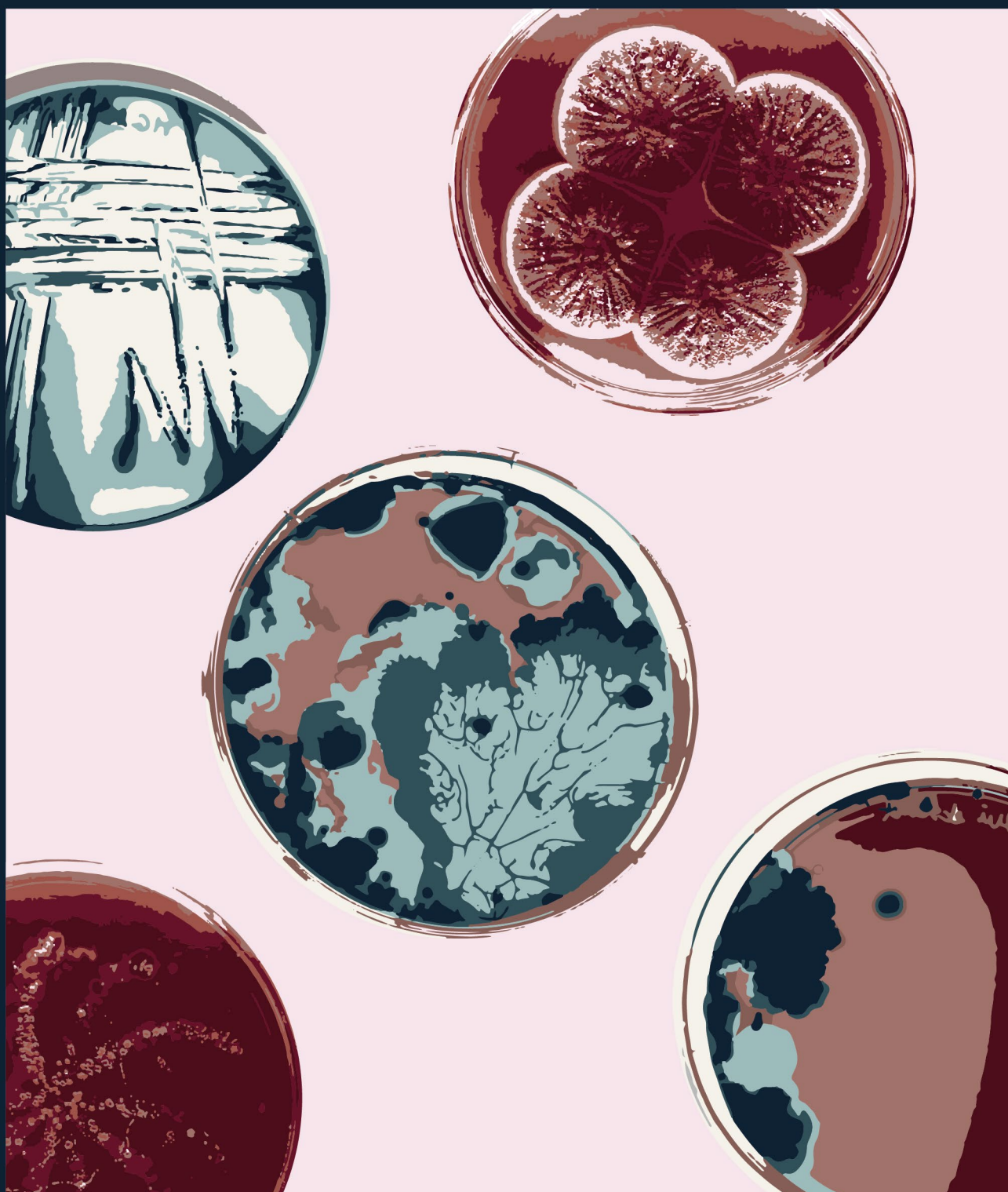


VORTEKS

*Revija študentov biotehnologije in mikrobiologije
Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani*



september 2026

št. 1

NAGOVOR UREDNIŠTVA

Vorteks
Revija študentov biotehnologije in mikrobiologije Biotehniške
fakultete Univerze v Ljubljani
september 2026, št. 1

Založnik:
Biotehniška fakulteta, Biotehnološko študentsko društvo in Društvo študentov
mikrobiologije Slovenije,
Jamnikarjeva ulica 101, 1000 Ljubljana

Uredniški odbor:
Luka Škabar, Martin Steblovnik, Iza Wallner, Eva Rems, Tina Skočaj,
prof. dr. Tanja Kunej, doc. dr. Iztok Dogša
(revija.btmb@gmail.com)

Recenzenti:
asist. dr. Ida Djurdjevič, izr. prof. dr. Katja Goričar, izr. prof. dr. Cene
Gostinčar, asist. dr. Venko Kononenko, prof. dr. Tanja Kunej, asist. dr. Eli
Podnar, znan. sod. dr. Jelka Pohar, prof. dr. Danijel Skočaj, izr. prof. dr. Matej
Skočaj, prof. dr. Janja Trček

Oblikovanje:
Iza Wallner

Lektura:
dr. Tomaž Petek, s. p.

To delo je ponujeno pod licenco **Creative Commons Priznanje avtorstva**
4.0 Mednarodna licenca (z izjemo fotografij). / This work is licensed
under a **Creative Commons Attribution 4.0 International License** (except
photographs).

eISSN: 3024-1499

Drage bralke, dragi bralci!

V rokah držite prvo izdajo Vorteksa, skupne revije Biotehnološkega študentskega društva in Društva študentov mikrobiologije Slovenije. Namen revije je preprost: študentkam in študentom biotehnologije in mikrobiologije smo želeli ponuditi priložnost, da se preizkusijo v pisanju člankov. Prav tako smo želeli predstaviti, česa vsega smo na naših študijskih programih zmožni in s čim vse se ukvarjamo. Prepričani smo, da smo dobro izpolnili svoje cilje ter v revijo uvrstili kakovostne in zanimive prispevke.

Med biotehnologi in mikrobiologi je ideja o študentski reviji krožila že dlje časa, konkretno pobudo pa smo prejeli s kolegija študija biotehnologije kot enega izmed načinov, s katerim bi lahko počastili spomin na prof. dr. Polono Jamnik, ki nas je prežgodaj tragično zapustila. Globoko se zahvaljujemo njenemu očetu Tonetu Jamniku, ki se je v najtežjih trenutkih odločil, da bo z delom zapuščine podprl delovanje Biotehnološkega študentskega društva. Verjamemo, da bi bila profesorica ponosna na odlične članke študentov programa, ki ga je dolgo časa tako srčno vodila.

Zahvaljujemo se tudi mentorjema in sourednikoma pri pripravi revije, prof. dr. Tanji Kunej in doc. dr. Iztoku Dogši, ki sta nam s svojimi izkušnjami in z nasveti močno olajšala uredniško delo, prof. dr. Branki Javornik, ki je ubesedila svoje spomine na prof. dr. Polono Jamnik, prof. dr. Nataši Štajner, Maticu Hrabarju in Nevenki Valič za nasvete, komunikacijo in za logistično podporo, Neju Bizjaku, ki je prvi predlagal izdajo revije kot skupni projekt obeh društev, asist. Katji Jamnik in asist. Blažu Jugu, ki sta bila pripravljena predstaviti svoji karierni poti, izr. prof. dr. Cenetu Gostinčarju za zanimiv intervju ter Razvojnemu skladu Biotehniške fakultete, ki je prepoznal vrednost našega povezovanja pri pripravi revije in je finančno podprl njeno izdajo.

Posebno zahvalo izrekamo recenzentom člankov, ki so si nesebično vzeli čas in prispevali k razvoju talenta naslednjih generacij mikrobiologov in biotehnologov, med katerimi so se mnogi prvič srečali s pisanjem strokovnega članka. Zavedamo se, da je recenzija člankov zahtevno in odgovorno delo, zato cenimo vašo prostovoljno pomoč, brez katere nastanek revije ne bi bil mogoč.

Prva izdaja Vorteksa je dosežek večmesečnega dela zagrete ekipe, ki smo jo sestavljali mikrobiologi in biotehnologi. Veseli smo, da gre za skupen dosežek študentov dveh študijskih programov, ki sta si na Biotehniški fakulteti najbolj sorodna. Upamo in smo prepričani, da bo nadaljnjih izdaj in drugih skupnih projektov še veliko.

Želimo vam prijetno branje. *Sapere aude.*

Študentski del uredniškega odbora revije:
Luka Škabar, Martin Steblovnik, Iza Wallner, Eva Rems, Tina Skočaj

KAZALO

V SPOMIN prof. dr. Poloni Jamnik

6

Optimizacija terapevtskih protiteles s strojnim
učenjem

10

Nevronske mreže in računalniški vid za
klasifikacijo bakterijskih kolonij

16

Ali lahko vampirske bakterije rešijo izzive
sodobne medicine

22

Bakterijski duhovi: od strašnih patogenov do
pomočnikov v medicini

27

Regulatorne celice T in njihove biomedicinske
aplikacije

32

INTERVJU z izr. prof. dr. Cenetom Gostinčarjem

36

Potencial in etično ozadje genskega
spreminjanja zarodkov v postopku IVF

42

Biotehnološki in farmakološki pristopi za
podaljševanje življenjske dobe

48

Kako adenomioza posnema raka

54

Diferencialno izražanje transpozicijskih
elementov pri otrocih s covid-19 povezanimi
vnetnimi boleznimi

59

Biosinteza kanabinoidov v kvasovkah s pomočjo
metabolnega inženirstva

66

Predstavitvi mladih raziskovalcev:

72 Blaž Jug, mag. mikrobiol.

73 Katja Jamnik, mag. biotehnol.

Predstavitvi študentskih društev DŠMBS in BŠD

74

V SPOMIN

prof. dr. Poloni Jamnik



BIOGRAFIJA

prof. dr. Polona Jamnik (1973–2025)

Marca 2025 se je po hudi bolezni, veliko prezgodaj, poslovila prof. dr. Polona Jamnik, redna profesorica za področje biotehnologije na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Svojo poklicno in akademsko pot je posvetila znanstvenoraziskovalnemu in pedagoškemu delu, za seboj pa je pustila prepoznaven pečat v strokovnih krogih pa tudi med kolegi in študenti.

