а такође је омогућен и скрининг ризичних група у популацији једноставним узимањем крви што би могло омогућити рано откривање болести и повећати укупну стопу преживљавања.[1] Иако је проучавање циркулишућих биомаркера канцера донело многе могућности, много мало напретка је постигнуто како би се овакви тестови укључили у свакодневну клиничку праксу. Да би овакви тестови били клинички валидни и корисни морају се утврдити стандардне оперативне процедуре које резултују аналитичком валидношћу. Да би се оптимизовале



Слика 2. Шематски приказ кључних прекретница у истраживању течне биопсије која покрива биомаркере, укључујући ЦТЂ cfDNA и ЕВ. Црвеном су представљене циркулишуће ћелије тумора, плавом циркулишућа туморска ДНК, а жутом екстрацелуларне везикуле.(прилагођено из *Ramanathan et al., 2019.*)

ове оперативне процедуре неопходан је адекватан референтни материјал који има добро дефинисана својства. Референтни материјали се даље могу користити за откривање експерименталних грешака, калибрацију и процену доње границе детекције (енгл. *LOD-Limit of detection*) мерних метода и помоћ у квантитативном одређивању биомаркера. [1]

### 1.1 ЦТЋ- Циркулишуће ћелије тумора

Овај тип ћелија је први пут документовао Томас Ешворт (*Thomas Ashworth*) 1869. године у крви мушкарца, који је преминуо услед метастазе тумора, а посматране ћелије су микроскопски подсећале на ћелије примарног тумора. (*Ashworth et al., 1869.*)

ЦТЋ су ћелије које се откидају од примарног или секундарног тумора и имају способност да уђу у циркулацију путем које мигрирају до удаљених места где имају могућност да развију друге метастазе. [6] ЦТЋ су веома ретке и налазе се у циркулацији са великим бројем крвних ћелија, са концентрацијом од око 1 ЦТЋ у  $1 \cdot 10^6 - 1 \cdot 10^9$  крвних ћелија [7] и полуживотом од 1 до 2 и по часа. Ове ћелије се такође могу наћи у кластерима са фибробластима, леукоцитима, тромбоцитним и епителијалним ћелијама, када граде агрегате који имају већу склоност да мигрирају и праве удаљеније метастазе јер дуже преживљавају него појединачне ЦТЋ. [5] Откривање ЦТЋ у крви пацијената који болују од рака има обећавајуће аспекте, и последњих година развијене су различите технике које омогућавају њихово изоловање и испитивање, иако је то технички веома захтевно. [8] Међутим, постоје технике уз помоћ којих је било могуће изоловати ЦТЋ, као што су имунотехнике (хватање антитела), раздвајање по величини, исцрпљивање крвних ћелија и диелектрофореза, а заступљеност ових ћелија у циркулацији директно је повезана са агресивношћу болести. [4]

Било је потребно скоро 3 деценије испитивања док Ракила (*Racila*) и колеге нису открили нови начин изоловања ЦТЋ преко протеина на површини ових ћелија, односно ћелијског епителијалног адхезивног молекула (енгл. *EpCAM-Epithelial cell adhesive molecule*), а који се заснива на имуноманетном раздвајању. [9] Ово откриће довело је до тога да ово буде прва техника одобрена од стране Управе за храну и лекове САД (енгл. *FDA-Food and Drug Administration*) за клиничку употребу у детекцији ЦТЋ. [10] Такође, Награт (*Nagrath*) и колеге су развили микрофлуидни приступ, популарно назван ЦТЋ чип, који представља чип обложен антителима за изоловање циркулишућих ћелија тумора из крви. [11] Откривање, побројавање и карактеризација ЦТЋ углавном се изводи истовремено са обогаћивањем у микрофлуидном уређају. То се може постићи коришћењем флуоресцентног имицинга, молекуларних тестова (углавном заснованих на PCR-у)

или протеинских есеја (откривање туморских специфичних протеина које ослобађа ЦТЋ). [1] Одређивање броја и карактеризација ЦТЋ са сертифицираним системима пружа поуздане информације о прогнози и може послужити као течна биопсија за идентификовање терапијских циљева или механизма резистенције на метастатским ћелијама. [3]

Међутим, и ова техника изоловања одобрена од стране ФДА има своје недостатке у погледу специфичности и сензитивности самог есеја. Наиме, ЦТЋ могу проћи кроз епителијално-мезенхималну транзицију (енгл. *EMT-Epithelial mesenchymal transition*) при чему се губе протеини специфични за епителијалне ћелије са површине ЦТЋ, што онемогућава њихову детекцију и изоловање. Због тога треба узети у обзир да се не треба фокусирати само на епителне маркере, већ и на мезенхималне маркере. [1] До данас није постигнут консензус о потенцијалним мезенхималним маркерима који би се могли користити, међутим, употреба површински израженог виментина могла би представљати решење. [12] Још један аргумент који би могао да се супротстави употреби EpCAM-а за хватање ЦТЋ је чињеница да постоје извештаји о присуству епителних ћелија у циркулацији код пацијената са бенигним болестима, што би могло резултовати лажно позитивним резултатима. [13] Даље, ЦТЋ могу стећи фенотип сличан матичним ћелијама изражавањем типичних маркера као што су CD44, CD133 и алдехид дехидрогеназе (ALDH), као и пролиферативна и самообнављајућа својства која фаворизују метастатизацију у секундарним ткивима. Стога је могуће пронаћи исти ЦТЋ у узорку крви са фенотипом епителијалних, EMT или матичних канцерских ћелија подржавајући тако њихову хетерогеност, а истовремено ограничавајући њихово пречишћавање и анализу. [5,14]

Неколико фактора још увек омета стандардизовану клиничку примену, укључујући малу количину ЦТЋ у циркулацији; одсуство поузданог и ефикасног маркера за разликовање ЦТЋ од осталих ћелија које се преносе крвљу; и неприступачност молекуларне и геномске карактеризације у даљим експериментима услед малог броја детектованих ЦТЋ. [5] Стога се приступило развоју техника које би омогућиле обогаћивање ЦТЋ за даље анализе. Приступи обогаћивању ЦТЋ укључују велики панел технологија заснованих на различитим својствима ЦТЋ који их разликују од околних крвних ћелија, укључујући физичка својства (величина, густина, електрични набој, деформабилност) и биолошка својства (експресија протеина на ћелијској површини, вијабилност). Тренутне стратегије за обогаћивање ЦТЋ су сумиране на Слици 3. [8]

Екстракција ЦТЋ из узорка крви омогућава

истраживање бројних феномена повезаних са раком, укључујући присуство мутација, транслокација, генска престојавања, губитак хетерозиготности, прекомерну експресију и регулисање гена, алтернативно РНК спљасовање, експресију протеина и осетљивост на лекове.[4] Штавише, праћење ЦТЂ пре, током и после системске терапије (нпр. хемиотерапија, хормонска терапија, имунотерапија) може пружити јединствене информације за будуће клиничко лечење појединачног пацијента са раком и може послужити као супституциони маркер за одговор на терапију.[15,16]

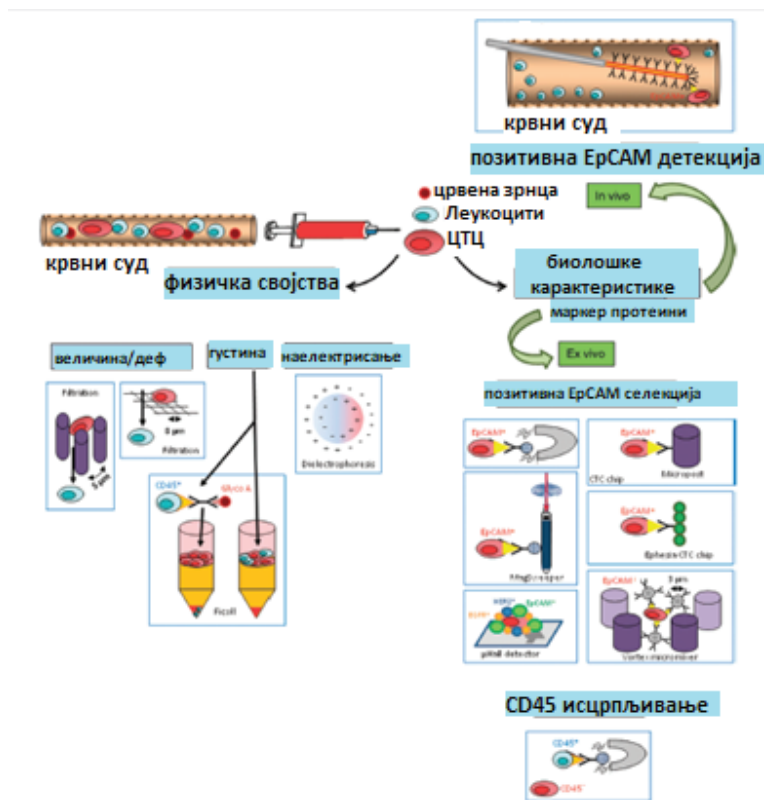
### 1.1.1. Клиничка примена ЦТЂ

ЦТЂ карактерише висока хетерогеност на генском, транскриптомском, протеомском и метаболомском нивоу. У ствари, ЦТЂ представљају високо динамичну ћелијску популацију која може потицати и са места примарних тумора и из метастаза. Ове ћелије мењају своје фенотипске и молекуларне карактеристике током болести, под дејством микрооколине и терапијским селективним притиском. [5]

Иако је неопходно оптимизовати стандардни поступак за изоловање ЦТЂ-а, њихово истраживање у модерној онкологији дефинитивно игра кључну улогу у повезивању основних истраживања са клиничким закључцима као прогностички, дијагностички и предиктивни динамички маркер

у свакодневној медицинској пракси.[5] Клинички истраживачи су открили да је апсолутни број ЦТЂ у узорку крви од 7,5 mL значајно повезан са прогнозом. Чак штавише, код метастатског карцинома дојке, Кристофанили (*Cristofanilli*) и колеге су први пут показали да пацијенти са више од 5 ЦТЂ у 7,5 mL крви имају краће преживљавање без прогресије болести (енгл. *PFS-progression-free survival*) и укупно преживљавање (енгл. *OS-overall survival*) у поређењу са пацијентима са нижим бројем.[17] Слични резултати су добијени код пацијената са раком простате, код којих је OS пао на 11,5 месеци, односно на половину, у присуству више од 5 ЦТЂ / 7,5 mL наспрам 21,7 месеци код пацијената са мањом од ове граничне вредности.[18] Прогностичка улога ЦТЂ показана је и код других канцера, колоректалног, гастричног, панкреасног, канцера главе и врата, код саркома и неуроендокриних тумора.

Поред улоге прогностичких маркера, ЦТЂ се могу користити и као фармакодинамички биомаркери. Забележено је смањење или укупног броја ЦТЂ или молекуларно одређене подгрупе ЦТЂ као одговор на терапију. Друга предвиђена употреба броја ЦТЂ је у раном стадијуму карцинома, при чему присуство ЦТЂ може помоћи одабиру пацијената који ће највероватније имати користи од помоћне терапије. Међутим, за било коју предложену клиничку примену потребна су проспективна, контролисана испитивања да би



Слика 3. Обогаћивање ЦТЂ из периферне крви пацијената који болују од канцера засновано на физичким и биолошким карактеристикама ЦТЂ. (прилагођено из: Catherine Alix-Panabieres et al.2013.)

се потврдила и квалификовала њихова клиничка употреба.[19]

Идеално би било да се ЦТЂ користе као течна биопсија за одабир одређене персонализоване терапије на основу молекуларних карактеристика тумора пацијента. Даље, значај хетерогености ЦТЂ-а као одговор на, или у развоју резистенције на циљану терапију тек треба открити. Заиста се очекује да ће технике једноћелијског профилисања допринети следећој генерацији клиничких студија чији је циљ утврђивање предиктивне вредности молекуларних аберација у ЦТЂ и појава резистентних подтипова у циљаној терапији.[19] Промене у броју ЦТЂ у процени током лечења предвиђају одговор на терапију, често раније од радиолошких доказа.[20]

ЦТЂ, такође, могу пружити информације о епигенетичким променама у ћелијама рака пацијената. Конкретно, метилација ДНК у течној биопсији предложена је као потенцијални биомаркер за одређивање степена болести, прогнозу и праћење одговора.[21]

## 1.2 cfDNA- циркулишућа туморска ДНК

Циркулишућа туморска ДНК је ДНК која се ослобађа из апоптотских и некротичних ћелија тумора и постаје део укупне фракције ДНК која циркулише у крви (енгл. cfDNA-*total cell-free DNA*) услед физиолошког ремоделовања ткива.[22] Први пут је експериментално уочена 1948. године од стране два научника (*Mandel et Metais, 1948.*), а сама туморска ДНК идентификована од стране *Kunkel*-а 1973. када је уочен пад нивоа цфДНК код пацијената који су подвргнути хемиотерапији.[23]

Концентрација cfDNA у крвној плазми варира међу пацијентима који болују од рака у зависности од врсте, локације и стадијума карцинома и често је ниска.[24] Код пацијената са раком, cfDNA представља мали проценат укупне фракције cfDNA, који варира од мање од 0,1% до преко 10% у зависности од величине тумора, стадијума карцинома, ћелијског промета и одговора на терапију.[25] Ензимско цепање ДНК током апоптозе резултује формирањем фрагмената ДНК у просеку од 166 bp, што одговара ДНК обмотаној око једног нуклеозома.[1] Када су у питању cfDNA молекули, они су краћи и њихова дужина варира између 90 и 150 bp. Забележени су и краћи фрагменти cfDNA у неким врстама тумора (нпр. хепатоцелуларни карцином) као и велики фрагменти cfDNA са хиљадама базних парова, који су вероватно резултат некрозе ткива.[26]

Типична употреба cfDNA анализа јесте у процени генетичких промена у генима који се повезују са раком, што је омогућено појавом нових техника секвенцирања, као што је секвенцирање нове генерације (енгл. NGS-Next generation sequencing), односно технике која омогућава детектовање cfDNA

која је у великој мери растворена у укупној количини ДНК у циркулацији.[27] Откривање соматских мутација, најчешће промене у појединачном базном пару, варијације у броју копија (CNV-*copy number variations*) или хромозомски реаранжмани у cfDNA дају обећавајући аспект за рану дијагнозу карцинома, процену динамике тумора, откривање минималне резидуалне болести (енгл. MRD-*minimal residual disease*) и праћења одговора на терапију.[1] Мутације идентификоване у cfDNA екстрахованој из крвне плазме и у одговарајућем туморском ткиву пацијената са карциномом показују високу стопу подударности, подстичући рутинску примену испитивања cfDNA као додатак испитивању тумора.[28] Такође, циркулишућа ДНК носи специфичне ткивне и тумор-специфичне епигенетичке аберације, и сам шаблон метилације туморског ткива високо корелира са оним на cfDNA.[29] Праћење и детекција клинички релевантних мутација у cfDNA је изазован процес, јер је cfDNA високо фрагментисана и јер је прикривена високом позадином укупне cfDNA, што резултује фреквенцијама алела (AF) нижим од 0,1%, посебно за туморе у раној фази или микрометастазе. Такође, крв садржи целе ћелије, па при обради, чувању и транспорту, може доћи до лизе ћелија при чему се ослобађа геномска ДНК (гДНК) и контаминира cfDNA фракцију, и потенцијално даје лажно негативне резултате.[1] Капиларна електрофореза ДНК омогућава процену величине фрагмената ДНК, а квантификација дужих и краћих секвенци истог гена могућа је употребом квантитативне PCR (*Polymerase chain reaction*) анализе. Да би се избегле контаминације геномском ДНК, користе се специјализоване епрувете.