Leta 1997 je končala dodiplomski študij živilske tehnologije na Biotehniški fakulteti z diplomom s področja fiziologije kvasovk pod mentorstvom prof. dr. Petra Rasporja, za katero je prejela študentsko Prešernovo nagrado, istega leta pa tudi Jesenkovo nagrado za najboljšo študentko v generaciji. Pod istim mentorstvom je dodiplomske raziskave nadgradila in leta 2002 doktorirala s področja biotehnologije. Že med doktorskim študijem je začela razvijati nove znanstvene poti, ki so jo spremljale skozi celotno raziskovalno kariero: metodološko je uvedla proteomske tehnike in v kvasni celici kot modelnem evkariontskem organizmu preučevala delovanje bioaktivnih snovi v procesih oksidativnega stresa in biosinteze sekundarnih metabolitov, osvojeno metodologijo pa je uspešno prenesla tudi na področji

farmacije in živilske biotehnologije. Sodelovala je pri več kot 20 nacionalnih raziskovalnih projektih in bila koordinatorica mednarodnega projekta ERA-NET Biotransport. Vzpostavila je dejavno sodelovanje s številnimi raziskovalnimi ustanovami doma in v tujini ter z biotehnološkimi podjetji. V okviru te znanstvenoraziskovalne dejavnosti je objavila 54 izvirnih znanstvenih člankov, osem preglednih znanstvenih člankov, vrsto strokovnih prispevkov in obsežno zbirko študijskega gradiva za študente.

Dr. Jamnik je bila globoko predana pedagoškemu delu. Svojo akademsko pot je začela kot asistentka na Katedri za biotehnologijo Oddelka za živilsko tehnologijo, nato pa je bila prek zaporednih habilitacij leta 2018 izvoljena v naziv redna profesorica. Na študiju biotehnologije ter živilstva in prehrane je bila nosilka ali sonosilka petih predmetov na 1. in 2. stopnji ter nosilka izbranih predmetov na doktorskem študiju bioznanosti. Sodelovala je pri zasnovi novih predmetov ali jo vodila, oblikovala je prepotrebna študijska gradiva ter organizirala seminarsko in raziskovalno delo za študente biotehnologije in živilstva. Bila je mentorica ali somentorica pri 79 diplomskih, 48 magistrskih in 5 doktorskih delih. Svoje znanje je nesebično prenašala na mlade in veliko študentom odprla nove poti v poklicni karieri. Njena predanost študentom je bila leta 2012 in leta 2015 nagrajena z naslovom najboljše pedagoginje študija.

Poleg pedagoškega in raziskovalnega dela je bila prof. dr. Polona Jamnik izjemno dejavna tudi na organizacijskem področju fakultete in univerze. Dvanajst let je vodila Študijsko komisijo za 1. in 2. stopnjo študija biotehnologije, dve leti je bila namestnica vodje Kolegija študija biotehnologija, v letih 2022–2024 pa njegova vodja. Med letoma 2008 in 2020 je bila članica Komisije Senata Biotehniške fakultete za študije 1. in 2. stopnje, od leta 2021 pa predsednica Komisije Senata Univerze v Ljubljani za dodiplomski študij.

Za svoje raziskovalno, pedagoško in strokovno delo je leta 2019 prejela priznanje Biotehniške fakultete, leta 2025 pa zlato plaketo Univerze v Ljubljani.

prof. dr. Branka Javornik

SPOMINI SODELAVCEV

prof. dr. Marina Pintar,
dekanja Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani

Prof. dr. Polona Jamnik je svoje življenje posvetila znanosti, izobraževanju in povezovanju ljudi. Njena predanost, energija in vizija bodo ostale trajen navdih za prihodnje generacije ter temelj za nadaljnji razvoj.

prof. dr. Sonja Smole - Možina,
predstojnica Katedre za biotehnologijo, mikrobiologijo in varnost živil, Oddelek za živilstvo, Biotehniška fakulteta

Kaj pa v srcih sodelavcev, prijateljev, študentov? Vemo, da tam ni prostora za statistike, številke zelo hitro zbledijo ... Tam, v srcih, se najgloblje zapišejo druge stvari – predvsem spomin na skupen trud in delo, še posebej pa zadovoljstvo ob skupaj doseženih uspehih: spomnim se skupnega veselja ob lepih alginatnih kroglicah z imobiliziranimi kvasovkami, ko smo postavljali prve biotehnološke laboratorijske vaje za študente, pa poznejšega razvoja katedre in rasti raziskovalne skupine, novih laboratorijev in opreme, nove študijske predmete in smeri, novo znanje za vse ... pa ne le delo in študij, v spomin se še bolj zapiše skupno veselje, praznovanja pa skupna potepanja – s kolegi z oddelka, z biotehnologi ali ožjo družbo, v kolesarski opravi ali hribovskih čevljih ...

prof. dr. Nataša Štajner,
vodja Kolegija študija biotehnologija, 2025–

Polona ni bila le izjemna znanstvenica in predavateljica, ampak tudi oseba z veliko mero topline in humorja. Znala si je vzeti čas, se osredotočiti na sočloveka. Pogovor z njo je bil preprost in prijeten; dajala je občutek povezanosti in prijateljstva. In tisti njen nasmeh, ko ti prikima in reče: »... počakaj trenutek, samo tole dokončam«, nato pa z iskrico v očeh nadaljuje pogovor, kot da ima ves čas tega sveta. Vedno prisotna, vedno dostopna, vedno pripravljena prisluhniti.

prof. dr. Branka Javornik,
vodja Kolegija študija biotehnologije 2006–2016

S Polono sva se bolje spoznali po letu 2008, ko je bila imenovana za predsednico študijske komisije. To je bilo za biotehnologijo zelo naporno obdobje – šlo je za nov študij, ki si je mukoma utiral pot med študiji na Biotehniški fakulteti. Polona je kljub svoji mladosti s svojo neomajno predanostjo študiju, z natančnim poznavanjem študijskih pravil ter doslednostjo in vztrajnostjo pri uveljavljanju dobrih študijskih kazalnikov ogromno prispevala k prepoznavnosti kakovosti študija biotehnologije. Člani kolegija smo cenili njeno profesionalnost, med zahtevnimi študenti biotehnologije pa je uživala veliko zaupanje, saj je vedno znala poiskati dobre rešitve za nastale probleme. In na tej poti so se spletle kolegialne in prijateljske vezi ...

SPOMINI ŠTUDENTOV

Matic Hrabar,

žalni govor študentov

Ob predstavitvi izbirnih predmetov na magistrskem študiju Biotehnologije nam je predstavnica študentov Mateja Jenko za predmet Molekulski mehanizmi staranja napisala: »Super predmet, zanimiv, in postavila ga je prof. dr. Polona Jamnik, zato ne bom izgubljala besed ...« To je bila Polona. Njenih predmetov si nisi izbral, ker te je tematika tako močno zanimala – izbral si jih, ker jih je učila ona. Predavala je z zanosom, ki je vsak koncept, molekulo in tehnologijo naredil zanimiv in razumljiv, pri svojih ikoničnih vajah pa se je postavila v vlogo spraševalca in nas spodbujala h kritičnemu razmišljanju, medtem ko smo se mi spraševali, kaj sploh počnemo.

To je bil le eden izmed spominov, ki smo jih zbrali med aktualnimi in nekdanjimi študenti Biotehnologije. Ni bilo treba dolgo obiskovati tega študija, da si spoznal, da je Polona Jamnik profesorica z veliko začetnico, saj je preprosto poosebljala to besedo. Bila je izjemna predavateljica, ki je s sposobnostjo, da je zapletene teme pojasnila na privlačen in razumljiv način, poskrbela, da je pri vseh še dodatno povečala zanimanje za dotično snov. Vedno si je vzela čas za nas in nam po potrebi tudi v svojem prostem času razložila kompleksnejše tematike. Njena predavanja niso bila samo suhoparne razlage teorij, ampak zgodbe, ki so živele skozi njen glas, skozi njeno iskrico v očeh, s katero je navduševala in spodbujala.

Z njenimi intelektom, retoriko, s prodornim, z iskrivim pogledom, integriteto in predvsem s srčnim odnosom je iz nas, študentov, zvabila najboljše. Zaznamovale so jo iskrena prijaznost, skrb za druge in toplina, s katerimi je pustila neizbrisen pečat v srcih vseh, ki so jo poznali.

Od prvega dne našega prvega študijskega leta nas je dobesedno vzela pod svoje okrilje. Od prvega dne nas je poznala po imenih. Vsakič, ko smo se videli, nas je z velikim nasmehom na obrazu pozdravila. Prisluhnila je našim zgodbam, ne glede na to, kako težke so bile ali kako izgubljeni smo bili v tistem trenutku. Vedno je znala najti pravo besedo in nas potolažiti, dati nov zagon in novo upanje. Prav tako pa je z veseljem poklepetala z nami in se z nami povesečila ob še tako majhnih zmagah. Na biotehnologiji je bila naša druga mama.

Poleg dela v predavalnici je bila prof. dr. Polona Jamnik tudi mentorica številnim študentom v okviru svoje raziskovalne skupine. Verjela je v nas, ko si sami nismo niti upali sanjati o raziskovalni karieri. Že študentom na dodiplomski stopnji je dala priložnost eksperimentalnega dela na katedri, s čimer so lahko preizkusili naučeno teorijo v praksi. Imela je redko sposobnost prepoznati tisto nekaj, tisto željo po več, in kar zasvetile so se ji oči, ko je videla, da nas predavanja zanimajo, kako radi delamo v laboratoriju. Skupaj z nami je neučakano čakala rezultate, bila navdušena nad novimi odkritji in nas bodrila, ko poskusi niso šli najbolj po načrtu. S svojo mirnostjo in z jasnim pogledom v prihodnost nas je vedno znala pravilno usmeriti.

Prof. dr. Polona Jamnik – takrat kot bruca, ki je pred enim mesecem prišel na fakulteto, ste me sprejeli med Kolegij študija Biotehnologije kot enakovrednega člana, čeprav so med nami »svetlobna« leta razlike. Tudi ko so mojim predlogom nasprotovali vsi drugi

profesorji, ste mi namenili svoj topli pogled, ki je povedal vse. Kristalno jasno se spomnim najinega zadnjega srečanja na seji Kolegija. Ker se je bližal konec študijskega leta, ste me povabili na sestanek, da bi se lahko bolj poglobljeno pogovorila o različnih študijskih problematikah, za katere vam je bilo res iskreno mar – vendar ste vztrajali, da najprej v miru končam vse kolokvije in izpite. Do najinega sestanka nikoli ni prišlo.

Čeprav naše generacije in mlajših generacij študentov Polona ni nikoli učila, nam je glede na vsa ta pričevanja, ki so nam jih posredovali starejši kolegi, lahko res žal, da se nas nikoli ne bodo dotaknili njeni topli žarki, s katerimi je žarela. Še bolj pa nam je žal, da ona sama ne bo imela več možnosti predavati in raziskovati, saj je bilo popolnoma očitno, da je to njeno dano poslanstvo na tem svetu, ki ga je izpolnjevala z vsem srcem. Za to si je zaslužila več. Več priznanja, več spoštovanja in predvsem več časa, ki ga kljub vsemu znanstvenemu napredku, ki ga vsak dan soustvarjamo, ne znamo prevrteti nazaj.

Veliko prezgodaj nas je zapustila, a njena neizmerljiva dediščina ostaja; v vsem znanju, ki ga je predala; v navdihu, ki ga je vžgala; v ljudeh in življenjskih poteh, ki jih je oblikovala.

Upamo, da se bo na drugi strani mavrice našla, kot se je nekoč našla z nami. Prof. dr. Polona Jamnik, za vedno ste se vtisnili v srca nešteti.

Mateja Jenko,

predstavnica študentov 2019–2023

Prof. dr. Polona Jamnik nas je od prvega študijskega dne poznala po imenu in nas z navdušenjem spremljala na naši poti. Študentje se je spominjamo kot predavateljico, ki je z iskricami v očeh predajala še tako zahtevno snov, ter kot osebo, ki je bila vedno pripravljena pomagati, prisluhniti in podati nasvet pri laboratorijskem delu in drugih življenjskih izzivih. Prav tako se je nekateri spomnimo kot profesorice, ki je na sejah študijske komisije in Kolegija vedno zagovarjala stališča, ki bi izboljšala položaj študentov. Sama si bom Polono zapomnila kot potrpežljivo in srčno osebo, ki me je navdušila za znanost. Dala mi je zgled, da so marljivost, srčnost, vedoželjnost in pripravljenost za sodelovanje temeljne vrline v znanosti. Pustila je trajen pečat na številnih študentih, ki delamo po njenih načelih, njeno vedoželjnost prenašamo na mlajše generacije in na svoj način prispevamo k razvoju znanosti.

TERAPEVTSKIH PROTITELES

s strojnim učenjem

Nika Novak¹¹ Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije, Jamnikarjeva 101, 1000 Ljubljana

Ključne besede: protitelesa, strojno učenje, imunologija, umetna inteligenca, antigen

IZVLEČEK

Terapevtska protitelesa predstavljajo enega izmed ključnih stebrov sodobne medicine. Z imunskimi in biokemičnimi mehanizmi vplivajo na potek bolezni ter se uporabljajo v diagnostiki in tudi pri zdravljenju različnih bolezni. Pomembna so predvsem na področju razvoja zdravil za zdravljenje avtoimunskih bolezni, malignih tumorjev, nalezljivih bolezni in nevroloških motenj. Čeprav je iskanje ustreznih kandidatov za terapevtska protitelesa danes že dobro uveljavljen proces, njihova optimizacija še vedno ostaja dolgotrajna in stroškovno zahtevna. Glavni izziv predstavlja sočasna obravnava več parametrov, kot so: imunogenost, topnost, afiniteta in stabilnost, kar zaradi svoje zahtevnosti upočasnjuje razvoj zdravil. Nedavni napredki v računalništvu, strojnem učenju in v razvoju modelov, kot je AlphaFold, so omogočili bistveno boljše možnosti za optimizacijo proteinov ter pospešili proces njihovega načrtovanja in razvoja. Strojno učenje omogoča analizo in napovedovanja najperspektivnejših mutacij brez obsežnega eksperimentalnega preverjanja. Cilj tega članka je osvetliti vlogo strojnega učenja pri večparametrski optimizaciji terapevtskih protiteles.

Uvod

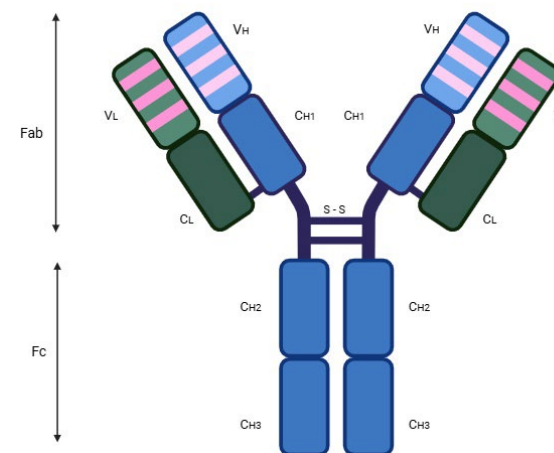
Terapevtska protitelesa so inženirsko zasnovani proteini, ki se specifično vežejo na tarčne molekule v organizmu in se uporabljajo pri zdravljenju številnih bolezni, vključno z rakom ter avtoimunskimi in vnetnimi obolenji. Leta 1986 je United States Food and Drug Administration (US FDA) odobrila prvo terapevtsko monoklonsko protitelo Muromonab-CD3 za klinično uporabo pri ljudeh [1]. Ta odobritev je pomembno spodbudila raziskave in razvoj terapevtskih protiteles ter omogočila hiter napredek na področju bioloških zdravil.

V zadnjih letih je podoben razvoj doživelo tudi področje umetne inteligence in strojnega učenja, ki je pomembno pospešilo raziskave na področju biologije in proizvodnje zdravil. Področje terapevtskih protiteles postaja vse bolj konkurenčno, zato je iskanje učinkovitih novih metod za optimizacijo in proizvodnjo kandidatov za protitelesa ključnega pomena. Kljub hitremu napredku tradicionalnih eksperimentalnih pristopov se strojno učenje vse bolj uveljavlja kot orodje za hitrejšo in učinkovitejšo optimizacijo protiteles.

Kaj so terapevtska protitelesa?

Protitelesa oz. imunoglobulini so efektorske molekule humoralnega dela pridobljenega imunskega sistema, ki jih proizvajajo limfociti B v našem telesu ter prepoznajo in prispevajo k odstranjevanju tujih antigenov. Glavne funkcije protiteles vključujejo: opsonizacijo, aktivacijo sistema komplementa, nevtralizacijo in s protitelesi posredovano celično citotoksičnost [2].

Funkcionalno protitelo je sestavljeno iz štirih polipeptidnih verig, dveh enakih lahkih in dveh enakih težkih. Lahka in težka veriga sta med seboj povezani s kovalentnimi disulfidnimi vezmi, k stabilnosti pa prispevajo tudi nekovalentne interakcije, kot so: hidrofobne interakcije, ionske interakcije, solni mostički in vodikove vezi. Lahka veriga je sestavljena iz dveh domen imunoglobulina – variabilne (VL) in konstantne (CL), težka pa iz ene variabilne (VH) in treh konstantnih domen (CH1, CH2 in CH3) [3]. Funkcionalno so protitelesa razdeljena na dva antigen-vezavna dela (Fab) in konstantno (Fc) regijo [2].



Slika 1: Zgradba protitelesa. Protitelo je sestavljeno iz dveh funkcionalnih regij: Fab, ki predstavlja antigen-vezavni del, in Fc, ki tvori konstantno regijo. Z modro barvo sta obarvani dve težki verigi, od katerih je vsaka sestavljena iz ene variabilne domene (VH) in treh konstantnih domen (CH1, CH2 in CH3). Z zeleno barvo sta prikazani dve lahki verigi, ki ju sestavljata ena variabilna (VL) in ena konstantna domena (CL). Z rožnatimi črtami so označene hipervariabilne regije, ki določajo specifičnost vezave protitelesa na antigen. Ustvarjeno na <https://BioRender.com>.

VL in VH vsebujeta po tri hipervariabilna aminokislinska zaporedja, ki oblikujejo vezavno mesto (paratop) za vezavo na vezišče antigenske molekule (epitop). Hipervariabilne regije VL in VH zato imenujemo tudi regije, ki določajo komplementarnost (*angl.* complementary-determining region, CDR). Antigen se na protitelo veže prek nekovalentne vezi, pri čemer sodelujejo van der Waalove sile, elektrostatične sile in druge šibke sile, vezavno mesto antigena pa oblikuje okvirno 5–10 aminokislin v vsaki hipervariabilni regiji [4]. Zaradi razlik v sestavi in strukturi težkih verig protitelesa razvrščamo v različne razrede: IgM, IgG, IgE, IgA in IgD.

Z biotehnološkega vidika je najpomembnejši razred protiteles IgG [2].

Protitelesa opravljajo vlogo specifičnega prepoznavanja antigenov, hkrati pa konstantni del njihove težke verige opravlja efektorsko funkcijo nevtralizacije in odstranjevanje tujka [4]. Napredek v znanosti nam je omogočil, da lahko njihov naravni potencial izkoristimo v številnih terapevtskih in diagnostičnih aplikacijah. Terapevtska protitelesa so biološka zdravila na osnovi protiteles, ki zaradi svoje visoke specifičnosti omogočajo usmerjeno zdravljenje številnih bolezni [3].