Оптimalан начин екстракције cfDNA јесте онај у ком су пречишћени сви фрагменти cfDNA, где је принос максималан и минимално присуство PCR инхибитора. Једна од таквих метода јесте обogaћивање на магнетним зрнима, а други приступ јесте афинитетно обogaћивање на колони силика гела. Постоји и начин изоловања при коме се cfDNA преципитира заједно са полимером, или се екстрахује раствором фенола и хлороформа.[30]

За детекцију cfDNA користе се PCR технике и секвенцирање нове генерације (NGS). Класична PCR и дигитална PCR анализа служе за детекцију мутација које су већ познате у клиници, и захтевају претходно знање о циљаној мутацији. Ове технике су брзе, јефтине и показују високу специфичност и сензитивност. Откривање засновано на NGS ослања се на нециљану или циљану анализу екстраховане cfDNA на присуство клинички релевантних мутација. За ову технику није неопходно претходно знање о одређеној мутацији, али су такође присутне и грешке и веома је тешко анализирати cfDNA. Међутим, недавни приступ повећању осетљивости NGS технике (Safe-SeqS, CAPP-Seq и TAmSeq) успешан је



и показује потребу за вишим нивоом стручности у раду и специфичним биоинформатичким приступима. Даљи развој за побољшање анализа cfDNA помоћу скрининга заснованог на NGS укључује одабир специфичних величина фрагмената cfDNA пре секвенцирања, анализу епигенетичких промена – метилације ДНК, развој алгоритама за биоинформатику и побољшање стандардизације. [1]

Због недостатка стандардизованих поступака у погледу прикупљања, изоловања и анализе узорка, још увек је тешко направити стварно поређење између различитих података у литератури. Конкретно, многи критички прегледи сугеришу потребу за проценом преаналитичких фактора укључених у прикупљање узорка који могу утицати на анализу cfDNA. Неки од тих фактора су сам биолошки узорак из кога се тестира cfDNA, затим у које се епрувете прикупља крв за анализу (са антикоагулансима или без њих), као и време за које анализа мора бити извршена пре него што дође до лизе крвних ћелија и контаминације. [5]

#### 1.2.1. Клиничка примена cfDNA

Недавни напредак у истраживању cfDNA наглашава потенцијалне примене течних биопсија у свакој фази управљања болешћу (Слика 4а). Ове примене произилазе првенствено из две врсте информација које се могу добити анализом cfDNA: квантификација степена болести и геномска анализа карцинома (Слика 4б). [22]

Постоји неколико нивоа примене cfDNA у клиничкој пракси:

1. Предијагностички за рану детекцију карцинома
2. Дијагностички за процену стадијума болести, порекла и карактеристика тумора, прогнозу и одабир терапије;

3. Постдијагностички за детекцију резидуалне болести, одговора на терапију и детекцију релапса;

Квантификација cfDNA за откривање минималне резидуалне болести је кључно подручје примене. Показано је да је количина cfDNA пропорционална резидуалном оптерећењу тумором након хируршке интервенције код карцинома желуца, плућа и дебелог црева. [5] Такође, одређивање cfDNA се ради и након потпуне ресекције тумора, а у циљу праћења могућег рецидива болести. Штавише, cfDNA може предвидети дијагнозу клиничког рецидива и неколико месеци пре.

Даље, молекулске карактеристике cfDNA могу упутити на различите опције у терапији, јер су карактеристике cfDNA огледало оних које има сам тумор. [5] Пример за то јесте канцер дојке, код кога је пронађена иста мутација у гену *TP53* и у молекулу cfDNA и у туморском ткиву, са подударношћу од 43 процената. (Garcia et al. 2006) Ово би могло имати важну примену у клиничкој пракси јер омогућава откривање мутација које могу реаговати на одређене лекове и током дијагностификовања болести и током лечења ради одабира одговарајуће терапије. Подвргавање тумора циљаној терапији представља селективни притисак на његове ћелије, при чему може доћи до клоналне еволуције и на тај начин формирања колонија које су отпорне на примењену терапију. [5] Стога, анализа cfDNA током лечења представља важан корак у праћењу болести. Промене у молекуларном профилу cfDNA могу се такође открити неколико месеци пре клиничке прогресије, пружајући важан увид у механизме резистенције и рану одлуку о лечењу. [31]

Проналазак мутације *EGFR* гена у cfDNA, корелација са мутацијама нађеним у туморском ткиву и испитивања у области *EGFR* циљане терапије довели су до тога да првог јуна 2016. године FDA



Слика 4. Апликација cfDNA анализа у оквиру клиничког тока болести. (а) Шематски временски курс за хипотетичког пацијента који је оперисан; (б) Класификација информација које се могу добити из cfDNA. (прилагођено из: Jonathan C. M. Wan et al. 2017.)

одобри коришћење лека гефитиниба код пацијената који поседују ову мутацију, а није могуће извршити ткивну биопсију.[5] Од 2015. године *Therascreen EGFR RGK PCR Kit* (QIAGEN, Хилден, Немачка) и *Cobas EGFR Mutation Test v2* (ажурирана верзија претходног *Cobas EGFR Mutation Test*) одобрени су за дијагностичку употребу у САД-у, а у Србији се прои мењују у дијагносици од 2018. године.

#### 1.2.2. цтДНК и ЦТЂ су комплементарни биомаркери

Изузетан напредак у пољу секвенцирања ДНК, подстакао је расправу о томе који од два биомаркера, cfDNA или ЦТЂ, је бољи за употребу у клиничким испитивањима.[19] Урађено је неколико упоредних испитивања cfDNA и ЦТЂ код исте групе пацијената, где је анализа cfDNA показала благу предност. Иако би cfDNA заиста могла пружити предност у погледу једноставности и осетљивости у поређењу са ЦТЂ, очекује се да ће појава нових платформи за обогаћивање ЦТЂ-а обезбедити повећани принос и једноставност есеја ЦТЂ-а. Такође, анализа ЦТЂ пружа додатне информације, као што је морфологија ћелија, имунохемијски фенотип и присуство дијагностичких епитопа.[19] Анализа појединачних ЦТЂ пружа прилику за комбиновање анализа на геномске мутације и профилисање иРНК, што пружа потенцијалну везу мутационог статуса и активације сигналних путева.[32] У истраживачким испитивањима, најупечатљивија предност ЦТЂ анализе је способност извођења *in vivo* функционалних испитивања како би се пружила прилика за решавање питања биологије метастаза.[33]

У пракси, cfDNA тренутно може бити пожељнија за мутацијску анализу, али ЦТЂ пружају неупоредиво средство за испитивање метастатске биологије и одређивање функционалне важности нових циљева за терапијску инхибицију.[19]

#### 1.2.3. Епигенетичко профилисање cfDNA и ЦТЂ код канцера

Када је у питању дијагностика, неки типови канцера имају већу стопу смртности од других, услед касног детектовања болести (стадијуми III и IV), а све то као узрок мањка технологије и биомаркера за рани скрининг болести. Већ је познато да би тачна биопсија могла бити потенцијално решење.

Последњих година, у истраживачким круговима све већу пажњу добија детекција епигенетичких карактеристика ћелија рака, а у оквиру њих највећа пажња до сад усмерена је на детектовању метилационог профила регулаторних региона у оквиру гена. Током година, многа истраживања су показала велики значај епигенетичких механизма, од еволутивног стварања нових врста, преко улоге у инактивацији X хромозома, до улоге у карциногенези. [48] Метилација регулаторних региона гена

повезује се са репресијом транскрипције и губитком протеина које ти гени кодирају. Хиперметилација промоторског региона великог тумор-супресор гена асоцирана је са пореклом великог броја канцера, што је и показано на примеру канцера оваријума, плућа и др. Такође, ниво метилације регулаторних региона варира у зависности од стадијума болести, типа канцера и примењене терапије. Показано је да се профил метилације мења у зависности од типа и дужине трајања терапије.

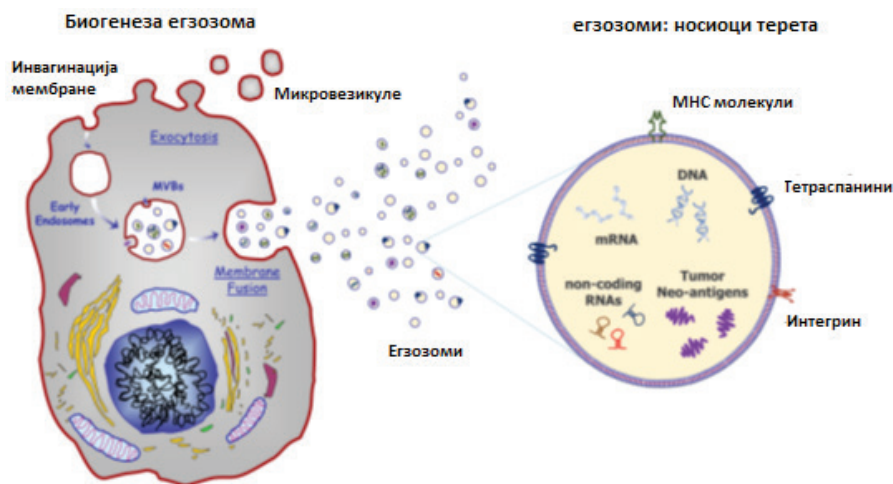
Тачна биопсија би могуће могла постати устаљено дијагностичко и прогностичко средство у клиници, где би ЦТЂ и cfDNA представљали извор за профилисање cfDNA, што би побољшало скрининг и рано откривање болести, као и предвиђање одговора на терапију.

#### 1.3. Екстрацелуларне везикуле

Екстрацелуларне везикуле (ЕВ) су нановезикуле величине од 50 до 1000 nm, а које секретују сви типови ћелија. Састоје се од липидног двослоја који окружује протеине, нуклеинске киселине и метаболите у унутрашњости.[1] Могу се детектовати у већини телесних течности: плазми, урину, пљувачки или асциту.[2] Сваки подтип ЕВ има свој пут биогенезе и може се окарактерисати или делити одређени скуп протеина (Слика 5). Међутим, до сада не постоји консензус о класификацији подтипова ЕВ заснованих на карактеристикама протеина. Посебан подтип ЕВ, егзозоми (ЕХО), су крајњи производ ендозомалног пута рециклаже.[34] Иако су се некада сматрале ћелијским одпадом[35], данас је познато да ЕХО учествују у процесима међућелијске комуникације како локално, тако и на већој удаљености, корестећи за то крвне и лимфне путеве.[36] Полуживот ЕВ варира, и нађено је да оно износи од 20 до 180 минута, а концентрација ЕВ код здравих особа је приближно  $1,46 \times 10^{11}/\text{mL}$  плазме.[37,38]

Напредак на пољу истраживања егзозома стално расте, како у биологији, тако и у медицини. Иако постоје бројне студије које се баве проучавањем клиничке користи и дијагностичког потенцијала ЕВ, и даље је неопходно радити на напретку техника за изоловање и карактеризацију истих.[2] Егзозоми учествују у великом броју физиолошких и патолошких процеса, а показало се да имају своју улогу и у прогресији карцинома и процесима метастазе.[39] Према протеомским анализама, утврђено је да ЕВ карактерише очувани скуп протеина независно од њиховог ћелијског порекла, као што су CD63, CD81 и CD9 тетраспанини.[34]

Развијено је неколико метода за ефикасно изоловање егзозома из телесних течности: ултрацентрифугирање, преципитација, имуноафинитетно везивање и раздвајање засновано на величини.[40] До данас, за уобичајени протокол изоловања усвојено је серијско центрифугирање са



Слика 5. Биогенеза егзозома и њихов састав. Егзозоми се састоје од липидног двослоја који садржи и трансмембранске и немембранске протеине, као и некодирајуће РНК, мРНК и једноланчану или дволанчану ДНК. Такође изражавају конзервирани скуп протеина независно од ћелијског порекла, укључујући CD63, CD81 и CD9 тетраспанине, док су они из ћелија карцинома богати антигенима повезаним са туморима. (прилагођено из: *Raffaele Palmirotta et al. 2018.*)

све већом брзином како би се уклонили ћелијски остаци и веће везикуле изведене из плазме, праћено седиментацијом ЕХО ултрацентрифугирањем. Иако је ова метода широко прихваћена, она има неколико недостатака. Наиме, процес ултрацентрифугирања има за последицу контаминацију и губитак ЕХО, захтева доста времена и није селективан у раздвајању ЕХО који потичу из тумора и оних који потичу из других ћелија. [5] Имуноесеји за изоловање, као што су ензимски имуно-тест на микроплочи и тестови на магнетним честицама обложеним антителима, препознају специфичне антигене на површини егзозома, доводећи до селективног изоловања одређених егзозома. [41]

Међутим, мноштво метода за одвајање и карактеризацију ЕВ, суштинска хетерогеност подтипова ЕВ и сложеност телесних течности блокирају пут ка тачности и хомогености у истраживањима и клиничкој примени ЕВ. [42]

### 1.3.1. Клиничка примена ЕВ у онкологији

Након изоловања и испитивања уз помоћ електронске микроскопије или проточном цитометријом, егзозоми који потичу из тумора испитују се на нивоу експресије протеина или генетичког профила, као дијагностички или прогностички маркери. Један од примера анализе протеина ЕХО као предиктивних маркера јесте и детекција простата-специфичних мембранских протеина укључујући PSMA, транслутаминазе и простата стем ћелијског антигена, у егзозомима из ћелија канцера простате. [43] Такође, од великог аналитичког значаја су и молекули ДНК и РНК упаковани у ове везикуле, а могу послужити и за праћење одговора на терапију. [5] Један од примера јесте и панкреасни карцином, код кога су описани специфични егзозомални миРНК (енгл. miRNA-

*micro RNA molecules*) молекули, као што су miR-1246, miR-4644, miR-3976 и miR-4306, који учествују у регулацији, или miR-211 који је прекомерно експримиран код пацијената са меланомом. На крају, ЕХО су такође обogaћени једноланчаним или дволанчаним фрагментима ДНК из свих хромозома, што доводи до идентификације генских мутација, као што су KRAS и EGFR мутације, што је већ доказано код пацијената са раком панкреаса. [44]

Посебан акценат ставља се на могућност изоловања и анализе нановезикула из имуних ћелија. Ово има јасну и директну клиничку применљивост, јер фенотипски профил егзозома изведених из имуних ћелија може одражавати статус активације имуног система и пружати корисне информације за предвиђање одговора на имунотерапијске лекове. Друге могуће клиничке примене егзозома у онкологији укључују могућност испоруке лека или миРНК унутар ћелија тумора, идентификацију нових терапијских циљева који инхибирају молекуларне механизме укључене у прогресију карцинома, као и стимулацију имунолошког одговора против ћелија карцинома. Мада су ови нови приступи и даље у домену истраживања. [5]

### 1.4. Циркулишућа РНК као маркер течне биопсије

У поређењу са анализом соматских мутација у гДНК, која пружа само информације о молекуларном стању ћелије из које потиче, анализа транскрибованих РНК врста може дати допунске информације у вези са профилима експресије гена или епигенетичким променама. Ово је посебно важно за праћење одговора на терапију код пацијената са карциномом, јер се терапијска резистенција често ослања на епигенетичке промене. [45] Присуство РНК у крви пацијената са карциномом први пут је детектовано 1996. године и то је била информациона

РНК тирозиназе, а концентрација РНК корелирала је са стадијумом болести.[46] Данас се посебан значај придаје слободно циркулишућим молекулама миРНК, због њиховог обима, затим јер указују на специфичан профил ткива и тумора, стабилности (упаковане у нановезикуле или у комплексима са протеинима) и способности да мењају ниво експресије гена на дејство појединих стимулуса.[1]

Хемопоетски систем је такође доминантан извор cfmiRNA (енгл. cfmiRNA- *cell-free microRNAs*). Хематопоетске ћелије могу ослободити исте миРНК као и ћелије карцинома, чиме ометају идентификацију правог биомаркера карцинома. Сходно томе, када се тражи прави биомаркер рака на бази миРНК, боље је тражити групу миРНК него се фокусирати на једну миРНК, што се показало корисним за дијагнозу хепатоцелуларног карцинома и рака дојке. Потенцијал cfmiRNA као биомаркера није ограничен само на информације које пружају ћелије карцинома, такође, и ћелије из микрооколине тумора ослобађају миРНК које могу поспешити развој тумора и стога су подједнако важне за постављање дијагнозе.[47] Циркулишућа РНК се може изоловати и из серума и из плазме, а посебна предност није дата ни једној од њих. Иако су пронађене разлике у миРНК профилима обе врсте телесних течности, укупна концентрација cfRNA је остала слична, мада је она под утицајем већег броја фактора.

РНК се изолује уз помоћ комерцијалних сетова за изоловање, а количина добијене РНК зависи од стартне количине биолошког материјала. Због своје мале величине и ниске концентрације, миРНК се могу изгубити током екстракције лепљењем на пластику. То се може спречити додавањем tРНК (енгл. tRNA-*transfer RNA*) носача или гликогена, при чему се предност даје овом другом, јер tРНК може ометати даљу анализу.