Razvoj in optimizacija terapevtskih protiteles s tradicionalnimi pristopi

Začetki zdravljenja s protitelesi segajo v konec 19. stoletja, ko sta Emil von Behring in Shibasaburō Kitasato dokazala, da je mogoče pasivno zaščitno imunost prenesti s serumom. Kuncce sta imunizirala z neletalnimi odmerki toksinov tetanusa in davice, iz njihove krvi pridobila serum ter ga prenesla na neimunizirane miši. Te sta nato izpostavila povzročiteljem bolezni in ugotovila, da preneseni serum zagotavlja zaščito pred okužbo [5]. Ta ugotovitev je spodbudila širše raziskovanje pasivne imunizacije in terapevtskega potenciala protiteles.

Pomemben preboj je sledil leta 1975, ko sta Georges Köhler in César Milstein razvila tehnologijo hibridomov. Z združitvijo limfocitov B iz vranic imuniziranih miši in trajne celične linije mielomskih (tumorskih) celic sta ustvarila hibridome – celične linije, ki združujejo sposobnost neomejenega razmnoževanja mielomskih celic in sposobnost limfocitov B za tvorbo specifičnih protiteles. S selekcijo v selekcijskem mediju HAT ter z nadaljnjim presejanjem in s kloniranjem sta naredila izbor klonov, ki so izločali protitelesa z želeno antigensko specifičnostjo. S tem je bilo prvič mogoče proizvajati monoklonska protitelesa z enotno strukturo, s specifičnostjo in z afiniteto v neomejenih količinah [6].

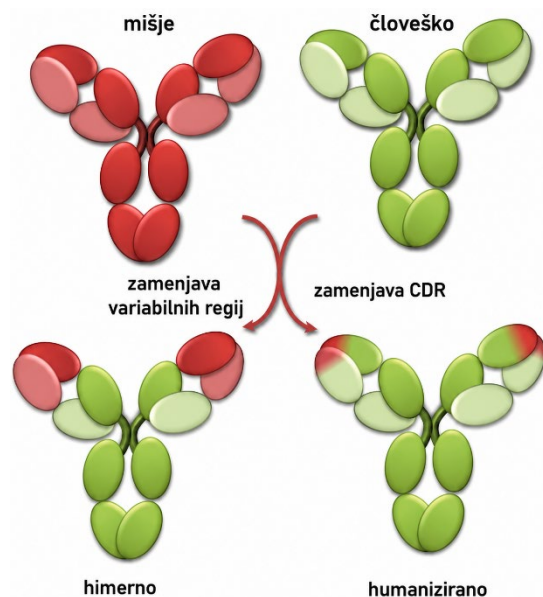
To odkritje je sprva vzbudilo veliko navdušenje, saj so pričakovali, da bodo tako pridobljena monoklonska protitelesa predstavljala idealne kandidate za terapije. Kmalu pa so ugotovili, da človeško telo protitelesa, pridobljena iz miši, prepozna kot tujek, kar sproži nastanek humanih protimišjih protiteles in hitro odstranitev mišjih protiteles iz organizma. Poleg tega ta zgodnja protitelesa niso ustrezno reagirala z vsemi komponentami človeškega imunskega sistema, zaradi česar je bila njihova terapevtska učinkovitost omejena [7].

S tehnologijo hibridomov je bilo nato proizvedeno prvo terapevtsko mišje monoklonsko protitelo, Muromonab-CD3, ki je bilo za klinično uporabo odobreno leta 1986 in se je uporabljalo za preprečevanje zavrtnitve presajenih ledvic [1]. Pozneje se je izkazalo, da je Muromonab-CD3 zaradi svoje mišje sestave zelo imunogen, saj lahko človeški imunski sistem protitelo prepozna kot tujo beljakovino in proti njemu sproži imunski odziv. To je spodbudilo razvoj novih generacij terapevtskih protiteles, pri katerih so raziskovalci s postopnim povečevanjem deleža človeških zaporedij zmanjševali njihovo imunogenost [2]. Neuberger in sodelavci so leta 1985 z uporabo rekombinantne tehnologije DNA razvili mišjo celično linijo, ki je stabilno proizvajala himerna protitelesa razreda IgE. Ta protitelesa so vsebovala mišje variabilne regije protiteles in človeške konstantne regije.

Delno človeška struktura je tem himernim protitelesom omogočila učinkovitejšo interakcijo s človeškimi efektorskimi celicami in sistemom komplementa. Razvoj himernih

protiteles je postavil temelje za rekombinantno inženirstvo protiteles [8].

Leto pozneje so Jones in sodelavci prvi prikazali možnost zamenjave CDR (*angl.* CDR grafting), pri kateri so regije CDR mišjega protitelesa, odgovorne za vezavo antigena, prenesli v človeško protitelesno ogrodje. S tem pristopom so ohranili antigensko specifičnost mišjega protitelesa, hkrati pa bistveno zmanjšali njegovo imunogenost. Ta pristop je predstavljal enega prvih dokazov, da je CDR grafting lahko osnova za razvoj humaniziranih protiteles [9].



Slika 2: Prikaz himernega in humaniziranega protitelesa. Rdeče so obarvana mišja zaporedja, zeleno pa človeška. Svetli deli prikazujejo lahko verigo, temni pa težko. Prirejeno po [7].

Pomemben napredek je predstavljal tudi razvoj novih metod selekcije, med katerimi je ena najuspešnejših metoda fagni prikaz (*angl.* phage display). Uporabnost te metode je bila prvič jasno prikazana leta 1990, ko so McCafferty in sodelavci dokazali, da je mogoče variabilne regije protiteles genetsko povezati s površinskim proteinom filamentnega bakteriofaga in jih prikazati na njegovi površini. Ta metoda je bistveno poenostavila selekcijo protitelesnih različic, saj posamezen fag izraža eno različico protitelesa in hkrati nosi njen genetski zapis, kar omogoča neposredno selekcijo na podlagi vezave antigena [10]. Znanstveniki lahko s sodobnimi laboratorijskimi metodami iz obsežnih knjižnic človeških protiteles hitro izberejo tista, ki se specifično vežejo na različne tarče, brez potrebe po imunizaciji živali. Pozneje so razvili tudi tehnologijo prikaza na kvasovkah (*angl.* yeast display). V primerjavi s fagnim prikazom omogoča evkariontski sistem kvasovk boljše zvijanje kompleksnih proteinov in izvajanje določenih posttranslacijskih modifikacij, kar je lahko pomembno pri pridobivanju funkcionalnih protiteles [11]. Kmalu zatem je bil razvit tudi pristop za pridobivanje popolnoma človeških protiteles z uporabo transgenih

miši, ki namesto mišjih proizvajajo človeška protitelesa [12].

Ena izmed razvitih metod za pridobivanje človeških protiteles je bila tudi transformacija limfocitov B z virusom Epstein-Barr (EBV). Leta 2004 so Traggiai in sodelavci z uporabo izboljšane metode transformacije z EBV immortalizirali spominske limfocite B bolnika po preboleli okužbi z virusom SARS-CoV ter izolirali več monoklonskih protiteles, tudi takih z visoko nevtralizacijsko aktivnostjo. Imortalizacija z EBV povzroči, da limfociti B dolgotrajno proliferirajo, pri tem pa ohranijo sposobnost tvorbe protiteles [13].

Čeprav so tradicionalne metode odkrivanja in optimizacije terapevtskih protiteles zelo uspešne in so omogočile razvoj številnih novih zdravil, so pogosto še vedno časovno zahtevne ter zahtevajo velike količine finančnih in laboratorijskih virov. Napredek na področju računalniške strojne opreme in razvoj modelov strojnega učenja sta omogočila uvedbo novih pristopov za načrtovanje protiteles, pri katerih ocenjujejo, da se je čas razvoja kandidatov zmanjšal za približno 60 %, stroški razvoja pa za približno 50 % [14]. Pred vstopom v klinične študije morajo terapevtski kandidati na osnovi protiteles prestati več stopenj razvoja, ki vključujejo: odkrivanje in presejanje protiteles na podlagi njihove sposobnosti vezave na antigen, izbor kandidatov na podlagi njihove biološke funkcije in optimizacijo izbranih kandidatov [15]. Kljub novim pristopom, ki omogočajo pridobivanje popolnoma humaniziranih protiteles, številna terapevtska protitelesa še vedno izvirajo iz nečloveških virov, kot so mišji ali himerni sistemi. Eden glavnih izzivov pri optimizaciji takšnih protiteles je zmanjšanje njihove imunogenosti, saj lahko prisotnost nečloveških zaporedij sproži imunski odziv gostitelja [16].

Ključni korak optimizacije zato predstavlja zmanjšanje imunogenosti, s čimer se prepreči ali omeji nastanek protiteles proti zdravilu. Imunski odziv proti zdravilu lahko pomembno zmanjša učinkovitost terapije in potencialno škoduje bolniku. V ta namen se uporabljata strategiji humanizacije in deimunizacije protiteles. Ta pristopa temeljita na povečanju deleža človeških zaporedij v protitelesu ter odstranjevanju ali zmanjševanju potencialno imunogenih epitopov [17].

Druga pomembna lastnost, ki jo je pri terapevtskih protitelesih treba optimizirati, je afiniteta vezave antigena. Afiniteta protitelesa do antigena predstavlja jakost nekovalentnih interakcij med epitopom antigena in paratopom protitelesa [4]. Tradicionalne metode optimizacije afinitete pogosto temeljijo na tehnikah naključne mutageneze, usmerjene mutageneze in zamenjave verig (*angl.* chain shuffling). Te in vitro metode poskušajo vnesti bolj ali manj nadzorovane mutacije v zaporedja protiteles, nato pa nastale knjižnice variant presejejo (*angl.* screening) in izberejo tiste z izboljšanimi lastnostmi. Zaradi naključne narave mutacij se lahko v protitelesa vnesejo tudi

neželene lastnosti, ki vplivajo na njihovo afiniteto vezave ali druge pomembne lastnosti protitelesa, kot so stabilnost, topnost ali specifičnost. Poleg tega so te metode pogosto zelo časovno zahtevne. V zadnjih letih pomemben napredek predstavljajo tudi *in silico* metode, ki temeljijo na računalniško podprtem načrtovanju in opazno pospešijo proces optimizacije [18].

Pomemben parameter pri optimizaciji terapevtskih protiteles predstavlja tudi specifičnost vezave. Če protitelo ni dovolj specifično, se lahko veže na podobne, neciljne epitope, kar imenujemo navzkrižna reaktivnost (*angl.* cross-reactivity). Posledice tega so lahko manjša učinkovitost zdravlila in neželeni učinki zaradi vezave na neciljne tarče [15].

Pomemben cilj optimizacije terapevtskih protiteles je tudi izboljšanje farmakokinetičnih lastnosti, ki omogočajo podaljšanje razpolovnega časa protitelesa, nižje odmerke, daljše intervale med aplikacijami, možnost subkutanega dajanja in zmanjšanje stroškov zdravljenja [15].

Na koncu optimizacija zajema tudi širše farmacevtske lastnosti, kot so termostabilnost, topnost, kemijska stabilnost in zmanjšanje heterogenosti, ki skupaj določajo primerčnost protitelesa za klinični razvoj [14].

Razvoj in optimizacija terapevtskih protiteles s strojnim učenjem

Strojno učenje v zadnjih letih postaja pomembno orodje pri razvoju in optimizaciji protiteles. Tradicionalni pristopi temeljijo predvsem na eksperimentalnem testiranju velikega števila različic protiteles, kar je zelo zamudno in drago. Z uporabo metod strojnega učenja je mogoče analizirati zelo obsežne zbirke proteinskih zaporedij in na podlagi rezultatov predvideti, katere različice imajo boljše lastnosti. Tak pristop pomembno pospeši postopek optimizacije, saj omogoča *in silico* napovedovanje lastnosti, kot so topnost, stabilnost, viskoznost, farmakokinetika in posttranslacijske modifikacije.

Tradicionalno strojno učenje se osredinja na razvoj napovednih modelov, ki se učijo povezave med vhodnimi podatki in izhodnimi rezultati. Podatki so običajno predstavljeni kot množica značilnosti (*angl.* features), ki se vnesejo v napovedni model, ta pa na podlagi vnesenega poda napovedne rezultate. Uspešnost algoritmov je neposredno povezana z obsegom, s kakovostjo in kompleksnostjo podatkovnih nizov, na katerih se učijo. Več kot je kakovostnih in raznolikih učnih primerov, natančneje lahko algoritem napoveduje podobne primere v prihodnosti [19].

V letu 2020 je prišlo do pomembnega preboja na področju napovedovanja proteinskih struktur z razvojem sistema umetne inteligence AlphaFold2, ki ga je predstavila ekipa podjetja DeepMind (Google DeepMind). Razvili so prvi računalniški pristop, ki je v večini primerov sposoben napovedati tridimenzionalne proteinske strukture z natančnostjo, primerljivo z eksperimentalno

določenimi strukturami, in to kljub odsotnosti podobnih strukturnih predlog. Njegov pristop temelji na globokem učenju in združuje evolucijske informacije iz večkratnih poravnav zaporedij (*angl.* multiple-sequence alignments, MSA) ter fizikalne in geometrijske omejitve proteinskih struktur [20]. Na osnovi AlphaFold2 je bil pozneje razvit AlphaFold-Multimer, ki je prilagojen napovedovanju struktur proteinskih kompleksov. Omogoča modeliranje medproteinskih interakcij in se pogosto uporablja za napovedovanje struktur več proteinskih enot v kompleksu. Kljub pomembnemu napredku ima še vedno omejitve pri zanesljivem napovedovanju specifičnih interakcij, zlasti pri kompleksih protitelo – antigen [21].

Pozneje je bil razvit še model RoseTTAFold, ki je – podobno kot AlphaFold2 – namenjen napovedovanju tridimenzionalne strukture proteinov na podlagi aminokislinskega zaporedja. Model RoseTTAFold kot vhodni podatek uporablja zaporedje aminokislin in temelji na t. i. three-track arhitekturi nevronske mreže. Ta hkrati obravnava tri med seboj povezane predstavitev proteina: 1D-aminokislinsko zaporedje, 2D-odnose med aminokislinskimi ostanki in 3D-prostorsko strukturo. Informacije med temi nivoji se neprestano izmenjujejo, kar omogoča integrirano učenje strukturnih značilnosti proteina [22]. Leta 2023 je bila predstavljena nadgrajena različica RoseTTAFold z imenom RoseTTAFold2, ki vključuje izboljšane mehanizme učenja in učinkovitejše modeliranje strukturnih značilnosti ter v številnih primerih dosega primerljivo natančnost pri napovedovanju proteinskih struktur kot AlphaFold2 [23].

Razvoj programov, ki temeljijo na strojnem učenju, za optimizacijo terapevtskih protiteles in načrtovanje vezavnih proteinov *de novo*

Razvoj AlphaFold2 in RoseTTAFold2 je omogočil nove pristope k napovedovanju in modeliranju proteinskih struktur, kljub temu pa je modeliranje variabilnih regij še vedno zelo zahtevno.

Struktura protiteles je v veliki meri ohranjena, izjemo pa predstavljajo regije CDR, ki vsebujejo šest variabilnih zank. Največji izziv predstavlja tretja zanka težke verige (CDR H3), saj nima dobro ohranjenih struktur ter je zelo raznolika in fleksibilna. DeepH3 je globoka rezidualna nevronska mreža, razvita okoli leta 2020, ki na podlagi zaporedij težke in lahke verige protiteles napoveduje razdalje in orientacije med aminokislinskimi ostanki v zanki CDR H3. Te napovedi nato pretvori v geometrijske potenciale, ki omogočajo natančnejše ocenjevanje in razlikovanje med mogočimi strukturami zanke CDR H3. Model se osredinja samo na napovedovanje strukture CDR H3 in ne modelira celotne strukture protitelesa [24]. Nadaljnji napredek v primerjavi z DeepH3 predstavlja poznejši model DeepAb, ki je sestavljen iz dveh zaporednih stopenj. Prva stopnja temelji na nevronske mreži, ki iz zaporedij težke in lahke verige napoveduje strukture variabilne regije protitelesa,

pri čemer kot vhodni podatek potrebuje le aminokislinski zaporedji obeh verig. Druga stopnja temelji na protokolu programskega orodja Rosetta, ki na podlagi napovedi nevronske mreže izdelata tridimenzionalno strukturo variabilne regije protitelesa [25].

Metode DeepAb so zaradi dvostopenjske napovedi razmeroma počasne (približno 10 minut na zaporedje), ne omogočajo zanesljive ocene kakovosti napovedi in ne vključujejo podatkov iz podobnih že znanih struktur. Leta 2022 je bil razvit hiter in natančen model za napovedovanje struktur protiteles IgFold. IgFold temelji na naučenih predstavitev (*angl.* embeddings) iz predhodno natreiranega jezikovnega modela AntiBERTy, ki jih uporablja za neposredno napovedovanje tridimenzionalnih atomskih koordinat. Strukture, ki jih model generira, so opremljene tudi z oceno natančnosti na ravni posameznih aminokislinskih ostankov. IgFold dosega primerljivo natančnost z drugimi specializiranimi modeli za napovedovanje struktur protiteles in se pri določenih nalogah modeliranja protiteles približa najsodobnejšim pristopom, vključno z AlphaFold-Multimer [26].

Tudi zbirka modelov globokega učenja ImmuneBuilder, ki vključuje ABodyBuilder2, NanoBodyBuilder2 in TCRBuilder2, je namenjena hitremu in natančnemu napovedovanju struktur proteinov imunskega sistema. Podobno kot IgFold tudi modeli iz ImmuneBuilder na podlagi aminokislinskega zaporedja napovedujejo tridimenzionalno strukturo proteina, vendar je ImmuneBuilder zasnovan kot celovit paket specializiranih orodij za različne tipe imunskih receptorjev. V primerjavi z IgFold model ABodyBuilder2 generira fizikalno bolj realistične strukture z manjšim številom steričnih trkov (*angl.* clashes) in nepravilnih cis-peptidnih vezi [27].

Pri razvoju in optimizaciji protiteles ima pomembno vlogo tudi napovedovanje interakcij med proteini in njihovimi tarčami, saj sta afiniteta in specifičnost vezave ključni lastnosti terapevtskih protiteles. Med vodilnimi splošnimi modeli za načrtovanje vezavnih proteinov sta AlphaProteo [28] in BindCraft [29]. V nasprotju s prej opisanimi metodami, ki napovedujejo tridimenzionalno strukturo protitelesa iz njegovega aminokislinskega zaporedja, AlphaProteo in BindCraft uporabljata informacije o tarčnem proteinu za načrtovanje novih zaporedij vezavnih proteinov, ki naj bi se nanj vezali z visoko afiniteto.

BindCraft je avtomatizirana platforma za de novo načrtovanje vezavnih proteinov, ki uporablja model AlphaFold2-Multimer za sočasno optimizacijo zaporedja, strukture in vezave na tarčni protein. Nastali kandidati se dodatno optimizirajo z modelom MPNNsol in modelom globokega učenja za napovedovanje topnosti proteinov ter ovrednotijo z modelom AlphaFold2 monomer [29].

Tudi AlphaProteo temelji na generativnem modelu umetne inteligence, ki je bil naučen na podlagi strukturnih in zaporednih podatkov iz zbirke Protein Data Bank (PDB) ter nabora napovedi modela AlphaFold. Kot vhodni

podatek prejme strukturo tarčnega proteina, generativni model pa na tej osnovi izdelata tridimenzionalno strukturo in aminokislinsko zaporedje kandidata za vezavni protein, namenjen temu ciljnemu proteinu. Ker model ustvari veliko kandidatov, se ti dodatno ovrednotijo s filtrirnim modelom, ki napoveduje verjetnost eksperimentalnega uspeha in izbere najobetavnejše kandidate za nadaljnje eksperimentalno preverjanje [28].