Поље истраживања cfRNA и даље је у развоју, а методе анализе експресије РНК, а посебно методе секвенцирања се и даље оптимизују.[1]

## **2. ТЕЧНА БИОПСИЈА У ТРЕНУТНОЈ КЛИНИЧКОЈ ПРАКСИ; БУДУЋИ АСПЕКТИ**

С обзиром на свој потенцијал, током последњих неколико година течна биопсија је почела да привлачи интересовање у контексту рутинске молекуларне дијагностике. Иако је анализа cfDNA оптимизована за рутинску дијагностичку употребу (са строгим стандардним оперативним процедурама и усклађеношћу добре клиничке праксе), за ЦТЂ још увек нема такве успостављене праксе, осим изражавања њиховог броја.[17]

Течна биопсија (ограничена на анализу cfDNA) званично је усвојена као дијагностичко средство у лабораторијама референтних центара током 2016. године. У сваком случају, смањена инвазивност

дијагностичких поступака главна је предност у клиничкој рутини, али и са финансијског становишта. Упркос својој атрактивности, течна биопсија и даље је лимитирана на ограничени број клиничких примена, укључујући примарну дијагнозу тумора, процену одговора на лечење, праћење терапије, откривање минималне резидуалне болести, процену хетерогености тумора и појаву резистенције на циљане терапије. Тренутно је одређивање резистенције на циљану терапију главни покретач рутинске молекуларне дијагностике.[4]

ЦТЂ и cfDNA чине језгро дијагностике течне биопсије и отворили су пут ка новим правцима у терапији и лечењу карцинома. Течна биопсија може да послужи као ефикасна алтернатива у случајевима када је примарни тумор тешко биопсирати. Течна биопсија могла би да помогне стратификацији пацијената и усмери модалитете скрининга на популацију са већим ризиком, смањујући тако нежељене ефекте (нпр. зрачење при мамографији) и трошкове здравствене заштите. Можда би било релевантније користити ЦТЂ и cfDNA током системске терапије, а не као маркере ране дијагнозе, где су препреке осетљивост и селективност. Међутим, за евентуалну клиничку корисност свих ових маркера и даље је потребно више валидације.[2]

Иако су се последњих година акумулирали све већи докази о њеној клиничкој употреби, течна биопсија и даље наилази на ограничен простор у тренутној рутинској дијагностици, углавном ограниченој на анализу cfDNA на резистентне мутације.[4]

## **3. ЗАКЉУЧАК**

Течне биопсије су обећавајуће за побољшање раног откривања рака и праћење одговора на терапију, што последично побољшава целокупно преживљавање пацијента. Међутим, истраживачки пројекти течне биопсије ретко пронађу пут до клиничке примене због недостатка поновљених резултата.[1]

Слично традиционалним биопсијама, течна биопсија ЦТЂ, cfDNA и ЕХО нуди читав спектар информација које омогућавају извођење функционалних студија. Ипак, за разлику од традиционалних техника, течна биопсија је способна да прихвати просторну и временску хетерогеност која стоји у биолошкој основи рака.[5] Сваки од ова три биомаркера течне биопсије има своје предности и ограничења. Претпоставља се да би дијагностика и управљање карциномом били успешни уколико би се вршила истовремена анализа свих маркера течне биопсије, јер се анализа на једном маркеру показала као неутемељена због хетерогености и варијација нивоа биомаркера међу и унутар различитих

појединаца.[2]

Упркос томе, велика очекивања од течне биопсије као новог алата за дијагнозу и праћење рака вероватно ће подстаћи истраживања у овој области у наредним годинама, са циљем да се одговори на многа преостала питања и на крају процени да ли ће течна биопсија бити пробој у управљању пацијентима са раком.[4]

Abstract

#### THE USE OF LIQUID BIOPSY FOR THE DIAGNOSIS OF MALIGNANT DISEASES: PRINCIPLES AND CURRENT PRACTICE

**Katarina ŽIVIĆ**, MSc Biochemistry Junior research assistant, Molecular Genetics Laboratory,

**Miljana TANIĆ**, Senior Research Associate, Molecular Genetics Laboratory,

Institute of Oncology and Radiology of Serbia, Belgrade, Serbia

For years, the focus of scientists' research has been the mechanisms that lead to the onset of cancer, as a basis for the further development of diagnostic approaches in its early detection, as well as the development of personalized therapy and increasing the survival rate of patients suffering from cancer. The current gold standard of diagnosis is biopsy of tumor tissue, which has several limitations, and the development of other diagnostic approaches is expanding. In recent years, liquid biopsy has become the center of research in clinical oncology, both because of its non-invasive approach and because it opens the door to a much larger area of investigation than tissue biopsy. The term liquid biopsy refers to the sampling of biological material that does not include solid tumor tissue, such as blood, urine, saliva, cerebrospinal fluid, etc. There are three basic markers of liquid biopsy, circulating tumor cells, circulating DNA and exosomes, which together form a huge area of research that offers enormous progress in the field of diagnosing, monitoring diseases and predicting adequate targeted therapy.

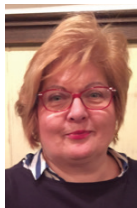
Захвалница: Овај текст је проистекао из мог семинарског рада на предмету Развој неинвазивних метода за дијагностику малигнух болести (<https://chem.bg.ac.rs/predmeti/486B2.html>). Захваљујем се др Милици Поповић, ванредном професору Хемијског факултета Универзитета у Београду, на саветима и помоћи у писању рада.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Geeurickx, E. & Hendrix, A. Targets, pitfalls and reference materials for liquid biopsy tests in cancer diagnostics. *Mol. Aspects Med.* **72**, 100828 (2020).
2. Vaidyanathan, R., Soon, R. H., Zhang, P., Jiang, K. & Lim, C. T. Cancer diagnosis: from tumor to liquid biopsy and

- beyond. *Lab Chip* **19**, 11–34 (2019).
3. Pantel, K. & Alix-Panabières, C. Liquid biopsy: Potential and challenges. *Mol. Oncol.* **10**, 371–373 (2016).
4. Castro-Giner, F. *et al.* Cancer Diagnosis Using a Liquid Biopsy: Challenges and Expectations. *Diagnostics* **8**, 31 (2018).
5. Palmirotta, R. *et al.* Liquid biopsy of cancer: a multimodal diagnostic tool in clinical oncology. *Ther. Adv. Med. Oncol.* **10**, 1–24 (2018).
6. Parkinson, D. R. *et al.* Considerations in the development of circulating tumor cell technology for clinical use. *J. Transl. Med.* **10**, (2012).
7. Tibbe, A. G. J., Miller, M. C. & Terstappen, L. W. M. M. Statistical considerations for enumeration of circulating tumor cells. *Cytom. Part A* **71**, 154–162 (2007).
8. Alix-Panabières, C. & Pantel, K. Circulating tumor cells: Liquid biopsy of cancer. *Clin. Chem.* **59**, 110–118 (2013).
9. Racila, E. *et al.* Detection and characterization of carcinoma cells in the blood. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 4589–4594 (1998).
10. Allard, W. J. *et al.* Tumor cells circulate in the peripheral blood of all major carcinomas but not in healthy subjects or patients with nonmalignant diseases. *Clin. Cancer Res.* **10**, 6897–6904 (2004).
11. Nagrath, S. *et al.* Isolation of rare circulating tumour cells in cancer patients by microchip technology. *Nature* **450**, 1235–1239 (2007).
12. Satelli, A., Brownlee, Z., Mitra, A., Meng, Q. H. & Li, S. Circulating tumor cell enumeration with a combination of epithelial cell adhesion molecule-and cell-surface vimentin-based methods for monitoring breast cancer therapeutic response. *Clin. Chem.* **61**, 259–266 (2015).
13. Pantel, K. *et al.* Circulating epithelial cells in patients with benign colon diseases. *Clin. Chem.* **58**, 936–940 (2012).
14. Correnti, M. & Raggi, C. Stem-like plasticity and heterogeneity of circulating tumor cells: Current status and prospect challenges in liver cancer. *Oncotarget* **8**, 7094–7115 (2017).
15. Bidard, F. C. *et al.* Clinical validity of circulating tumour cells in patients with metastatic breast cancer: A pooled analysis of individual patient data. *Lancet Oncol.* **15**, 406–414 (2014).
16. Scher, H. I. *et al.* Circulating tumor cell biomarker panel as an individual-level surrogate for survival in metastatic castration-resistant prostate cancer. *J. Clin. Oncol.* **33**, 1348–1355 (2015).
17. Cristofanilli, M. Circulating Tumor Cells, Disease Progression, and Survival in Metastatic Breast Cancer. *Semin. Oncol.* **33**, 9–14 (2006).
18. De Bono, J. S. *et al.* Circulating tumor cells predict survival benefit from treatment in metastatic castration-resistant prostate cancer. *Clin. Cancer Res.* **14**, 6302–6309 (2008).
19. Krebs, M. G. *et al.* Molecular analysis of circulating tumour cells - Biology and biomarkers. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **11**, 129–144 (2014).
20. Alix-Panabières, C. & Pantel, K. Clinical applications of circulating tumor cells and circulating tumor DNA as liquid biopsy. *Cancer Discov.* **6**, 479–491 (2016).
21. Pixberg, C. F., Schulz, W. A., Stoecklein, N. H. & Neves, R. P. L. Characterization of DNA methylation in circulating tumor cells. *Genes (Basel)*. **6**, 1053–1075 (2015).
22. Wan, J. C. M. *et al.* Liquid biopsies come of age: Towards implementation of circulating tumour DNA. *Nat. Rev. Cancer* **17**, 223–238 (2017).
23. Koffler, D., Agnello, V., Winchester, R. & Kunkel, H. G.

- The occurrence of single-stranded DNA in the serum of patients with systemic lupus erythematosus and other diseases. *J. Clin. Invest.* **52**, 198–204 (1973).
24. Bettegowda, C. *et al.* Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies. *Sci. Transl. Med.* **6**, (2014).
  25. Diehl, F. *et al.* Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics. *Nat. Med.* **14**, 985–990 (2008).
  26. Jiang, P. & Lo, Y. M. D. The Long and Short of Circulating Cell-Free DNA and the Ins and Outs of Molecular Diagnostics. *Trends Genet.* **32**, 360–371 (2016).
  27. Goodwin, S., McPherson, J. D. & McCombie, W. R. Coming of age: Ten years of next-generation sequencing technologies. *Nat. Rev. Genet.* **17**, 333–351 (2016).
  28. Rothwell, D. G. *et al.* Utility of ctDNA to support patient selection for early phase clinical trials: the TARGET study. *Nat. Med.* **25**, 738–743 (2019).
  29. Xu, R. H. *et al.* Circulating tumour DNA methylation markers for diagnosis and prognosis of hepatocellular carcinoma. *Nat. Mater.* **16**, 1155–1162 (2017).
  30. Ali, N., Rampazzo, R. D. C. P., Costa, A. Di. T. & Krieger, M. A. Current Nucleic Acid Extraction Methods and Their Implications to Point-of-Care Diagnostics. *Biomed Res. Int.* **2017**, (2017).
  31. Dawson, S.-J. *et al.* Analysis of Circulating Tumor DNA to Monitor Metastatic Breast Cancer. *N. Engl. J. Med.* **368**, 1199–1209 (2013).
  32. Klein, C. A. *et al.* Combined transcriptome and genome analysis of single micrometastatic cells. *Nat. Biotechnol.* **20**, 387–392 (2002).
  33. Baccelli, I. *et al.* Identification of a population of blood circulating tumor cells from breast cancer patients that initiates metastasis in a xenograft assay. *Nat. Biotechnol.* **31**, 539–544 (2013).
  34. Théry, C., Zitvogel, L. & Amigorena, S. Exosomes: Composition, biogenesis and function. *Nat. Rev. Immunol.* **2**, 569–579 (2002).
  35. Pan, B. T. & Johnstone, R. M. Fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes in vitro: Selective externalization of the receptor. *Cell* **33**, 967–978 (1983).
  36. Zomer, A. *et al.* In vivo imaging reveals extracellular vesicle-mediated phenocopying of metastatic behavior. *Cell* **161**, 1046–1057 (2015).
  37. Geeurickx, E. *et al.* The generation and use of recombinant extracellular vesicles as biological reference material. *Nat. Commun.* **10**, 1–12 (2019).
  38. Lai, C. P. *et al.* Dynamic biodistribution of extracellular vesicles in vivo using a multimodal imaging reporter. *ACS Nano* **8**, 483–494 (2014).
  39. Gmbh, R. D. The Multiple Roles of Exosomes in Metastasis. **16**, (2017).
  40. Li, P., Kaslan, M., Lee, S. H., Yao, J. & Gao, Z. *The r a n o s t i c s* Progress in Exosome Isolation Techniques. **7**, (2017).
  41. Logozzi, M. *et al.* High Levels of Exosomes Expressing CD63 and Caveolin- 1 in Plasma of Melanoma Patients. **4**, (2009).
  42. Wever, O. De. A supporting ecosystem to mature extracellular vesicles into clinical application. 1–5 (2019) doi:10.15252/embj.2018101412.
  43. Mitchell, P. J. *et al.* Can urinary exosomes act as treatment response markers in prostate cancer ? **1**, 1–13 (2009).
  44. Kahlert, C. *et al.* Report : Identification of Double Stranded Genomic DNA Spanning all Chromosomes with Mutated KRAS and p53 DNA in the Serum Exosomes of Patients with Pancreatic Cancer Supplemental material : Identification of Double Stranded Genomic DNA Spanning all Chromosomes with Mutated. 0–13 (2014) doi:10.1074/jbc.C113.532267.
  45. Rna, N. & Esteller, M. Non-coding RNAs in human disease. *Nat. Publ. Gr.* **12**, 861–874 (2011).
  46. Cancer, S. S. Detection of Tyrosinase mRNA from the Blood of Melanoma Patients ' . **5**, 293–296 (1996).
  47. Biology, C., Okada, H., Kohanbash, G. & Lotze, M. T. The International Journal of Biochemistry MicroRNAs in immune regulation — Opportunities for cancer immunotherapy. **42**, 1256–1261 (2010).
  48. Trygve O. Tollefsbol, Handbook of Epigenetics: The New Molecular and Medical Genetics; Epigenetics: The New Science of Genetics, *Elsevier*; Second edition, 3-6 (2017)



**Весна В. Драгутиновић**

Институт за хемију у медицини, Медицински факултет, Универзитет у Београду

Е-пошта: vesna.dragutinovic@med.bg.ac.rs

## УЛОГА МИКРОЕЛЕМЕНАТА И МАТРИКСНИХ МЕТАЛОПРОТЕИНАЗА У КАНЦЕРОГЕНЕЗИ

У ери велике заступљености канцерогених, кардиоваскуларних обољења, артритиса потребни су нови параметри који би указали на одређене патологије уз допуну са већ класичним дијагностичким методама и провереним маркерима. Поједини микроелементи показују промене њихових концентрација код канцерогених обољења у односу на здраву популацију и на друга бенигна обољења. Одређивање њихових концентрација у серуму или ткиву у комбинацији са одређеним ензимима представља добар додатни параметар дијагностике.

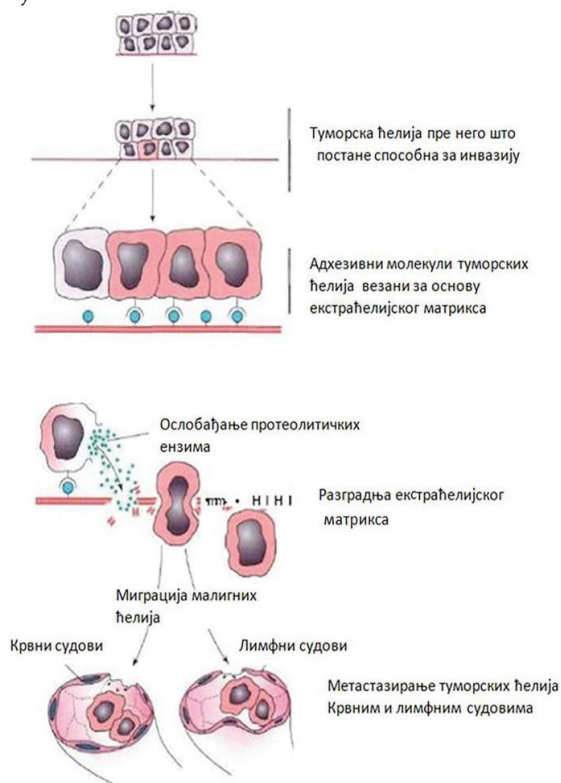
### УВОД

Канцерогенеза, као комплексан процес, који се одвија у више фаза, условљен је генетском предиспозицијом и факторима спољне средине. У факторе спољне средине спадају хемијски, физички, вирусни или други канцерогени који изазивају малигну трансформацију ћелија са неконтролисаним растом. Тачни механизми преко којих ови фактори утичу на појаву канцера нису у потпуности разјашњени али се према ефектима које изазивају канцерогени сврставају у генотоксичне и негенотоксичне. Генотоксични

ефекти настају директним деловањем неке супстанце или њеног метаболита на ДНК што узрокује појаву мутација у ланцу ДНК. Негенотоксични канцерогени су група супстанци које не реагују са ДНК али делују као стимулатори пролиферације ћелија у миновању – митогени и група супстанци – цитокини, који могу изазивати пролиферацију ћелија као одговор на стимулансе.