Uporaba strojnega učenja pri optimizaciji afinitete protiteles

Afiniteta vezave je povezana s prosto energijo vezave (ΔG), ki opisuje termodinamično ugodnost interakcije med proteinoma. Razviti so bili različni računalniški modeli, ki napovedujejo, kako posamezna mutacija vpliva na vezavno energijo med dvema proteinoma. Ti modeli primerjajo mutirane različice z divjim tipom proteina in ocenijo spremembo vezavne proste energije ($\Delta\Delta G$), s čimer omogočajo identifikacijo mutacij, ki lahko izboljšajo afiniteto vezave. Takšni pristopi so posebej pomembni pri optimizaciji protiteles, pri čemer je cilj izboljšati vezavno afiniteto protitelesa na antigen. Primer takšnega modela je GeoPPI, ki je sestavljen iz dveh glavnih komponent: modula za predstavitev geometrijskih značilnosti in modela gradientnega ojačevanja dreves. Obe komponenti skupaj omogočata napoved vpliva mutacij na vezavno afiniteto med proteini [30].

Model GGL-PPI proteinske komplekse predstavi kot grafe na atomski ravni in uporablja večnivojske geometrijske podgrafe, ki zajemajo lokalno strukturno ter kemijsko okolje mest vezave in mutacij. Na podlagi teh značilk se nato učijo modeli strojnega učenja, ki se uporabljajo za napovedovanje vrednosti $\Delta\Delta G$ [31].

Novejši model USP-ddG napoveduje spremembo vezavne proste energije s pomočjo treh komponent. Najprej uporabi ProteinMPNN, ki ocenjuje verjetnost posameznih aminokislinskih ostankov na podlagi tridimenzionalne strukture proteina. To informacijo model uporabi pri napovedovanju vpliva mutacij. Druga komponenta se osredinja na napovedovanje sprememb $\Delta\Delta G$ z uporabo energijskih značilk modela FoldX, kar modelu omogoča upoštevanje energijskih in termodinamskih lastnosti proteinov. Zadnja komponenta pa uporablja izboljšano različico modela CATH-ddG, ki pri napovedi upošteva proteinsko zaporedje in tridimenzionalno strukturo. [32]

Uporaba strojnega učenja pri optimizaciji termostabilnosti protiteles

Poleg afinitete in specifičnosti vezave pomemben vidik optimizacije terapevtskih protiteles predstavljajo tudi njihove fizikalno-kemijske lastnosti, med katere sodi tudi termostabilnost, ki pomembno vpliva na stabilnost protiteles med shranjevanjem ter na zahtevnost proizvodnih in bioprocenih postopkov. AbMelt je primer modela, ki združuje večtemperaturne molekularno-dinamične (MD)

simulacije in strojno učenje za napoved eksperimentalnih meritev termostabilnosti protiteles. Kot vhodni podatek prejme variabilni del protitelesa in izvede tri MD-simulacije pri različnih temperaturah (300, 350 in 400 K). Na podlagi dobljenih trajektorij izračuna strukturne in dinamične deskriptorje, ki jih nato model strojnega učenja uporabi za napoved ključnih termostabilnostnih parametrov, kot so temperatura agregacije (T_{agg}), začetek taljenja ($T_{m,on}$) in temperatura taljenja (T_m) [33].

Uporaba strojnega učenja pri optimizaciji imunogenosti protiteles

Zmanjševanje imunogenosti je eden najpomembnejših ciljev pri optimizaciji terapevtskih protiteles, saj preprečuje, da bi jih imunski sistem prepoznal kot tuje in proti njim sprožil imunski odziv. Tak odziv lahko vodi do nastanka protiteles proti zdravilu (*angl.* anti-drug antibodies – ADA), kar zmanjša učinkovitost zdravila in lahko povzroči hude stranske učinke. Večina napovednih modelov analizira aminokislinske motive v zaporedju protiteles, da prepozna regije, ki bi lahko sprožile imunski odziv [14]. Eden najpomembnejših jezikovnih modelov za protitelesa je AntiBERTy. Na njegovi osnovi je bil razvit napovedni model AblmmPred, ki temelji na strojnem učenju in je namenjen napovedovanju imunogenosti terapevtskih protiteles [34].

Zaključek

Terapevtska protitelesa predstavljajo eno najpomembnejših skupin sodobnih bioloških zdravil, vendar je njihov razvoj zaradi potrebe po hkratni optimizaciji več lastnosti še vedno velik izziv. Napredek na področju strojnega učenja je močno pripomogel k pospešitvi razvoja terapevtskih protiteles, saj raziskovalcem omogoča učinkovito in hitro obdelavo velikih količin podatkov ter zmanjšuje potrebo po obsežnem eksperimentalnem testiranju. Modeli lahko v kratkem času predlagajo koristne mutacije, ocenijo specifičnost, imunogenost in afiniteto protiteles ter napovedujejo njihove tridimenzionalne strukture. S tem omogočajo zožanje nabora potencialnih kandidatov, ki se nato eksperimentalno validirajo. Kljub velikemu napredku pa tradicionalne eksperimentalne metode, kot so hibridomska tehnologija, fagni prikaz in drugi pristopi, še vedno ostajajo pomemben temelj razvoja terapevtskih protiteles. Eden ključnih izzivov sodobnih modelov strojnega učenja predstavlja večparametrna optimizacija, saj pri številnih modelih izboljšanje ene lastnosti protitelesa pogosto vodi v poslabšanje druge. Prihodnji razvoj zato zahteva modele, sposobne učinkovitega usklajevanja optimizacije več lastnosti hkrati in zanesljivih napovedi.

Področje uporabe strojnega učenja pri optimizaciji protiteles je še vedno razmeroma novo in se zelo hitro razvija. V prihodnosti lahko pričakujemo razvoj še naprednejših metod, ki bodo dodatno izboljšale natančnost napovedovanja in zmanjšale čas njihovega razvoja.

- [1] Emmons C., Hunsicker L. G. 1987. Muromonab-CD3 (Orthoclone OKT3): the first monoclonal antibody approved for therapeutic use. *Medicine Iowa*, 77, 2: 78-82
- [2] Kim S. J., Park Y., Hong H. J. 2005. Antibody engineering for the development of therapeutic antibodies. *Molecules and Cells*, 20, 1: 17-29, [https://doi.org/10.1016/S1016-8478\(23\)25245-0](https://doi.org/10.1016/S1016-8478(23)25245-0)
- [3] Sharma P., Joshi R. V., Pritchard R., Xu K., Eicher M. A. 2023. Therapeutic antibodies in medicine. *Molecules*, 28, 18: 6438, <https://doi.org/10.3390/molecules28186438>
- [4] Ihan A. 2020. Osnove medicinske imunologije. Ljubljana, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Katedra za mikrobiologijo in imunologijo.
- [5] Behring E., Kitasato S. 1890. Ueber das Zustandekommen der Diphtherie-Immunität und der Tetanus-Immunität bei Thieren. *DMW - Deutsche Medizinische Wochenschrift*, 16, 4: 1113–1114, <https://doi.org/10.1055/s-0029-1207589>
- [6] Köhler G., Milstein C. 1975. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, 256, 5517: 495–497, <https://doi.org/10.1038/256495a0>
- [7] Chames P., Van Regenmortel M., Weiss E., Baty D. 2009. Therapeutic antibodies: successes, limitations and hopes for the future. *British Journal of Pharmacology*, 157, 2: 220-33, <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2009.00190.x>
- [8] Neuberger M. S., Williams, G. T., Mitchell, E. B., Jouhal S. S. Rabbitts T. H. A hapten-specific chimaeric IgE antibody with human physiological effector function. *Nature*, 314: 268–270, <https://doi.org/10.1038/314268a0>
- [9] Jones P. T., Dear P. H., Foote J., Neuberger M. S., Winter G. 1986. Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse. *Nature*, 321, 6069: 522-525, <https://doi.org/10.1038/321522a0>
- [10] McCafferty J., Griffiths A. D., Winter G., Chiswell D. J. Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. *Nature*, 348, 6301: 552-554, <https://doi.org/10.1038/348552a0>
- [11] Boder E. T., Wittrup, K. D. 2000. Yeast surface display for directed evolution of protein expression, affinity, and stability. *Methods in Enzymology*, 328: 430–444, [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(00\)28410-3](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(00)28410-3)
- [12] Lonberg N., Taylor L. D., Harding, F. A., Trounstein M. Huszar D. 1994. Antigen-specific human antibodies from mice comprising four distinct genetic modifications. *Nature*, 368: 856–859, <https://doi.org/10.1038/368856a0>
- [13] Traggiai E., Becker S., Subbarao, K., Kolesnikova L. Lanzavecchia A. 2004. An efficient method to make human monoclonal antibodies from memory B cells: potent neutralization of SARS coronavirus. *Nature Medicine*, 10: 871–875, <https://doi.org/10.1038/nm1080>
- [14] Zheng J., Wang Y., Liang Q., Cui L., Wang L. 2024. The application of machine learning on antibody discovery and optimization. *Molecules*, 29, 24: 5923, <https://doi.org/10.3390/molecules29245923>
- [15] Wang B., Kankanamalage G. S., Dong J., Liu Y. 2021. Optimization of therapeutic antibodies, *Antibody Therapeutics*, 4, 1: 45-54, <https://doi.org/10.1093/abt/tbab003>
- [16] Gordon L. G., Raybould I. J. M., Wong A., Deane M. C. 2024. Prospects for the computational humanization of antibodies and nanobodies. *Frontiers in Immunology*, 15: 1399438, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1399438>
- [17] Harding F. A., Stickler M. M., Razo J., DuBridge R. 2010. The immunogenicity of humanized and fully human antibodies: Residual immunogenicity resides in the CDR regions. *MAbs*, 2, 3: 256–265, <https://doi.org/10.4161/mabs.2.3.11641>
- [18] Li J., Kang G., Wang J., Yuan H. Marco A. 2023. Affinity maturation of antibody fragments: A review encompassing the development from random approaches to computational rational optimization. *International Journal of Biological Macromolecules*, 247: 125733, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.125733>
- [19] Grewal S., Hegde N., Yanow S. K. 2024. Integrating machine learning to advance epitope mapping. *Frontiers in Immunology*, 15: 1463931, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1463931>
- [20] Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A., Green T. Hassabis D. 2021. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature*, 596: 583–589, <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2>
- [21] Evans R., O'Neill M., Pritzel A., Antropova N. Hassabis D. 2021. Protein complex prediction with AlphaFold-Multimer. *bioRxiv* (preprint), <https://doi.org/10.1101/2021.10.04.463034>
- [22] Baek M., DiMaio F., Anishchenko I., Dauparas J. Baker M. D. 2021. Accurate prediction of protein structures and interactions using a three-track neural network. *Science*, 373, 6557: 871–876, <https://doi.org/10.1126/science.abj8754>
- [23] Baek M., Anishchenko I., Humphreys I. R., Cong Q. DiMaio F. 2023. Efficient and accurate prediction of protein structure using RoseTTAFold2. *bioRxiv* (preprint), <https://doi.org/10.1101/2023.05.24.542179>
- [24] Ruffolo J. A., Guerra C., Mahajan S. P., Sulam J., Gray J. J. 2020. Geometric potentials from deep learning improve prediction of CDR H3 loop structures. *Bioinformatics*, 36, 1: i268-i275, <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btaa457>
- [25] Ruffolo A. J., Sulam J., Gray J. J. 2022. Antibody structure prediction using interpretable deep learning. *Patterns*, 3, 2: 100406, <https://doi.org/10.1016/j.patter.2021.100406>
- [26] Ruffolo J. A., Chu L. S., Mahajan S. P., Gray J. J. 2023. Fast, accurate antibody structure prediction from deep learning on massive set of natural antibodies. *Nature Communications*, 14: 2389, <https://doi.org/10.1038/s41467-023-38063-x>
- [27] Abanades B., Wong W. K., Boyles F., Georges G. Deane C. M. 2023. ImmuneBuilder: Deep-learning models for predicting the structures of immune proteins. *Communications Biology*, 6: 575, <https://doi.org/10.1038/s42003-023-04927-7>
- [28] Zambaldi V., La D., Chu A. E., Patani H. Wang J. 2024. De novo design of high-affinity protein binders with AlphaProteo. *Nature*, 646, 8084: 483-492, <https://doi.org/10.48550/arXiv.2409.08022>
- [29] Pacesa M., Nickel L., Schellhaas C., Schmidt J. Correia E. B. 2025. One-shot design of functional protein binders with BindCraft. *Nature*, 646: 483–492, <https://doi.org/10.1038/s41586-025-09429-6>
- [30] Liu X., Luo Y., Li P., Song S., Peng J. 2021. Deep geometric representations for modeling effects of mutations on protein-protein binding affinity. *PLOS Computational Biology*, 17, 8: e1009284, <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1009284>
- [31] Rana M. M., Nguyen D. D. 2023. Geometric graph learning to predict changes in binding free energy and protein thermodynamic stability upon mutation. *The Journal of Physical Chemistry Letters*, 14, 29: 10870-10879, <https://doi.org/10.1021/acs.jpclett.3c02679>
- [32] Guanglei Y., Xuehua B., Qichang Z., Jianxin W. 2026. USP-ddG: a unified structural paradigm with data efficacy and mixture-of-experts for predicting mutational effects on protein–protein interactions. *Bioinformatics*, 42, <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btag249>
- [33] Rollins Z. A., Widatalla T., Cheng A. C., Metwally E. 2024. AbMelt: Learning antibody thermostability from molecular dynamics. *Biophysical Journal*, 123, 17: 2921–2933, <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2024.06.003>
- [34] Wang H., Hao X., He Y., Fan L. 2024. AblmmPred: An immunogenicity prediction method for therapeutic antibodies using AntiBERTy-based sequence features. *PLOS ONE*, 19, 2: e0296737, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0296737>