Иницијација представља прву трајну промену, која се дешава у ћелијама циљног ткива након излагања хемијском карциногену. Обично је једна доза довољна за иницијалну активност већине карциногена, али тако инициране ћелије не морају да се трансформишу у малигне, осим ако није укључена и друга фаза хемијске канцерогенезе – промоција. Промоција је пролиферација иницираних ћелија која доводи до формирања малигнух клонова. Фактори који делују после иницијације и изазивају тумор су промотери, међу њима су бројни лекови, хормони, фактори раста, фактори исхране и различити продукти биљака. Следећа фаза је прогресија у којој услед акумулације генетских мутација долази до раста тумора и настанка канцера, док је последња фаза канцерогенезе фаза у којој малигне ћелије стичу способност инвазије и метастазирања.

Резултат акумулације низа мутација гена је малигна трансформација ћелије, што доводи до поремећаја у нормалном хомеостатском механизму ткива, у контроли раста и пролиферацији ћелија. Мутације настају и акумулирају се током еволуције неоплазме. Сваки клон малигнух ћелија, поседује специфичан, јединствен профил мутација. Мутација се претвара у наследну промену ДНК после репликације и деобе ћелије.



За раст и ширење малигног тумора, поред новостечених карактеристика туморских ћелија, неоваскуларизације и хетерогености потребан је и низ додатних ефеката да би се малигна ћелија одвојила од примарне масе тумора и преко крвних и лимфних судова прешла у неке удаљене органе – метастазирала.

Процес метастазирања је динамички процес који започиње локалном инвазијом екстрацелуларног матрикса уз присуство протеолитичких ензима (Слика 1) [1].

## МАТРИКСНЕ МЕТАЛОПРОТЕИНАЗЕ

Повећање протеолитичке активности, карактеристично је за процес прогресије тумора, пробијање екстрацелуларног матрикса и појаву метастаза.

Матриксне металопротеиназе (ММП) обухватају фамилију ензима који разлажу протеинске супstrate на основу механизма који укључује активацију молекула воде везаног за активно место помоћу јона  $Zn^{2+}$ .

Иако је каталитички домен ММП структурно веома сличан, постоје многе разлике у погледу специфичности супстрата, ћелијске и ткивне локализације, везивања и регулације мембране које чине ову фамилију веома разноврсних ензима са мноштвом физиолошких функција, међу којима многе још нису у потпуности схваћене [2].

У суштини, сви чланови породице ММП су повезани са развојем болести, посебно са метастазама канцера, хроничном упалом и оштећењем ткива које је уследило, као и са неуролошким поремећајима.

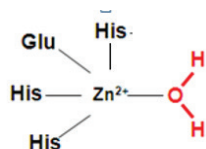
Ово је утицало на истраживања кроз научне радове и студије о ММП инхибиторима (ТИМП-ови) као терапеутским агенсима, као и о мерењу нивоа ММП као дијагностичких или прогностичких маркера.

Матриксне металопротеиназе су цинк зависне ендопептидазе, које хидролизују ванћелијски матрикс и играју главну улогу у пролиферацији ћелија, миграцији, диференцијацији и ангиогенези [3-8]. Протеиназе, које играју централну улогу у многим биолошким процесима: ембриогенеза, нормално функционисање ткива и код болести као што су артритис, канцер, кардиоваскуларна обољења и др.

До данас су идентификоване 24 различите ММП кичмењака, од којих се 23 налазе код људи. Прва откривена активност ММП била је колагеназа у репу пуноглавца који пролази кроз метаморфозу. ММП се генерално састоје од продомена, каталитичког домена, зглобног региона и домена хемопексина.

Матриксне металопротеиназе карактерише:

1. присуство двовалентног јона у њиховом активном центру (најчешће јона  $Zn^{2+}$ )
2. присуство очуваног мотива His-Glu-aa-His-aa-Gly-aa-His који представља лиганд јонима цинка



Метални јон повезан је са протеином путем лиганда, који кординирају метални јон и могу да варирају између хистидина, глутамата, аспартата, лизина и аргинина. Координационо место заузима и лабилни молекул воде лиганда,

Двовалентни метални јон су најчешће: цинк, кобалт или магнезијум. Металопротеиназе се могу поделити у две групе на основу броја металних јона који учествује у катализи. Најчешће је један јон цинка, али код неких цинк-зависних протеаза потребна су два јона за катализу.

Према супстрату на коме делују подељене су на следеће групе, приказане у табели 1:

Табела 1. Подела матриксних металопротеиназа према супстрату

Колагеназе	ММП 1, ММП 8, ММП 13
Желатиназе	ММП 2, ММП 9
Стромелизин	ММП 3, ММП 10, ММП 11
Мембрански тип ММП	ММП 14, ММП 15, ММП 16, ММП 17, ММП 24, ММП 25
Матрилизин	ММП 7, ММП 26
Енамелизин	ММП 20
Остале	ММП 19, ММП 21, ММП 23А, ММП 23Б, ММП 27, ММП 28, ММП 23В, ММП 27, ММП 28)
Металоелестазе	ММП 12
Инхибитори	ТИМП 1, ТИМП 2, ТИМП 3, ТИМП 4
Потенцијални пробудиолац транскрипција	BSG, TCF <sub>20</sub> , TNF

У нормалним физиолошким условима протеолитичка активност ММП-а се контролише у било којој од следеће три познате фазе:

- активација зимогена,
- транскрипција и
- инхибиција активних облика разним ткивним инхибиторима ММП (ТИМП)

У патолошким стањима – повећана активност ММП доводи до деградације ткива.

## МИКРОЕЛЕМЕНТИ

Микроелементи су хемијски елементи чија је концентрација веома ниска (елементи у траговима, trace elements). У области биохемије подразумева

се сваки елемент који је у веома малим количинама потребан за правилан раст, развој организма и одвијање физиолошких процеса. Значајни микроелементи у организму су: гвожђе, бакар, цинк, манган, кобалт и јод.

Јони бакра и цинка су кофактори супероксид дисмутазе 1, која спречава настанак и прогресију тумора кроз механизме заштите ћелија од производње слободних радикала.

Функција цинка (Zn) се може описати као: каталитичка, регулаторна и структурна. Хомеостаза цинка се контролише координисаним деловањем Zn транспортера који регулише интрацелуларну и екстрацелуларну концентрацију и дистрибуцију цинка. Цинк је важан за нормалну хомеостазу штитасте жлезде. Његова функција је сложена и може укључивати ефекте и на синтезу и на начин деловања хормона. Транскрипциони фактори који се везују за тироидне хормоне, који су неопходни за модификацију експресије гена, садрже цинк везан за остатке цистеина. У култивисаним ћелијама, веома јаки хелатори цинка су потребни да утичу на везивање транскрипционих фактора за ДНА. У штитастој жлезди, фактор транскрипције 2, који је у интеракцији са промоторима гена тиреоглобулина и тиреопероксидазе, је протеин који садржи цинк. Ниска концентрација Zn повезана је са смањеним нивоом тироидних хормона.

Верује се да је бакар (Cu) прекидач који се укључује у процес ангиогенезе у туморским ћелијама. Високи нивои бакра у серуму налазе се код пацијената са многим типовима прогресивних тумора, што Cu чини обавезним кофактором у процесу ангиогенезе.

## МАТРИКСНЕ МЕТАЛОПРОТЕИНАЗЕ КАО БИОМАРКЕРИ

Посебну улогу у канцерогенези имају желатиназе: желатиназа А (ММП-2) и желатиназа Б (ММП-9). Повезаност желатиназа са туморским метастазама и ангиогенезом довела је до мноштва истраживачких радова о улози ММП-2 и -9 у различитим малигним процесима. Ова хипотеза је прво потврђена опажањем да ММП-2 код мишева показује смањену ангиогенезу и прогресију тумора. Од тада, ММП су идентификоване као важни чиниоци у ангиогенези, расту и метастазама тумора.

За раст тумора неопходан је развој новог васкуларног система, јер ће без нових крвних судова величина тумора бити ограничена. Желатиназе су првенствено укључене у овај процес тако што омогућавају протеолитичку деградацију васкуларне базалне мембране, отварајући пут за миграцију ендотелних ћелија да формирају нове крвне судове. ММП-2 је даље способна да цепа ламинин-5, који након деградације ствара место које повећава миграцију ендотелних ћелија и ослобађање VEGF-а који стимулише ангиогенезу, не само у физиолошким условима већ и током



развоја тумора. Раст тумора може бити стимулисан активношћу желатиназе, а показао је да ММП-2 и -9 ослобађају факторе раста. Метастаза тумора је процес који укључује ослобађање појединачних туморских ћелија, миграцију ових ћелија у крвни суд, продирање у крвоток или лимфни систем и коначно адхезију на ендотел крвних судова и екстравазацију у ткиво на месту метастазе. ЕЦМ деградирајућа својства желатиназе су кључне како за илазак метастатских ћелија из масивног тумора, тако и за њихов улазак на место метастазе.

Повећана експресија и активност желатиназе описана је у стотинама публикација у вези са малигним болестима у распону од канцера дојке, урогениталних карцинома, тумора мозга, канцер плућа, канцер коже, колоректални канцер, као и многи други. Занимљиво је да су многи аутори пронашли позитивну корелацију између експресије или активности желатиназе и инвазивног потенцијала тумора, поново наглашавајући кључну улогу ММП-2 и -9 у метастазама.

Осим у онкологији, активност желатиназе се истражује у неколико других области истраживања. ММП-2 је идентификован као могући маркер код кардиоваскуларних болести, пошто је идентификован као протеаза одговорна за деградацију вазодилаторног пептида адренемедулина, при чему један од резултирајућих фрагментних пептида има вазоконстриктивна својства, вероватно што доводи до хипертензије.

Истраживање корелација експресије ММП-2 и ММП-9 у серуму (SDS-PAGE зимографија) код колоректалног карцинома показала су повећане нивое ММП-2 и ММП-9 у поређењу са контролном групом. Постојала је значајна корелација у нивоима ММП код пацијената са I и II стадијумом тумора и пацијената са III и IV стадијумом тумора. Добијени резултати нису показали корелацију између нивоа СЕА, СА 19-9 и присуства ММП-2 или ММП-9. Ткивна експресија ММП-9 је била позитивна код 85% пацијената позитивних на ММП-9 серума код колоректалног карцинома. Прекомерна експресија ММП-2 и ММП-9 снажно сугеришу његову повезаност са колоректалним аденокарциномом. Експресија ММП-9 утврђена је имунохистохемијски и у ткиву колоректалног карцинома код пацијената позитивних на ММП-9 у серуму [9].

Проучавана је и активност протеиназа код различитих стадијума карцинома желуца, а резултати су показали изражену активност у серуму стадијума III и IV у поређењу са стадијумима I и II. ПроММП-9 је детектован у серуму пацијената са карциномом желуца електрофорезом у СДС полиакриламидном гелу (SDS-PAGE) и SDS-PAGE зимографијом, са молекулском масом од 92 kDa [10,11].

Поред истраживања дигестивног тракта рађено је и на узорцима папиларног и медуларног тироидног карцинома [12-18].

Проучавање микроелемената, ММП-2, ММП-9 и њихових инхибитора ТИМП-2 и ТИМП-1 рађено је код медуларног тироидног канцера, пре операције, стадијума I и II. Од микроелемената бакар и цинк показују промене у односу на контролне пробе, а ММП-2 и ММП-9 активност у ткивима оболелих. Израженија је активност инхибитора ТИМП-1 и ТИМП-2 одговарајућих матрикс металопротеиназа (ММП-9 и ММП-2).

Активност ММП-а регулисане су ТИМП-овима (инхибирају функцију ММП-а), чиме инхибирају раст и метастазе тумора, а недавни подаци показују да ТИМП-ови имају много улога у туморогенези. Инхибитори ММП-а делимично регулишу протеолитичку активност, стимулишу раст тумора и инхибирају апоптозу туморских ћелија, а делују и као функционални регулатори малигне трансформације.

Многе студије из ове области указују да ТИМП-1 има улогу у колоректалној карциногенези. Резултати показују да се ТИМП-1 може користити као биомаркер за прогнозу пацијената са колоректалним карциномом и као дијагностички маркер за откривање [19-25].

## МИКРОЕЛЕМЕНТИ У КАНЦЕРОГЕНЕЗИ

Многи аутори су одређивали концентрације неких елемената у траговима као што су Cu, Zn, манган (Mn) и гвожђе (Fe) а резултати су показали различите вредности од контролне групе као и у поређењу са групом бенигну обольења.

Постоји неколико публикација у којима се наводи да је однос Cu/Zn у крви пацијената са карциномом штитасте жлезде значајно већи него код других болести штитасте жлезде. Концентрација јона Zn у малигном ткиву штитасте жлезде била је значајно нижа него у бенигну тироидном ткиву, што указује на укључивање ових јона у карциногени процес.

Наша истраживања била су усмерена на процени значаја концентрација Cu и Zn, односа Cu/Zn у серуму, као и њихова повезаност са матрикс металопротеиназама (ММП) код пацијената са папиларним тироидним карциномом (класична и фоликуларна варијанта) у поређењу са бенигну тироидним обольењима [26, 27].

## ЗАКЉУЧАК

На основу великог броја радова из области матриксних металопротеиназа, као и микроелемената код канцерогених обольења можемо закључити да указују на промене повећање експресије ММП и промене концентрације код оболелих пацијената у поређењу са групом здравих пацијената као и са групом оболелих од бенигну болести. Ови резултати указују на додатне параметре код дијагностиковања болести, уз стандардне класичне методе.

## Abstract

### THE ROLE OF MICROELEMENTS AND MATRIX METALLOPROTEINASES IN CARCINOGENESIS

Vesna V. Dragutinović, Department of Chemistry in Medicine, Faculty of Medicine, University of Belgrade

In the era of high representation of cancerous diseases, cardiovascular diseases, arthritis, new parameters are needed that would indicate certain pathologies in the very beginnings of the disease.