NEVRONSKE MREŽE in RAČUNALNIŠKI VID

za klasifikacijo bakterijskih kolonij

Luka Bonin¹, Tina Kvasič¹, Nejc Pelko¹

¹ Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije, Jamnikarjeva 101, 1000 Ljubljana

Ključne besede: globoko učenje, nevronske mreže, računalniški vid, klasifikacija bakterijskih kolonij, hiperspektralno slikanje

IZVLEČEK

Uporaba metod globokega učenja na področju biotehnologije in mikrobiologije v zadnjih letih izrazito narašča, zlasti pri avtomatizaciji analize mikrobioloških vzorcev. Tradicionalne metode klasifikacije bakterijskih kolonij temeljijo na vizualni interpretaciji izkušenih mikrobiologov, kar je časovno potratno, drago in lahko tudi subjektivno. Alternativa predstavlja uporaba metod računalniškega vida in globokega učenja, med katerimi za samodejno detekcijo, štetje in za klasifikacijo bakterijskih kolonij prevladujejo konvolucijske nevronske mreže ter objektno-detekcijska modela Faster R-CNN in YOLO. Sodobni modeli dosegajo visoko klasifikacijsko točnost in robustno detekcijo kolonij v raznolikih eksperimentalnih pogojih, glavne omejitve pa predstavljajo variabilnost pogojev fotografiranja, pomanjkanje standardiziranih učnih množic in oteženo posploševanje med laboratorijskimi okolji. Na tekmovanju RIS 2026, na katerem je bila naloga klasifikacija osmih vrst mikrobnih kolonij, je naš model na osnovi 1D-CNN arhitekture s hiperspektralnimi slikami dosegel 94,6-odstotno klasifikacijsko točnost, pri čemer je glavno omejitev predstavljala majhnost učne množice, ki je zahtevala močno bogatenje podatkov.

Uvod

Določanje bakterijskih vrst je eden temeljnih postopkov mikrobiološke diagnostike v kliničnem okolju ter pri nadzoru kakovosti v prehrabni in farmacevtski industriji. Postopek še danes v veliki meri temelji na vizualnem pregledu kolonij na agarških gojiščih, kar zahteva izkušenega mikrobiologa in precej časa, hkrati pa rezultat ni vedno enoznačen. Računalniški vid in nevronske mreže omogočajo mogočo alternativo, saj lahko z njimi pripravimo model, ki je zmožen samostojne klasifikacije kolonij in v določenih primerih tudi odprave človeške napake [1], s čimer lahko pospešimo rutinske analize. V tem članku najprej predstavimo teoretične osnove strojnega učenja in nevronske mreže ter pregled njihove uporabe v (mikro) biologiji, nato pa te koncepte ponazorimo na praktičnem primeru razvoja modela za klasifikacijo osmih vrst bakterijskih kolonij v okviru tekmovanja RIS 2026.

Kaj je strojno učenje?

Strojno učenje se od klasičnega programiranja razlikuje po tem, kako nastanejo pravila delovanja. Pri klasičnem programiranju jih človek napiše sam, pri strojnem učenju pa jih model izlušči iz primerov podatkov, ki mu jih predstavimo. Nadzorovano učenje predstavlja obliko učenja modela, pri čemer modelu prikažemo označeno učno množico,

on pa se na podlagi njih nauči povezave med vhodnimi informacijami in pravilnim odgovorom [2]. Označena učna množica predstavlja skupino podatkov s pravilnimi odgovori, ki modelu omogočijo učenje.

Strojno učenje je splošno uporabno orodje, ki se ne uporablja le v mikrobiologiji, ampak tudi v medicinski diagnostiki, analizi bioloških slik, odkrivanju zdravil, rekonstrukciji možganskega vezja in na veliko drugih področjih [3–5].

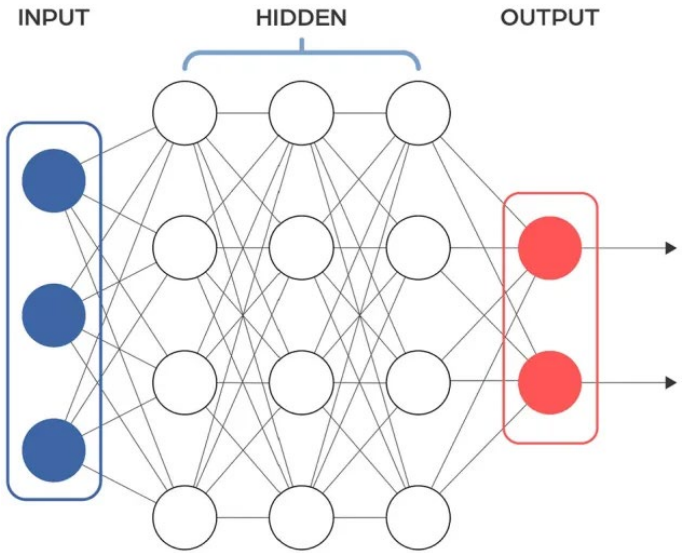
Nevronske mreže in njihovo delovanje

Nevronske mreže so računalniški modeli, sestavljeni iz med seboj povezanih plasti umetnih nevronov, ki obdelujejo informacije, se učijo in sprejemajo odločitve [5]. Osnovna enota mreže je nevron, ki prejme vhodne vrednosti, uteži zmnoži z vrednostmi in izračuna izhod. Uteži mu povedo, kako pomemben je posamezen vhod. Nevronska mreža je sestavljena iz več zaporednih plasti (slika 1). Vhodna plast sprejme vhodne vrednosti, vsakemu nevronu pa je pripisana ena vrednost, kot je vrednost piksla v sliki ali beseda v stavku. Skrite plasti se nahajajo med vhodno in izhodno plastjo, njihova naloga pa je obdelava in transformacija vhodnih podatkov ter ugotavljanje njihovega medsebojnega odnosa. Izhodna plast ustvari končni odgovor, kot je na primer razlikovanje med bolnimi in zdravimi pacienti,

na podlagi profila njihovega mikrobioma [5].

Aktivacijske funkcije, ki so del nevronov, so matematične funkcije, ki odločajo o aktivaciji posameznega nevrona in s tem izračunajo, kakšna vrednost se bo prenesla. Primer aktivacijske funkcije predstavlja ReLU (*angl.* Rectified Linear Unit), ki prenaša pozitivne vhodne vrednosti, negativnim vrednostim pa pripiše ničlo [5].

Analogija aktivacijske funkcije: V mikrobiološkem laboratoriju uspešne kolonije subkultiviramo, medtem ko neuspešne kolonije in kontaminacije ne prenesemo naprej. Rezultat njihove nadaljnje kultivacije je prazna plošča.