Trace elements show changes in their concentrations in cancerous diseases compared to the healthy population and other benign diseases. Determination of their concentrations in serum or tissue in combination with proteolytic enzymes - matrix metalloproteinases can be additional diagnostic parameters, in addition to the classic standard methods.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Kumar, V., Abbas, A.K., Aster, Robbins & Cotran Pathologic basis of disease (Ninth edition). Philadelphia. PA: Elsevier/Saunders, (2015).
2. Handbook of Proteolytic Enzymes (second edition). Eds. Barret, A.J., Rawlings, N.D., Woessner, J.F. Aspartic and Metallo Peptidase. Elsevier Academic Press, (2004) pp.268-89.
3. Cawley, Lj.Mc., Matrisian, L.M. Matrix metalloproteinases: multifunctional contributors to tumor progression. *Mol Med Today*, **6** (2000) 149-156.
4. Visse, R., Nagase, H. Matrix Metalloproteinases and Tissue Inhibitors of Metalloproteinases Structure, Function, and Biochemistry. *Circ Res*, **92** (2003) 827-839.
5. Nagase, H., Woessner, J.F.Jr. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem*, **274** (1999) 21491-21494.
6. Bode, W., Maskos, K. Structural basis of the matrix metalloproteinases and their physiological inhibitors, the tissue inhibitors of metalloproteinases. *Biol. Chem*, **384** (2003) 863-872.
7. Гопчевић, К. Металопротеиназе ћелијског матрикса – структура и функција. *Хемијски преглед*, **51** (2010) 111-117.
8. Klein, T., Bischoff, R. Physiology and pathophysiology of matrix metalloproteases. *Amino Acids*, **41** (2011) 271-290.
9. Dragutinović, V.V., Radonjić, N.V., Petronijević, N.D., Tatić, S.B., Dimitrijević, I.B., Radovanović, N.S., Krivokapić, Z.V. Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and -9 (MMP-9) in preoperative serum as independent prognostic markers in patients with colorectal cancer. *Mol Cell Biochem*, **355** (2011) 173-78
10. Dragutinović, V.V., Radovanović, N.S., Izrael-Živković, L.T., Vrvic, M.M. Detection of gelatinase B activity in the serum of gastric cancer patients. *World J Gastroentero*, **12** (2006) 106-110.
11. Dragutinović, V., Izrael Živković, L., Radovanović, N. Relation of Matrix Metalloproteinase-9 to Different Stage of Tumors in Serum of Gastric Cancer. *Digest Dis Sci*, **54** (2009) 1203-1207.
12. Kraiem, Z., Korem, S. Matrix metalloproteinases and the thyroid. *Thyroid*, **10** (2000)1061-1069.
13. Marečko, I., Cvejić, D., Tatić, S., Dragutinović, V., Paunović, I., Savin, S. Expression of matrix metalloproteinase-2 and its tissue inhibitor-2 in fetal and neoplastic thyroid tissue and their significance as diagnostic and prognostic markers in papillary carcinoma. *Cancer Biomark*, **11** (2012) 49-58.
14. Thian, X., Cong, M., Zhou, W., Zhu, J., Lui, Q. Relationship between protein expression of VEGF-C, MMP-2 and lymph node metastases in papillary thyroid cancer, *J Int Med Res*, **36** (2008) 699-703.
15. Buegy, D., Weber, T., Maurer, G.D., Mudduluru, G., Medved F., Brauckhoff, M., Post, S., Dralle, H., Allgayer, H. Urokinase receptor, MMP-1 and MMP-9 are markers to differentiate prognosis, adenoma and carcinoma in thyroid malignancies. *Int J Cancer*, **125** (2009) 894-901.
16. Cavaleiro, B.G., Junqueira, C.R., Brandão, L.G. Expression of membrane type 1 matrix metalloproteinase in medullary thyroid carcinoma: prognostic implications. *Head & Neck*, **32** (2010) 58-67.
17. Cavaleiro, B.G., Junqueira, C.R., Brandão, L.G. Expression of Matrix Metalloproteinase 2 (MMP-2) and Tissue Inhibitor of Metalloproteinase 2 (TIMP-2) in Medullary Thyroid Carcinoma: Prognostic Implications. *Thyroid*, **18** (2008) 865-871.
18. Wajner, S.M., Capp C., Brasil, B.A., Meurer, L., Maia, A.L. Reduced tissue inhibitor of metalloproteinase-2 expression is associated with advanced medullary thyroid carcinoma. *Oncol Lett*, **7** (2014) 731-737.
19. Brew, K., Dinakarandian, D., Nagase, H. Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Biochim. Biophys. Acta*, **1477** (2000) 267-283.
20. Baker, A.H., Edwards, D.R., Murphy, G. Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities. *J Cell Sci*, **115** (2002) 3719-3727.
21. Jiang, Y., Goldberg, I.D., Shi, Y.E. Complex roles of tissue inhibitors of metalloproteinases in cancer. *Oncogene*, **21** (2002) 2245-2252.
22. Arpino, V., Brock, M., Gill, S.E. The role of TIMPs in regulation of extracellular matrix proteolysis. *Matrix Biol*, **44-46** (2015) 247-254.
23. Gong, Y., Scott, E., Lu, R., Xu, Y., Oh, W.K., Yu, Q. TIMP-1 promotes accumulation of cancer associated fibroblasts and cancer progression. *PLoS One*, **8(10)** (2013) e77366
24. Meng, C., Yin, X., Liu, J., Tang, K., Tang, H., Liao, J. TIMP-1 is a novel serum biomarker for the diagnosis of colorectal cancer: A meta- analysis. *PLoS One*, **13(11)** (2018) e0207039.
25. Komorowski, J., Pasięka, Z., Jankiewicz-Wika, J., et al. Matrix metalloproteinases, tissue inhibitors of matrix metalloproteinases and angiogenic cytokines in peripheral blood of patients with thyroid cancer. *Thyroid*, **12** (2002) 655-662.
26. Dragutinović, V.V., Tatić, S.B., Nikolić-Mandić, S., Savin, S., Cvejić, D., Dunderović, D., Gajić, M., Paunović, I. Matrix metalloproteinase-9 and the Cu/Zn ratio as ancillary diagnostic tools in distinguishing between the classical and follicular variants of papillary thyroid carcinoma. *Biol Trace Elem Res*, **149** (2012) 29-33.
27. Dragutinović, V.V., Tatić, S.B., Nikolić-Mandić, S.D., Tripković, T.M., Dundžerović, D.M., Paunović, I.R. Copper as Ancillary Diagnostic Tool in Preoperative Evaluation of Possible Papillary Thyroid Carcinoma in Patients with Benign Thyroid Disease. *Biol Trace Elem Res*, **160** (2014) 311-315.



Милена Симић, Милош Петковић, Предраг Јовановић

Универзитет у Београду-Фармацеутски факултет,  
Катедра за органску хемију

Е-пошта: milena@pharmacy.bg.ac.rs,  
milos.petkovic@pharmacy.bg.ac.rs, predragjovands@gmail.com

## ФЛУОРОВАНИ ПРИРОДНИ ПРОИЗВОДИ

Једињења која у структури садрже халогене су доста распрострањена у природи и најчешће се могу изоловати из морских организама. За разлику од бромованих и хлорованих деривата, природни производи који садрже органски везан флуор веома су ретки. Флуорована органска једињења често имају изражену биолошку активност и примењују се у фармацији.

### ФЛУОР У ПРИРОДИ

Ако се посматра заступљеност хемијских елемената на Земљи, флуор заузима 13. место. За разлику од стена, где концентрација флуора варира, у морима и океанима је врло ниска и приближно иста. Однос флуора и хлора у површинским водама износи око  $7 \cdot 10^{-5}$  [1-3]. Многи организми морског и сувоземног порекла могу садржати у себи значајне количине неоргански везаног флуора. Неке биљке су познате по акумулирању флуорида, што је примећено посебно код припадница рода *Camellia*, посебно код чајног дрвета (*Thea sinensis*, *Camellia sinensis*). У оријенталним врстама чаја могуће је наћи и до 3000  $\mu\text{g/g}$  флуорида (у односу на суву материју), а количина се драстично може повећати уколико биљка успева на земљишту богатом флуоридима. Сува маса неких врста морских сунђера може садржати и до 10 % флуора у облику флуоросиликата. [1].

За разлику од веома распрострањеног „неорганског“ флуора, органска једињења са флуором се ретко срећу у природи; пронађена су у одређеним биљним врстама, бактеријама, док се у животињском царству појављују само код неких врста морских сунђера. Ниској заступљености органски везаног флуора доприноси више фактора. Минерали који садрже флуор су слабо растворни у води, што овај елемент чини биолошки недоступним. Слаба нуклеофилност флуорида у води (веома је добро хидратисан) додатно смањује могућност његовог учешћа у супституционим реакцијама. Високи редокс потенцијал потребан за оксидацију до реактивног флуоронијум јона не оставља могућност стварања угљеник-флуор везе у електрофилним реакцијама [1]. Када се узму у обзир наведене чињенице, малобројност природних једињења овог типа не треба да изненађује, али их то чини додатно занимљивим за проучавање.

### ПРИРОДНИ ПРОИЗВОДИ СА ФЛУОРОМ

Флуорацетат и флуортреонин

Флуорацетат (флуорсирћетна киселина) је најпознатије и најраспрострањеније природно ор-

ганско једињење које садржи флуор (слика 1, лево). Први пут је изолован 1943. године из јужноафричке биљне врсте назване „отровни лист“ (*Dichapetalum sycosum*), која је узрочних многих локалних тровања људи и животиња са леталним исходом. Касније је изолован и из још неких биљних врста, а занимљиво је да је највећи број биљних извора флуорацетата пореклом из Аустралије. Пронађен је и у одређеним биљкама које расту у Африци и Јужној Америци, а садржај флуорацетата у њима може да варира. L-Флуортреонин (слика 1, десно) је изолован 1986. из актиномицета *Streptomyces cattleya* [1, 2].

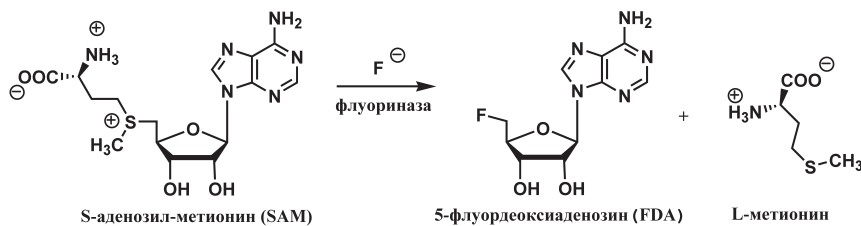


Слика 1. Флуорсирћетна киселина и  
L-флуортреонин

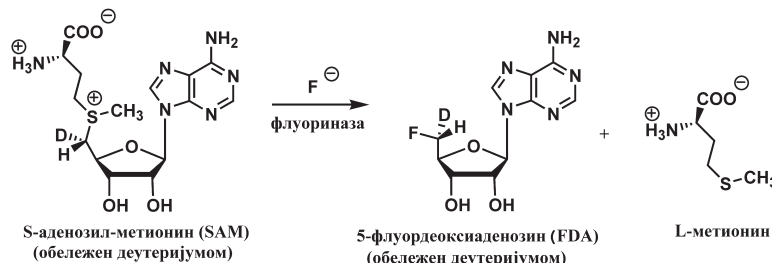
Откриће флуориназе је кључни моменат у изучавању биосинтетских путева флуорованих једињења. Флуориназа је једини нативни ензим који учествује у стварању угљеник-флуор (C-F) везе. Захваљујући истраживањима на *Streptomyces cattleya* из које је изолована први пут, добијен је увид у механизам стварања ове јаке везе у органским молекулима. [4,5]. Касније су откривени и хомологни ензими из бактерија *Nocardia brasiliensis* и *Actinoplanes sp* N902-109. Сама реакција коју катализује флуориназа је  $S_N2$  типа и одиграва се између флуорида и S-аденозилметионина (SAM). Флуорид врши нуклеофилни напад на примарни угљеник рибозе, C(5), при чему долази до стварања C-F везе и настанка 5-флуор-5-деоксиаденозина (FDA), док се издваја неутрални L-метионин као добра одлазећа група.

На слици 3 је приказана иста реакција супституције, али изведена уз коришћење S-аденозилметионина обележеног деутеријумом. Оваквим изотопским обележавањем потврђен је  $S_N2$  механизам, јер је код производа уочена инверзија конфигурације на C(5) [6].

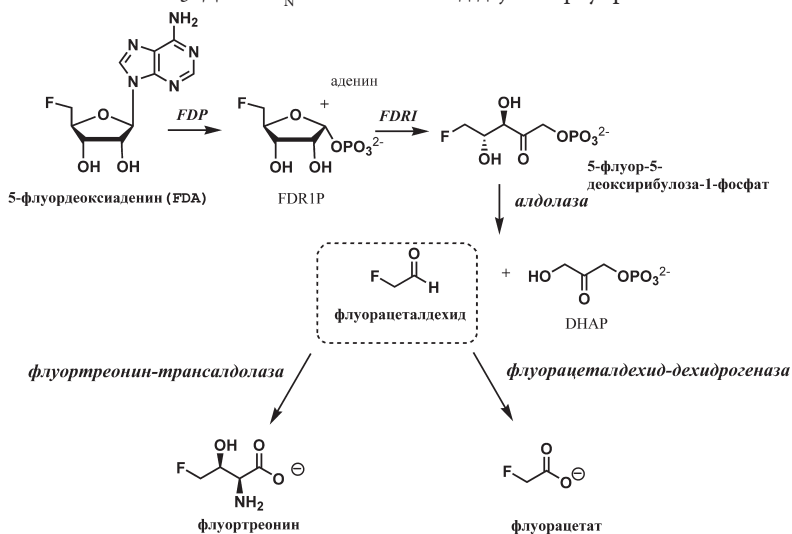
Ова актиномицета је и даље била врло занимљива за даља истраживања, а показано је да и сам L-флуортреонин показује антибактеријско дејство. Претпостављено је више различитих механизма за биосинтезу флуорацетата и флуортреонина. Новија истраживања из 2012. године указала су на механизам којим *Streptomyces cattleya* ствара флуорсирћетну киселину и флуортреонин, што је приказано на слици 4 [6-8]. Начин настанка 5-флуордеоксиаденозина је



Слика 2. Реакција супституције катализована флуориназом



Слика 3. Доказ  $S_N2$  механизма код дејства флуориназе



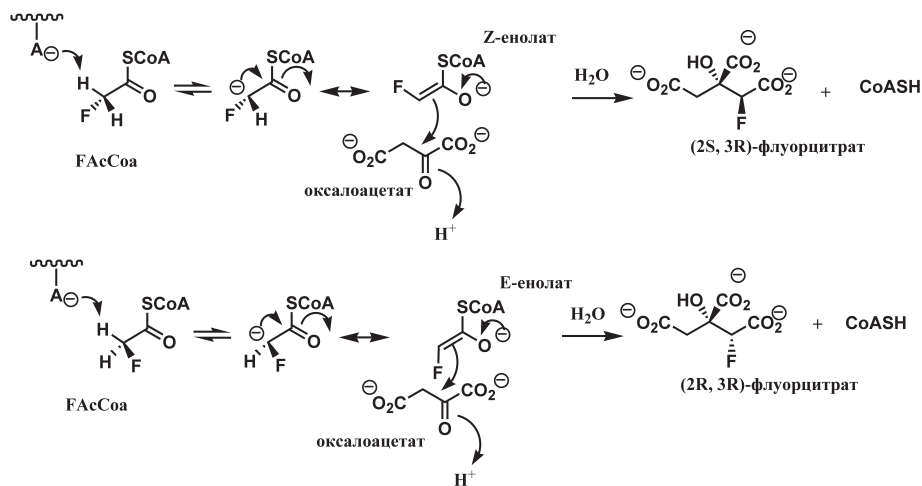
Слика 4. Поједностављена биосинтеза флуорацетата и флуортреонина

већ описан (слика 2). Настали FDA подлеже реакцији фосфорилације на C(1) уз раскидање везе са аденином (слика 4). Ову реакцију катализује ензим 5-флуор-5-деоксиаденозинфосфорилаза (FDP) и настаје 5-флуор-5-деоксирибоза-1-фосфат (FDRP). Следећи корак је отварање петочланог прстена рибозе и настанак 5-флуор-5-деоксирибулоза-1-фосфата (FDRibP). Ову реакцију изомеризације алдозе у кетозу катализује изомераза (FDRi). Дејством алдолазе сада долази до фрагментације молекула, тј. до ретро-алдолне реакције при чему настају флуорацеталдехид и дихидроксиацетон-фосфат. Флуорацеталдехид је интермедијер од кога се биосинтетски пут рачвака настанку флуорацетата и флуортреонина. Реакција оксидације води настанку флуорацетата. У почетку се веровало да флуортреонин настаје алдолном кондензацијом флуорацеталдехида и глицина, али су истраживања показала да глицин није извор C(1) и C(2) у флуортреонину. Према новом механизму, најпре долази до ретро-алдолне реакције треонина уз издвајање ацеталдехида, а тек онда до кондензације са флуорацеталдехидом, при чему настаје флуортреонин.

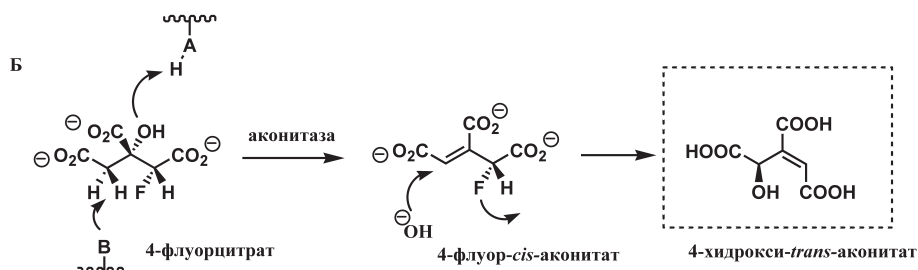
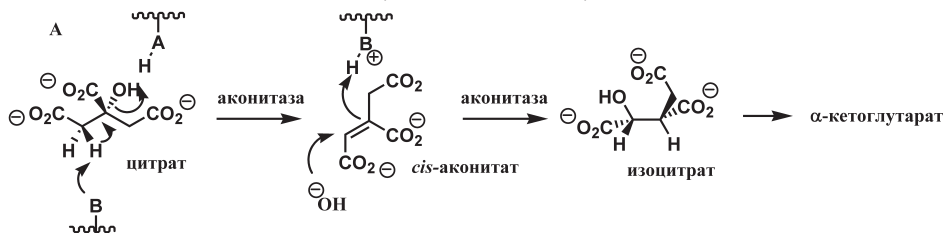
#### 4-Флуорцитрат

Висока токсичност флуорацетата објашњава се *in vivo* настанком флуорованог метаболита, 4-флуорцитрата. Ово једињење настаје реакцијом цитрат-синтазе која га ствара из флуорацетил-коензима А (FACoA) по истом механизму по коме настаје цитрат из флуорацетил-коензима А (AcCoA) [1, 9, 10]. У првој фази, дејством ензима, долази до депротоновања  $\alpha$ -угљеника ацетил групе при чему настаје енолат. У другој фази долази до нуклеофилног напада енолата на оксалоацетат, уз настанка оксалоцитруил-коензима А. У последњој фази, хидролизом настају цитрат и коензим А. На слици 5 је приказан овај механизам са флуорацетатом. За разлику од ацетил-коензима А, флуоровани аналог има хиралан угљеников атом, тако да могу настати два енолата, који би водили настанку дијастереомерних флуорцитрата.

Једињење које углавном настаје на овај начин је 2R,3R-флуорцитрат, који је, за разлику од другог изомера, изузетно токсичан, јер се његовим настанком зауставља циклус лимунске киселине. Пионир у истраживању органофлуорованих природних произ-



Слика 5. Синтеза флуорцитрата помоћу цитрат-синтазе



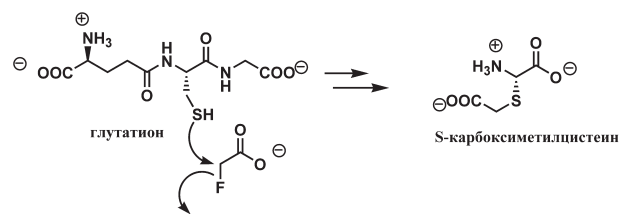
Слика 6. Цитрат и флуорцитрат у реакцији са аконитазом

вода, Рудолф Питерс (Rudolph Peters), уврстио је ову биотрансформацију међу тзв. „леталне синтезе“. Под нормалним условима, ензим аконитаз катализује трансформацију цитрата у *cis*-аконитат, који се даље преводи у  $\alpha$ -кетоглутарат дејством изоцитрат-де-хидрогеназе (слика 6А). Токсичност флуорцитрата се огледа у следећем механизму: аконитаз реагује на сличан начин са флуор-цитратом, дајући 4-флуор-*cis*-аконитат као интермеђијер (слика 6Б). Исти ензим катализује нуклеофилну супституцију  $S_N2'$  типа, при чему хидроксидни јон, генерисан из воде, напада незасићен угљеник, уз померање електрона из двоструке везе, што омогућује елиминацију флуорида. На овај начин настаје 4-хидрокси-*trans*-аконитат, који је компетитивни инхибитор аконитазе. У овом случају долази до заустављања циклуса лимунске киселине.

#### Детоксикација

Занимљива је чињеница да у западном делу Аустралије, где постоји велики број биљака које производе флуорацетат, сисари биљоједи имају већу толеранцију према овом токсичном једињењу од сисара

исте врсте које живе на источном делу континента, где је распрострањеност таквих биљака мања[11]. Механизам детоксикације код ових животињских врста није потпуно разјашњен, али се претпоставља да поседују флуорацетат-специфичну дефлуориназу, ензим који се налази у јетри. На слици 7 приказана је реакција којом глутатион-зависни ензим преводи флуорацетат у S-карбоксиметилцистеин и флуорид [9, 11, 12].



Слика 7. Предложени механизам детоксикације флуорацетата

Код микроорганизама је много детаљније изучен механизам деградације флуорацетата. Бактерије на којима су испитивани ови механизми су углавном потицале из Аустралије и Јужне Америке. Испитивања вршена на *Delftia acidovorans* понудила су објашњење за механизам дехалогеновања флуораце-

тата. У активном центру ензима, аспартат врши нуклеофилни напад на флуорацетат, уз издвајање флуорида. Настали ковалентно везан естар хидролизује уз помоћ хистидина, при чему настаје гликолна киселина, тј. гликолат (слика 8).

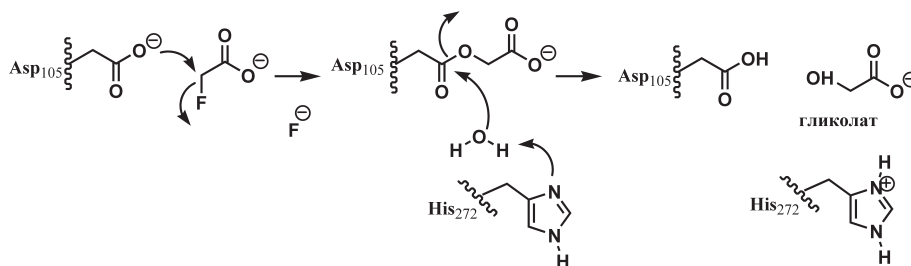
Механизам дефлуоринације флуортреонином је такође испитиван [12]. Претпостављен механизам укључује ензим треонин-деаминазу и веома је сличан реакцијама деаминације (слика 9). Кондензацијом пиридоксал-фосфата и треонина настаје Шифова база **1**, која депротонувањем даје анјонски интермеђијер **2**, стабилан резонанцијом. Померањем електрона у хиноидној структури **3** долази до елиминације воде и настанка интермеђијера **4**. После његове хидролизе, преко хемиаминала **5**, долази до елиминације флуорида, настанка незасићеног имиња **6** и регенерације пиридоксал-фосфата. Имин **6** подлеже Мајкловој адицији са молекулом воде уз настаanak енамина **7**, који хидролизује дајући 2-кето-4-хидроксибутерну киселину **8**.

### Флуороурацил и деривати

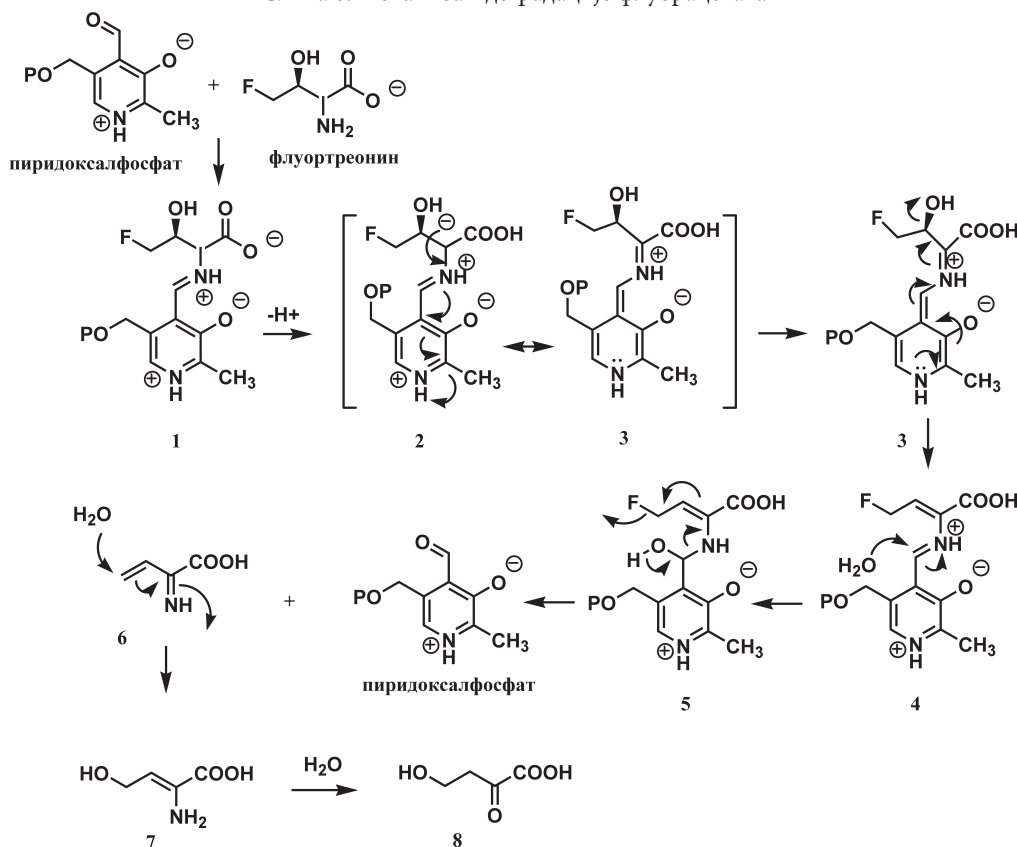
5-Флуороурацил је познати синтетски лек патентирани 1956. године који се још од 1962. успешно користи у терапији више врста канцера [13]. Тек после пет деценија установљено је да ово важно једињење ипак јесте и природан производ. Анализом садржаја секундарних метаболита екстракта морског сунђера *Phakellia fusca* из Јужног кинеског мора 2003. године, изоловано је, поред стерола, цереброзида и неколико флуорованих деривата урацила, и сам 5-флуороурацил [2, 14]. Структуре ових једињења приказане су на слици 10. Неки од ових деривата урацила такође показују активност према одређеним туморским ћелијским линијама, што даје значај додатним истраживањима ове класе једињења.

### Нуклеоцидин и деривати

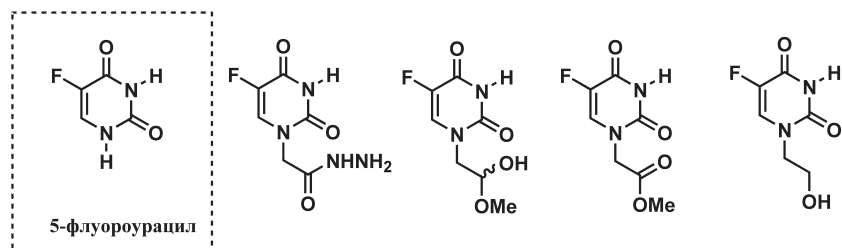
Из ферментационе течности *Streptomyces calvus* изолован је нуклеоцидин. Ово једињење је по структури нуклеозид [1,2]. У њему се налази аденин везан



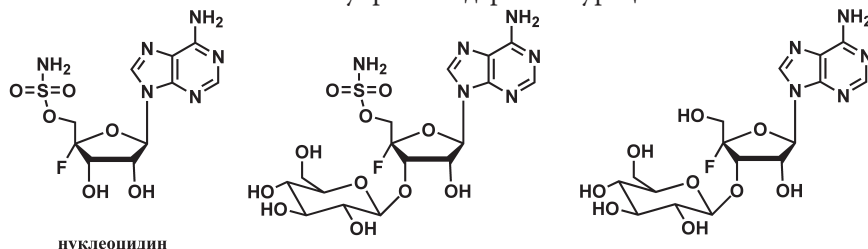
Слика 8. Механизам деградације флуорацетата



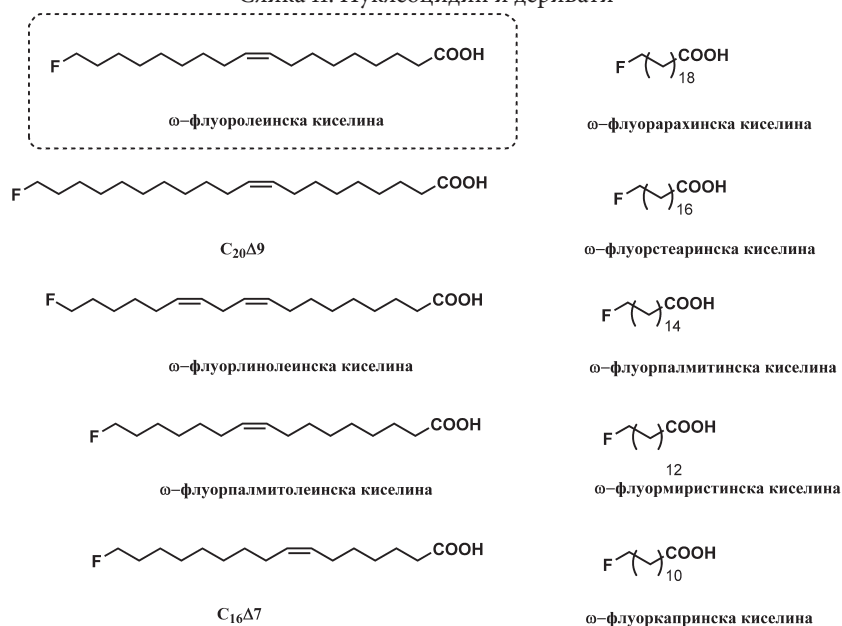
Слика 9. Механизам деградације флуортреонина



Слика 10. Флуоровани деривати урацила



Слика 11. Нуклеоцидин и деривати



Слика 12. Флуороване масне киселине

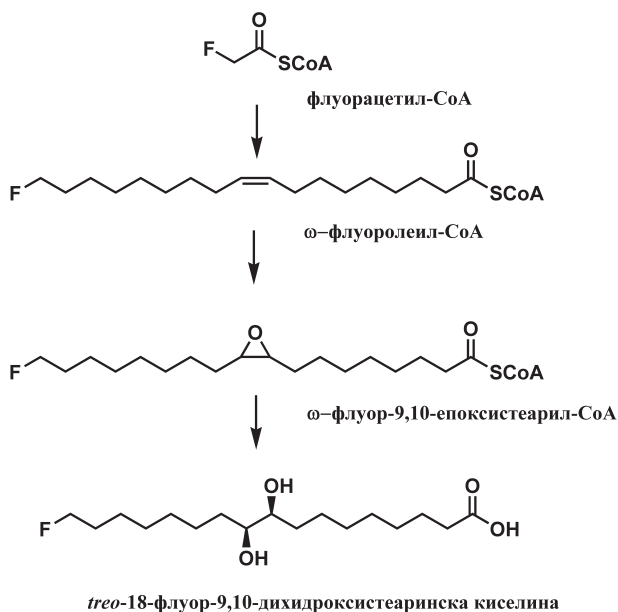
β-гликозидном везом за D-рибозу, флуоровану на C(4), док се на C(5) налази сулфаматна група (слика 11). Нуклеоцидин има јако антибиотско дејство и активан је према паразиту *Trypanosoma brucei*, узročнику афричке трипанозомијазе (болести спавања). Новија истраживања су показала да постоје микроорганизми који су богатији извори нуклеоцидина, као што су *Streptomyces vireus* и *Streptomyces aureorectus*.

Нуклеоцидин је дуго био једини познат природни флуоровани нуклеозид. Тек 2019. године откривена су још два метаболита сличне структуре, приказана на слици 11[15]. Иако је нуклеоцидин познат већ дуже време, његов биосинтетски пут је дуго био неразјашњен, и управо открићем ових нових једињења дошло се до предлога механизма његовог настанка.

Флуороване масне киселине

Из воска који се налази у семену афричке биљке *Datura toxicarium* изолована је токсична ω-флуоролеинска киселина. [2, 5,16, 17]. Она је доминантна масна киселина изолована из овог биљног материјала, док је присуство осталих потврђено тек гасно-масеном анализом екстракта. Занимљиво је да је код свих природних флуорованих масних киселина флуор везан за последњи (ω) угљеников атом (слика 12). Ово иде у прилог чињеници да оне представљају производе катаболизма ω-флуоролеинске киселине, односно њених естара.

Поред ових масних киселина, изолована је и ди-хидроксилована флуорована масна киселина, која такође представља метаболит флуоролеинске киселине (слика 13). Флуороване масне киселине биосинтетски настају из флуор-ацетил-коензима А.



Слика 13. Настанак дихидроксиловане флуороване масне киселине

#### Синтеза флуорованих једињења

За разлику од малог броја природних флуорованих једињења, број синтетисаних који имају биолошку активност веома је велики. Од половине двадесетог века до данас, око 20% лекова који се примењују садрже флуор везан за угљеник. Примена флуорованих органских једињења у фитофармацији је још већа и око 30% лекова је овог типа. Ово није необично, с обзиром да присуство флуора или

флуоралкил група у молекулу знатно утиче на његове физичко-хемијске особине, а самим тим и на биолошку активност [18]. Велико интересовање за органофлуорова једињења је додатно подстакло развој синтетских методологија за добијање молекула са оваквим структурним карактеристикама [19]. Јасно је да и примена флуориназе отвара могућност биотехнолошке продукције многих важних биоактивних једињења, док се примена изотопа  $^{18}\text{F}$  у комбинацији са флуориназом користи у синтези радиолиганата за позитронску емисиону томографију (ПЕТ). Нека од једињења добијена на овај начин приказана су на слици 14 [5].

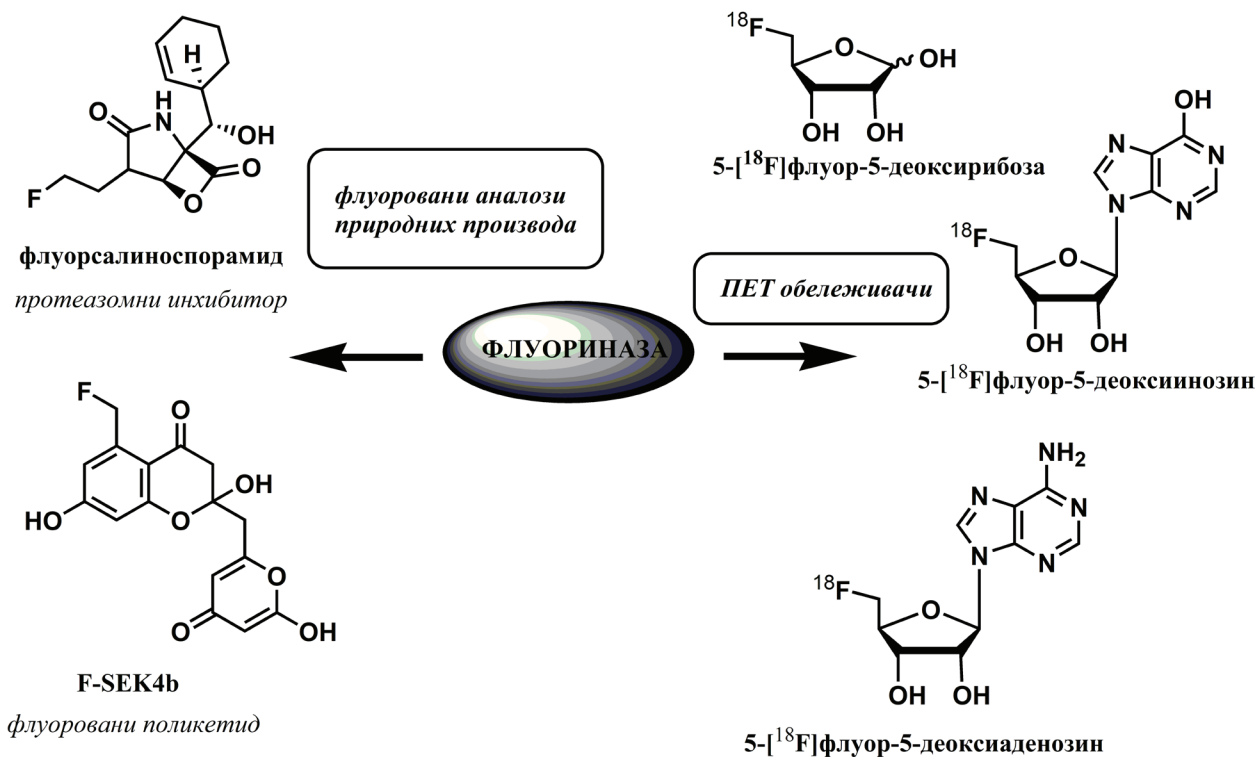
Abstract

#### FLUORINATED NATURAL PRODUCTS

Milena Simić, Miloš Petković, Predrag Jovanović

University of Belgrade, Faculty of Pharmacy, Department of Organic Chemistry

Halogenated compounds are very widespread in nature. The most common sources of these natural products are marine organisms. Unlike brominated and chlorinated derivatives, natural compounds containing carbon-fluorine bond are very rare. Extensive study of this relatively small class of natural products provides important information about their physiological activity and application in drug synthesis. This paper presents a brief overview of naturally occurring fluorinated compounds.



Слика 14. Примена флуориназе у синтези

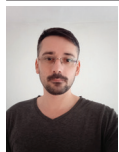


## ЛИТЕРАТУРА

1. D. B. Harper, D. O'Hagan, Nat. Prod. Rep., 11 (1994) 123
2. H. Deng, D. O'Hagan, C. Schaffrath, Nat. Prod. Rep., 21 (2004) 773
3. T. Warner, Deep-Sea Research, 18 (1971) 1255
4. D. O'Hagan, C. Schaffrath, S. L. Cobb, J. T. G. Hamilton, C. D. Murphy, Nature, 416 (2002) 279
5. M. F. Carvalho, R.S. Oliveira, Crit. Rev. Biotechnol., 37 (2017) 880
6. C. D. Cadicamo, J. Courtieu, H. Deng, A. Meddour, D. O'Hagan, ChemBioChem 5 (2004) 685
7. C. Zhao, P. Li, Z. Deng, H. Ou, R. P. McGlinchey, D. O'Hagan, Bioorg. Chem. 44 (2012) 1
8. M. C. Walker, M. C. Y. Chang, Chem. Soc. Rev., 43 (2014) 6527
9. D. O'Hagan, D. B. Harper, J. Fluor. Chem., 100 (1999) 127
10. M. W. van der Kamp, J. D. McGeagh, A. J. Mulholland, Angew. Chem. Int. Ed. 50 (2011) 10349
11. L. X. Leong, S. Khan, C. K. Davis, S. E. Denman, C. S. McSweeney, J. Anim. Sci. Biotechnol. 8 (2017) 55
12. L. Wu, H. Deng, Org. Biomol. Chem., 18 (2020) 6236
13. T. Shirasaka, Jpn. J. Clin. Oncol., 39 (2009) 2
14. Xiao-Hua Xu,\* Guang-Min Yao, Yan-Ming Li, Jian-Hua Lu, Chang-Jiang Lin, Xin Wang, and Chui-Hua Kong, J. Nat. Prod., 66 (2003) 285
15. X. Feng, D. Bello, P. T. Lowe, J. Clark, D. O'Hagan, Chem. Sci., 10 (2019) 950116. K. K. J. Chan, D. O'Hagan, The Rare Fluorinated Natural Products and Biotechnological Prospects for Fluorine Enzymology. In: Methods in Enzymology, D. A. Hopwood (ed.), Academic Press, 516 (2012) 219
17. V. M. Dembitsky, M. Srebnik, Prog. Lipid Res. 41 (2002) 315
18. B. E. Smart, J. Fluor. Chem., 109 (2001) 3
19. R. Britton, V. Gouverneur, J.-H. Lin, M. Meanwell, C. Ni, G. Pupo, J.-C. Xiao, J. Hu, Nat. Rev. Methods Primers 47 (2021) 1



## ВЕСТИ ИЗ ШКОЛЕ за



Игор МАТИЈАШЕВИЋ

Девета гимназија “Михаило Петровић Алас”, Београд

E-mail: igormatijasevic@gmail.com

### ТРАНСЛАЦИЈЕ СПОЉАШЊИХ РЕПРЕЗЕНТАЦИЈА

Спољашње репрезентације се често одређују као нешто што стоји уместо нечег другог. Када се спољашње репрезентације повезују у смислу уочавања њихове информационе сличности посреди је когнитивни процес који је у иностраној литератури назван “транслација спољашњих репрезентација”. У раду је размотрена примена задатака (захтева) транслације у сврху формативне провере знања.

#### СПОЉАШЊЕ РЕПРЕЗЕНТАЦИЈЕ

Спољашње репрезентације (СР, енг. *external representations*) често се одређују као *нешто* што стоји *уместо* нечег другог. То *нешто* су вербални искази, симболички изрази (у виду математичких, физичких и хемијских једначина), слике (попут цртежа и фотографија), дијаграми, графици, табеле, паралингвални знаци итд., док оно *друго* јесу наше когнитивне и афективне структуре\*. То је тзв. дијадни модел идеје о репрезентацијама.<sup>1</sup> Схватање да нешто може стајати

уместо нечег другог, тзв. репрезентационо мишљење (енг. *representational thinking*), јавља се код људи пред крај друге године живота и припада фундаменталним когнитивним способностима.<sup>2</sup> Сматра се да СР „међају домен и опсег когниције” (стр. 442),<sup>3</sup> тј. да “форме које користимо за приказивање онога што мислимо (...) имају утицаја на то како мислимо и о чему уопште можемо да мислимо” (стр. 349).<sup>4</sup> Ипак, сагледавање улоге СР на когницију изискује преиспитивање и социјалног контекста њихове примене.<sup>5,6</sup>

СР су од темељне важности за научну праксу<sup>7</sup> и, на основу историје природних наука, евидентно је да стварање СР јесте од фундаменталног значаја за напредак природних наука.<sup>8,9</sup> То је зато што се појмови, као основа научног знања, „артикулишу“ путем СР (стр. 248).<sup>10</sup> Према томе, учење нових појмова, што је од фундаменталне важности за дидактику<sup>11</sup>, не може бити одвојено од истовременог учења СР, путем којих се појмови репрезентују.<sup>12,13</sup> У вези с тим, предмет-

ни дидактичари истичу да научници поседују развијене (мета)репрезентационе компетенције (енг. [meta]representational competencies), те да би њихов развој требало да буде један од циљева учења природних наука и математике.<sup>9,14,15</sup> Боље репрезентационе компетенције одговарају бољем разумевању научних садржаја.<sup>16</sup>

## ТРАНСЛАЦИЈЕ СПОЉАШЊИХ РЕПРЕЗЕНТАЦИЈА

Део (мета)репрезентационих компетенција јесу тзв. *транслације спољашњих репрезентација* (ТСР). У једној класификацији репрезентационих компетенција ТСР се налазе у средини хијерархијски постављених компетенција и оне су неопходне за формирање виших репрезентационих компетенција.<sup>14,17</sup> Штавише, проучавање у којој мери ученици поседују репрезентационе компетенције, најчешће се одвија путем ТСР захтева.<sup>18-21</sup>

ТСР се схватају као врста когнитивног процеса.<sup>14,22-26</sup> Дефинишућа карактеристика ТСР јесте у способности *обједињене интерпретације* – показивања да су различите СР истог појма (научног садржаја) информационо сличне.<sup>9,27,28</sup> Транслације могу бити врло разноврсне, већ у зависности од тога које се СР обједињено интерпретирају.

Идеја о ТСР је заступљена у неколико таксономија образовних циљева.<sup>23,29,30</sup> У Блумовој таксономији<sup>29</sup> *транслација* (енг. translation) је дефинисана као могућност да се информације саопштене у једној комуникационој форми саопште у другој форми (стр. 89) док се у ревидираној Блумовој таксономији говори о „превођењу информација из једне репрезентационе форме у другу“ (стр. 70).<sup>23</sup> У таксономији Марзана и Кендала процес, по значењу истоветан *транслацији*, назива се „симболизација“ (стр. 44).<sup>30</sup> У поменутих таксономијама транслација се схвата као један од показатеља разумевања ученог. О повезаности ТСР и разумевања научних садржаја говорили су и други дидактичари, па се тако истиче да онај ко разуме научне појмове врши транслације између одговарајућих СР<sup>10</sup> те да је ученикова способност да изведе транслације неопходна за „истинско схватање научних идеја“ (стр. 844).<sup>31</sup>

## ДИЈАГНОСТИЧКА ПРИМЕНА ЗАДАТАКА ТСР

У овом раду циљ је, пре свега, истакнути да су задаци (захтеви) ТСР веома погодни за орга-

низацију наставних ситуација у функцији формативне (дијагностичке<sup>32</sup>) процене когнитивних структура. Нема сумње да је *дидактичка дијагностика* међу најважнијим аспектима наставе, али да је наставници често не примењују.<sup>33</sup> Потребна за применом дијагностичких наставних ситуација није само у стицању увида у степен савладаности наставних садржаја и у идентификовању алтернативних концепција, него и у обезбеђивању основе за израду наставних ситуација које би за циљ имале превазилажење алтернативних концепција и формирање знања.

Дидактичка истраживања у којима је испитивано у којој мери и како ученици и студенти решавају ТСР задатке (докимолошки аспект), могу се узети као поткрепљење оправданости употребе оваквих захтева у школској пракси. С тог аспекта, ова истраживања нуде извор задатака који су „спремни“ за примену, али и најважније, нуде идеју коју наставници могу даље експлоатисати. Овај, докимолошки аспект, односи се на захтеве у којима се од ученика очекује да за дату СР конструишу информационо сличну СР,<sup>22,33-35</sup> или да такву СР препознају међу понуђеним СР.<sup>25,36,37</sup> Резултати истраживања у домену дидактике природних наука и математике указују на то да су задаци ТСР тешки за ученике млађег и старијег узраста, али такође и за студенте; успешност у решавању оваквих задатака уобичајено није на задовољавајућем нивоу.<sup>9,14,18,25,35-45</sup> У табели 1 сажето су приказани примери трију транслација и резултати њиховог решавања. ТСР захтеви су се показали као они који омогућавају значајан увид у природу когнитивних структура, нарочито у недостатке појмовног знања и у постојање алтернативних концепција, чиме се испуњава једна од улога дијагностичких наставних ситуација. Поред тога, решавање ТСР задатака, судећи према неким истраживањима, може обухватити активацију имплицитних когнитивних структура.<sup>40,46,47</sup> Дидактичари су даље указали на важност активације метакогнитивних структура током решавања оваквих задатака,<sup>48,49</sup> али је очито да у многим ситуацијама изостаје њихова активација.<sup>37,38,48</sup>

Могућности примене ТСР на садржајима хемије су бројни. У хемији централно место заузимају идеје о (честичној) структури супстанце и о физичким и хемијским променама супстанце.

Хемичари су у претходна два века створили низ СР да представе структуру супстанце и њене промене. Једна од основних идеја дидактике хемије јесте она да је природа хемијског знања

тројака: макроскопска, честична и симболичка, и у вези с тим да у прелазу с једног нивоа у други лежи суштински извор тешкоћа савладавања хемијских садржаја.<sup>54</sup> Из ова три нивоа изводе се четири прелаза, три између двају појединачних и четврти који обухвата сва три нивоа.<sup>44</sup> Савладавање појединачних нивоа је захтеван процес. Чак и када ученици поседују знања појединачних нивоа, њихово обједињавање често није спонтан процес и оно представља изазов за наставнике како да помогну ученицима да у томе успеју.<sup>44</sup> Приказивање структуре супстанце је један од најважнијих задатака хемије као науке и као наставног предмета. Чиста супстанца се приказује емпијским, молекулским и различитим структурним формулама, као и моделима. Транслације које обухватају формуле и/или моделе представљају један од основних аспеката учења хемије и, као што истраживања показују, овакве транслације није лако савладати.<sup>22,55,56</sup> У том смислу информационо-комуникационе технологије (ИКТ) могу бити од драгоцене помоћи. Бројни програми, многи бесплатни и лако доступни, омогућавају визуализацију структуре молекула. Иако је опремљеност за ИКТ наставу у нашим школама слаба, постојање рачунара са пројектором је довољна да се искористи бар део потенцијала ових програма у смислу ТСР активности. Тим пре, јер резултати истраживања показују да рад са СР у различитим софтверима олакшавају стицање репрезентационих компетенција, нарочито ТСР компетенција.<sup>57-59</sup>

Приказивање физичких и хемијских промена други је битан аспект. Нарочито су значајни прикази оваквих промена применом генеричких нотација, попут кружића као репрезентација атома и атомских јона. На пример, група аустралијских дидактичара у серији квалитативних и лонгитудиналних истраживања утврдила је важност вербално-сликовитих транслација за формирање појма испаравање и показала значајне могућности ученика у основној школи за овакве транслације.<sup>60</sup> Јасно је да овакав закључак има шире значење. Од интереса је такође цртежом представити хемијске реакције. Истраживања показују да транслације једначине хемијске реакције у цртеж, користећи се нотацијама кружића и слично, пружају увид у знања и алтернативне концепције ученика.<sup>42,43</sup>

Математичко моделовање физичких и хемијских промена супстанце (трећи аспект) значи увођење читавог низа математичких објеката за репрезентовање. У том смислу постоји богат-

ство транслација. Матијашевић и сарадници<sup>37</sup> су показали потенцијал једног ТСР захтева у том контексту (в. табелу 1).

У претходним пасусима разматрана је дијагностичка улога ТСР захтева са аспекта школског рада. Међутим, изнето становиште може се применити на домаћи рад и уџбеничку литературу. Наша уџбеничка литература, пре свега она из хемије, није у последњој деценији анализирана, а управо је последњих година публикован велики број уџбеничких комплета. Увид у такве уџбенике, и без ригорозне анализе, довољан је да оправда тврдњу да се задаци ТСР тамо врло ретко срећу. Међутим, и нека инострана истраживања су показала сличну ситуацију у домену универзитетских уџбеника.<sup>61</sup>

## НЕКОЛИКО ДОДАТНИХ РАЗМАТРАЊА

Неколико битних тема није разматрано у овом раду, а повезане су с идејом о ТСР. Формативна провера знања је један сегмент учења/подучавања; стога се поставља питање: *каква је улога ТСР у ширем контексту учења/подучавања, на пример, у домену реализације наставних метода, структуре уџбеника, формулације васпитно-образовних циљева, структуре курикула итд?*

О повезаности ТСР и наставних метода за сада постоји по обиму скромна, али значајна литература.<sup>10,24,54,62-65</sup> На пример, истраживања Рота и сарадника<sup>63,64</sup> указују да током предавања бројне СР (попут вербалних исказа, физичких модела, гестова, висине гласа, дијаграма на табли) треба да *буду на њавом месту и у њаво време* и да ТСР има централну улогу у омогућавању конструкције знања у таквој настави. Ова истраживања увелико дају ново тумачење предавања, и, како аутори сматрају, објашњавају чињеницу зашто многи ученици (и студенти) тврде да су током предавања разумели садржај, а да исто разумевање нису могли да достигну приликом каснијег учења из књига. ТСР се нарочито вреднује у контексту истраживачког приступа настави; тако је недавним истраживањем показано да је од 17 искусних наставника, који су сматрали да су овладали истраживачким приступом, само један наставник ученике ангажовао путем ТСР захтева.<sup>65</sup> Бројна истраживања у вези са докатошкоким аспектом примене ТСР захтева дала су, истина посредно и шпекулативно, одређене смернице за наставу. На пример, многи дидактичари физике, хемије и математике указују да се настава често своди само на увежбавање

примене процедура израчунавања (решавање нумеричких задатака), али не и на разумевање таквих процедура те да би такву праксу треба ло увелико мењати. Резултати из реф. 37, једним делом би могли бити последица таквог приступа учењу хемије и физике (у области својстава гасова). Објашњења резултата које су добили Клемент и сарадници (табела 1), а који су стабилни, јер се понављају већ више од три деценије, неки дидактичари сматрају да треба тражити у начину учења алгебарских једначина. На пример, Фишер и сарадници<sup>53</sup> су указали на то да је учење алгебарских једначина искључиво у форми  $y = kx$ , али не, на пример, и у форми  $y/k = x$  проблематичан приступ.

Идеја о ТСП је коришћена за анализу уџбеника из хемије.<sup>56,66</sup> Нарочито је значајан модел који су дали Хан и Рот,<sup>66</sup> јер обухвата анализу СР честичног нивоа.

Такође, ТСП је експлицитно разматран и у контексту структуре курикулума (хијерархијски уређених категорија знања) и његове реализације.<sup>67</sup> У контексту курикулума, од интереса је размотрити статус ТСП са аспекта општих васпитно-образовних циљева, попут решавања проблема и (мета)репрезентационих компетенција. Способност ре-репрезентовања проблема, тј. да се из СР у којој је проблем постављен пређе у другачију СР, чини саставни део процеса решавања проблема.<sup>68,69</sup> Дакле, решавање проблема обухвата координацију више СР (обухвата вишеструке СР) и координација је управо базирана на способности ТСП.<sup>27</sup> Идеју о (мета)репрезентационим компетенцијама треба видети као један од општих васпитно-образовних циљева у курикулуму. Дакле, из наведеног произилази да ТСП има битно место у поимању и операционализацији општих васпитно-образовних циљева, тј. у обезбеђивању руководствености курикулума.

## ЗАКЉУЧАК

У раду је истакнуто да се материјални и нематеријални видови изражавања унутрашњих стања (когнитивних структура) називају спољашње репрезентације. Сматра се да је развој науке испреплетан са њиховим развојем. Када се СР повезују у смислу уочавања њихове информационе сличности посредни је когнитивни процес који је у иностраној литератури назван транслагације спољашњих репрезентација. Оне делом чине тзв. (мета)репрезентационе компетенције.

У раду је указано да су дидактичка истраживања показала да задаци (захтеви) ТСП омо-

гућавају увид у ученичка знања и у постојање алтернативних концепција. У вези с тим, може се претпоставити да су овакви захтеви погодни за организацију наставних ситуација у сврху формативне (дијагностичке) процене когнитивних структура ученика. Садржаји хемије су врло погодни за овакве захтеве, нарочито у контексту примене информационо-комуникационих технологија. Поред наведеног, друга истраживања су указала да се идеја о транслагацијама може применити за проучавање реализације наставних метода (нпр. предавања, истраживачког приступа), као и за анализу уџбеника, општеобразовних циљева и структуре курикулума. Чини се да ова идеја има обећавајућу дидактичку будућност.

## НАПОМЕНЕ

\*Когнитивне структуре дефинисане су у овом раду као: знање (структуре у сагласности са схватањем научне заједнице), алтернативне концепције (стабилне структуре које нису у сагласности са научним схватањима), интуитивне структуре (структуре чија тачност зависи од контекста у коме су се испољиле) и метакогнитивне структуре.

## ЛИТЕРАТУРА

1. E. de Vries, S. Demetriadis, S. Ainsworth, *External representations for learning: headed towards a digital culture*, in *Technology-enhanced learning: principles and products*, N. Balacheff, S. Ludvigsen, T. de Jong, A. Lazonder, S. Barnes, Eds., Springer, Dordrecht, Switzerland, 2009, p. 137
2. M. Hyson, C. Coople, J. Jones, *Early childhood development and education*, in *Handbook of child psychology* (6th ed.), W. Damon, R. Lerner, K. Anne Renninger, I. E. Sigel, Eds., John Wiley & Sons, Hoboken, US, 2006.
3. D. Kirsh, *AI & Society: Knowledge, Culture and Communication*, **25** (2010) 441
4. E. W. Eisner, *Phi Delta Kappan*, **78** (1997) 349
5. L. Xu, D. Clarke, *Research in Science Education*, **42** (2012) 491
6. N. Mercer, *Educational Psychologist*, **48** (2013), 148
7. M. K. McGinn, W.-M. Roth, *Educational Researcher*, **28** (1999) 14.
8. R. Kozma, E. Chin, J. Russell, N. Marx, *The Journal of the Learning Sciences*, **9** (2000) 105
9. A. A. diSessa, *Cognition and Instruction*, **22** (2004) 293
10. J. Lemke, *Linguistics and Education*, **10** (1998) 247
11. K. S. Taber, *Modelling learners and learning in science education: developing representations of concepts, conceptual structure and conceptual change to inform teaching and research*, Springer, Dordrecht, Switzerland, 2013.
12. P. Hubber, R. Tytler, F. Haslam, *Research in Science Education*, **40** (2010) 5

Табела 1. Сажет приказ неколико истраживања о успеху ученика на задацима ТСП		
Референца	Узорак и циљ истраживања	Коментар
37	- Ученици 4. разреда гимназије природно-математичког смера. Репрезентативан узорак.  - Испитати резултате translације са формуле $P=kT$ на сликовиту $CP^1$ и установити обрасце размишљања. Захтев је гласио: Која слика од три приказане има исто значење као и дата формула?	Мање од трећине ученика у узастопним генерацијама (2011, 2012) је изабрало тачну слику. Избор дистрактора, тј. слика на којима је приказана промена запремине (иако се симбол за запремину не појављује у формули $P=kT$ ) указује на могуће недостатке у знању не само гасних закона него и структуре формула. Дата објашњења као и интервјуи урађени 2013. године са новом генерацијом ученика иду томе у прилог.
22 <sup>1</sup>	- Ученици виших разреда средње школе (одговарало би 3. или 4. разреду гимназије).  - Један од циљева био је да се испита у којој мери ученици могу да изведу translацију са хемијских формула на физичке моделе молекула и обратно.	Успех на translацијама са формула (на пример, $H_2O$ , $HCl$ , $CH_2O$ , $N_2$ , $CO_2$ ) у одговарајуће штапић-куглица моделе (које су ученици правили) и обратно, са датих модела у формуле је незадовољавајући. Поменута констатација произилази из чињенице да 48 % ученика није умело да реши један или оба задатка translације са модела у формулу, док је обратна translација још слабије урађена – 81 % ученика није умело да из дате формуле конструише одговарајући модел за један или оба задатка.
35 <sup>2</sup>	- Студенти на инжењерским смеровима.  - Испитивање успеха на захтевима translације из вербалног записа у алгебарски. Захтев је гласио: Напишите једначину, користећи варијабле $S$ и $P$ , тако да репрезентујете следећи исказ: „Постоји шест пута више студената него професора на овом универзитету“. Употребите $S$ за број студената и $P$ за број професора.	Приближно трећина студената није саставила одговарајућу једначину $6P=S$ , а најзаступљенија грешка била је у виду замене две варијабле: $6S=P$ . Овакав исход добијен је и у поновљеном истраживању две деценије касније <sup>3</sup>
<sup>1</sup> Слике нису дате у овом раду. <sup>2</sup> Највероватније први рад у којем се говори о translацији репрезентација на садржајима хемије. Рад је публикован у престижном часопису <i>Journal of Research in Science Teaching</i> . <sup>3</sup> Могуће је да су радови Клемента и сарадника <sup>35,50-52</sup> први у којима се испитује успех на задацима ТСП.		

- B. Waldrip, V. Prain, J. Carolan, *Research in Science Education*, **40** (2010) 65
- R. Kozma, J. Russell, *Journal of Research in Science Teaching*, **34** (1997) 949
- J. K. Gilbert, *Visualization: a metacognitive skill in science and science education*, in *Visualization in science education*, J. K. Gilbert, Ed., Springer, Dordrecht, 2005.
- M. Stieff, *Journal of Research in Science Teaching*, **48** (2011) 1137
- V. Michalchik, A. Rosenquist, R. Kozma, P. Kreikemeier, P. Schank, *Representational resources for constructing shared understanding in the high school chemistry classroom*, in *Visualization: theory and practice in science education*, J. K. Gilbert, M. Nakhleh, M. Reiner, Eds., Springer, Dordrecht, Switzerland, 2008.
- S. P. Madden, L. L. Jones, J. Rahm, *Chemistry Education Research and Practice*, **12** (2011) 283
- S. Nitz, S. E. Ainsworth, C. Nerdel, H. Prechtel, *Learning and Instruction*, **31** (2014) 13
- V. Taskin, S. Bernholt, I. Parchmann, *Chemistry Education Research and Practice*, **16** (2015) 460
- M. Stieff, S. Scopelitis, M. E. Lira, D. Desutter, *Science Education*, **100** (2016), 344
- F. P. Keig, A. P. Rubba, *Journal of Research in Science Teaching*, **30** (1993) 883
- L. W. Anderson, D. R. Krathwohl, P. W. Airasian, K.A. Cruikshank, R. E. Mayer, P. R. Pintrich, J. Raths, M. C. Wittrock, *A taxonomy for learning, teaching, and assessing: A revision of Bloom's Taxonomy of Educational Objectives*. Longman, New York, US, 2001.
- H.-K. Wu, J. S. Krajcik, E. Soloway, *Journal of Research in Science Teaching*, **38** (2001), 821
- A. Gagatsis, M. Shiakalli, *Educational Psychology*, **24** (2004) 645
- C. A. Superfine, S. R. Canty, M. A. Marshall, *The Journal of Mathematical Behavior*, **28** (2009) 217

27. S. Ainsworth, *Learning and Instruction*, **16** (2006) 183
28. R. Lesh, T. Post, M. Behr, *Representations and translations among representations in mathematics learning and problem solving*, In *Problems of representations in the teaching and learning of mathematics*, C. Janvier, Ed., Lawrence Erlbaum, Hillsdale, US, 1987.
29. B. S. Bloom, M. D. Engelhart, E. J. Furst, W. H. Hill, D.R.Krathwohl, *Taxonomy of educational objectives: the classification of educational goals. Handbook I: cognitive domain*. David McKay Company, New York, US, 1956.
30. R. J. Marzano, J. S. Kendall, *The New taxonomy of educational objectives* (2nd ed.). Corwin Press-SAGE, Thousand Oaks, US, 2007.
31. N. P. Grove, M. M. Cooper, K. M. Rush, *Journal of Chemical Education*, **89** (2012) 844
32. K. S. Taber, *Chemical misconceptions—prevention, diagnosis and cure. Volume 1: Theoretical background*. Royal Society of Chemistry, London, UK, 2002.
33. M. Turner, K. VanderHeide, H. Fynewever, R. J. Shavelson, *Chemistry Education Research and Practice*, **12** (2011) 142
34. S. T. Levy, U. Wilensky, *Journal of Science Education and Technology*, **18** (2009) 243
35. P. Rosnick, J. Clement, *The Journal of the Mathematical Behavior*, **3** (1980) 3
36. P. B. Kohl, N. D. Finkelstein, *Physical Review Special Topics - Physics Education Research*, **1** (2005) 1
37. I. Matijašević, J. N. Korolija, Lj. M. Mandić, *Chemistry Education Research and Practice*, **17** (2016) 656
38. F. Hitt, *Journal of Mathematical Behavior*, **17** (1998) 123
39. R. Zazkis, P. Liljedahl, K. Gadowsky, *The Journal of Mathematical Behavior*, **22** (2003), 437
40. G. Kurt, E. Çakıroğlu, *Learning and Individual Differences*, **19** (2009) 404
41. L. C. Hadfield, C. E. Wieman, *Journal of Chemical Education*, **87** (2010) 750
42. A. L. Kern, N. B. Wood, G. H. Roerig, J. Nyachwaya, *Chemistry Education: Research and Practice*, **11** (2010) 165
43. J. Nyachwaya, A-R.Mohamed, G. H. Roerig, N. B. Wood, A. L. Kern, J. L. Schneider, *Chemistry Education Research and Practice*, **12** (2011) 121
44. U. Ramnarain, A. Joseph, *Chemistry Education Research and Practice*, **13** (2012) 462
45. M. Molina, S. Rodríguez-Domingo, M. C. Cañadas, E. Castro, *International Journal of Science and Mathematics Education*, **15** (2017) 1137
46. N. Becker, M. Towns, *Chemistry Education Research and Practice*, **13** (2012) 209
47. P. M. G. M. Kop, F. J. J. M. Janssen, P. H. M. Drijvers, M. V. J. Veenman, J. H. van Driel, *The Journal of Mathematical Behavior*, **39** (2015) 121
48. W. Wollman, *Journal for Research in Mathematics Education*, **14** (1983) 169
49. S. Padalkar, M. Hegarty, *Journal of Educational Psychology*, **107** (2015) 451
50. J. Clement, *Journal for Research in Mathematics Education*, **13** (1982) 16
51. J. Clement, R. Narode, P. Rosnick, *Focus on Learning Problems in Mathematics*, **3** (1981) 36
52. J. Clement, J. Lochhead, G. Monk, *American Mathematical Monthly*, **88** (1981) 286
53. K. J. Fisher, K. Borchert, M. Bassok, *Memory & Cognition*, **39** (2011) 502
54. N. Becker, C. Stanford, M. Towns, R. Cole, *Chemistry Education Research and Practice*, **16** (2015) 769
55. J. T. Olimpo, B. C. Kumi, R. Wroblewski, B. L. Dixon, *Chemistry Education Research and Practice*, **16** (2015) 143
56. B. C. Kumi, J. T. Olimpo, F. Bartlett, B. L. Dixon, *Chemistry Education: Research and Practice*, **14** (2013) 177
57. B. M. McCollum, L. Regier, J. Leong, S. Simpson, S. Sterner, *Journal of Chemical Education*, **91** (2014) 1810
58. K. Nichols, M. Ranasinghe, J. Hanan, *Instructional Science*, **41** (2013) 699
59. M. A. Rau, *Chemistry Education Research and Practice*, **16** (2015) 654
60. R. Tytler, S. Peterson, V. Prain, *Teaching Science*, **52** (2006) 12
61. K. Dávila, V. Talanquer, *Journal of Chemical Education*, **87** (2010) 97
62. T. Fredlund, C. Linder, J. Airey, A. Linder, *Physical Review Special Topics - Physics Education Research*, **10** (2014) 1
63. L. Pozzer-Ardenghi, W.-M. Roth, *Science Education*, **91** (2007) 96
64. S. Hwang, W.-M. Roth, *Research in Science Education*, **41** (2011) 461
65. S. B. Philipp, D. K. Johnson, E. Yezierski, *Chemistry Education Research and Practice*, **15** (2014) 777
66. J. Han, W.-M. Roth, *Science Education*, **90** (2006)(2) 173
67. K. J. Schönborn, S. Bögeholz, *International Journal of Science and Mathematics Education*, **7** (2009) 931
68. R. Lesh, T. Post, M. Behr, *Representations and translations among representations in mathematics learning and problem solving*, in *Problems of representations in the teaching and learning of mathematics*, C. Janvier, Ed., Lawrence Erlbaum, Hillsdale, US, 1987.
69. R. E. Mayer, *Memory and information processes*, in *Handbook of psychology: educational psychology*, I. B. Weiner, W. M. Reynolds, G. E. Miller, Eds., John Wiley & Sons, Hoboken, US, 2003.

## Abstract

### TRANSLATIONS OF EXTERNAL REPRESENTATIONS

**Igor Matijašević**, IX Gymnasium “Mihailo Petrović-Alas”, Belgrade

External representation is often defined as something that stands in place of something else. Translation of external representations is someone's ability to notice an information similarity among two or more external representations. This article presents a brief literature review about this didactical concept as well as possibilities for its application in formative evaluation and gradings.