Slika 1: Primer tipične zgradbe nevronske mreže. Vhodna plast prejme informacije, ki jih skrite plasti obdelajo in nato izločijo skozi izhodno plast. Povzeto po [5].

Nevronska mreža se uči, tako da po vsakem primeru izračuna oziroma izve, kako močno se je zmotila glede na pravilno vrednost. Pri tem algoritem uporabi vzvratno razširjanje napake, ki z gradientnim spustom popravlja uteži. Ta postopek se ponovi tolikokrat, kolikor je potrebno, da se uteži ustalijo pri vrednostih, ki dajo dobre napovedi [6]. Funkcija izgube je merilo, s katerim mreža izvede oceno napake, na podlagi katere pozneje spremeni uteži. Pri učenju mreže se lahko uravnava tudi hitrost učenja, ki določa, kako velike korake mreža dela pri popravljanju uteži. Prevelik korak lahko povzroči preskok optimalne rešitve, premajhni koraki pa upočasnjujejo učenje. Hitrost učenja se uravnava z razporejevalnikom učenja, tako da na začetku to poteka hitreje, proti koncu pa počasneje [7]. Med učenjem se mreža uči tako, da gre večkrat čez celotno množico učnih podatkov. En pregled skozi celotno učno množico podatkov imenujemo epoha. Pri učenju gre model običajno skozi več deset epoh, da uteži konvergirajo proti pravi rešitvi. Dva problema, s katerima se mreža lahko sooča med učenjem, sta pomanjkljivo in prekomerno prilagajanje. Do pomanjkljivega prilagajanja pride, ko

se model uči na preveč raznolikih preprostih podatkih in ni zmožen prepoznati vzorcev. Temu se lahko izognemo z uporabo kompleksnejšega modela, več epoh in z dodajanjem novih vhodnih signalov. Do prekomernega prilagajanja pa pride, ko se mreža na pamet nauči podatke v učni množici in ni zmožna pravilno prepoznati novih neznanih podatkov. Prekomernega prilagajanja se izognemo z zmanjšanjem kompleksnosti modela, regularizacijo in z zbiranjem več učnih podatkov [8].

Analogija prilagajanj: Predstavljajmo si dva študenta, ki se pripravljata na izpit. Prvi se je učil iz enega samega prelahkega učbenika in ni usvojil dovolj snovi, da bi razumel težja vprašanja. To je podobno pomanjkljivemu prilagajanju, pri katerem model ni »videl« dovolj kompleksnih primerov, da bi prepoznal vzorce. Drugi se je na pamet naučil izključno vprašanja iz starih izpitov, ne da bi razumel snov v ozadju. Ta bo na znana vprašanja odgovoril odlično, pri novih, drugače zastavljenih vprašanjih pa se bo zmotil. To je podobno prekomernemu prilagajanju, pri katerem se model »na pamet« nauči učnih podatkov, namesto da bi se naučil splošnih zakonitosti.

Priprava in vrednotenje podatkov

Pri učenju našega modela je zelo pomembno, kako oblikujemo podatke, ki jih modelu podamo. Učna množica podatkov mora biti dovolj velika in kakovostno označena. Slaba kakovost učne zbirke podatkov lahko vodi v slabše posploševanje, ne glede na arhitekturno zasnovo mreže [5]. Če delamo s premajhno količino podatkov v učni zbirki, je te treba obogatiti. To pomeni, da umetno povečamo količino učnih podatkov, tako da obstoječe spremenimo s tem, da jih obračamo, obrezujemo, spreminjamo osvetlitev ali drugače, s poudarkom na ohranjanju bistvenega pomena [9]. Ko imamo pripravljeno celotno učno zbirko podatkov, te ločimo na učne, validacijske in na testne podatke. Učni del je uporabljen za učenje uteži, validacijski del med učenjem preverja, kako model deluje na podatkih, ki jih ni videl, testni del pa je uporabljen za končno oceno uspešnosti modela. Za zanesljivejšo oceno uspešnosti in boljšo izrabo podatkov se pri tem uporabi prečno preverjanje. Najpogostejša oblika je k-kratno prečno preverjanje (*angl.* k-fold cross-validation). Pri tem se podatke razdeli na k enako velikih delov (foldov), model pa na teh podatkih učimo k-krat. Pri vsakem krogu je večji del podatkov uporabljen kot učna množica, en del pa služi kot testni del [10]. Če uporabimo 5-kratno, to pomeni, da podatke razdelimo na 5 enakih delov in model učimo petkrat. Pri tem štirje deli služijo kot učna množica, peti pa kot testni del. Med učenjem se deli v vsakem krogu zamenjajo, tako da na koncu dobimo pet ocen uspešnosti. To omogoči zanesljivejšo oceno, saj model preverimo na celotni množici podatkov. Poleg tega lahko delitev izboljšamo s stratifikacijo, ki omogoči, da vsak del vsebuje enak delež iz vsakega razreda podatkov [10].

Analogija stratifikacije: Pri anketi javnega mnenja bi poskrbeli, da vsak vzorčni okoliš vsebuje enak delež mestnega in podeželskega prebivalstva kot celotna država. Če bi po naključju en vzorec zajel samo mestno prebivalstvo, bi bili rezultati te ankete zavajajoči, čeprav bi bila metodologija sicer pravilna.

Od polno povezanih nevronske mreže do konvolucijskih nevronske mreže

Polno povezana nevronska mreža je osnovna oblika nevronske mreže, pri čemer je vsak nevron ene plasti povezan z vsemi nevroni naslednje plasti. Problem pri takih mrežah je, da večemo en nevron na en podatek (piksel slike, valovna dolžina spektra in podobno), kar hitro pripelje do prevelikega števila uteži ter posledično negativno vpliva na hitrost učenja in prilagajanja. Poleg tega taka mreža ni sposobna upoštevati dejstva, da so sosednji podatki med seboj povezani. Tukaj pridemo do konvolucije, ki z uporabo filtra omogoči, da vsak nevron gleda le delež slike namesto celotne slike naenkrat. Filter drsi čez sliko in vsakič zajame le majhen lokalni del, kar imenujemo lokalna povezanost. Na vsakem položaju filter izračuna eno vrednost, ki predstavlja informacijo, kako se lokalni vzorec pod filtrom ujema s tistim, kar filter »išče« (prehod iz svetle v temno, navpičen rob in podobno). Ko filter opravi pregled celotne slike oziroma podatka, dobimo sliko značilk, ki pove, kje se te vrednosti pojavijo na izvirni sliki ali podatku [11].

Analogija konvolucij: Ko gledamo preparat skozi objektiv mikroskopa, kot filter uporabimo eno izmed povečav in se sistematično premikamo skozi celoten preparat. Pri tem iščemo določene lastnosti, kot so specifičen rob, specifična barva in podobno.

Seveda pa konvolucija ni omejena na dvodimenzionalne slike, ampak jo lahko uporabimo tudi na enodimenzionalnih signalih. Pri tem filter namesto dveh osi drsi vzdolž ene, na primer vzdolž valovnih dolžin spektra pri hiperspektralnih podatkih [12].

Kaj so klasifikacija, detekcija in segmentacija primerkov?

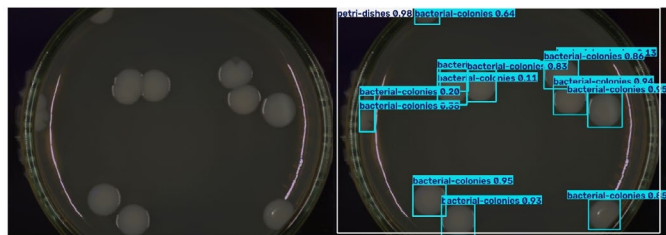
Na področju računalniškega vida se za obdelavo in razvrščanje slik uporabljajo trije različni načini: klasifikacija, detekcija in segmentacija primerkov (slika 2). Ti trije načini se razlikujejo v tem, kako podrobno opišejo dano sliko. Najbolj »površni« so klasifikacijski modeli, ki nam po pregledu slike povedo le, kaj na sliki je. Vrnejo nam eno ali več oznak, ki se modelu zdijo najustreznejše [4, 13].



Slika 2: Grafična ponazoritev razlik med klasifikacijo, detekcijo in segmentacijo primerkov (rdeče – bakterijska kolonija; modro – petrijevka)

Naslednjo stopnjo informativnosti nam dajo detekcijski modeli, ki povedo, kateri objekti so na sliki in na katerih pozicijah se nahajajo. Eden izmed načinov vizualizacije delovanja modelov je izris očitanih okvirov (*angl.* bounding box), ki označuje položaj in velikost objekta ter ga hkrati razvrsti v razred, ob tem pa doda še stopnjo zaupanja (slika 3). Takšni modeli lahko torej zaznajo več enakih ali različnih objektov na isti sliki, a oblika vseeno ostane groba (pravokotnik) [4].

Najvišjo informativnost pa nam nudijo modeli za segmentacijo primerkov, ki pogledajo vsak piksel slike in mu določijo pripadnost določenemu objektu ali ozadju. Tako dobimo najbolj natančen obris objekta. Seveda pa višja informativnost pomeni tudi večjo delovno zahtevnost in daljši čas obdelave [13].



Slika 3: Primer slike bakterijskih kolonij pred detekcijo objektov (levo) in po njej (desno). Številke ob razredu objektov opisujejo prepričanost pravilne napovedi oz. stopnjo zaupanja (od 0 do 1).

Modeli za detekcijo objektov

Med najbolj uveljavljenimi arhitekturami za detekcijo je t. i. Faster R-CNN (*angl.* Faster Region-based Convolutional Neural Network, prevedeno hitrejša konvolucijska nevronska mreža na osnovi regij). Arhitektura uporablja dvostopenjski pristop; v prvem koraku posebna mreža predlaga potencialna območja objektov, v drugem koraku pa model območja klasificira in natančno določi meje [14]. Zaradi takšne zasnove Faster R-CNN navadno dosega visoko točnost, je pa po drugi strani računsko zahtevnejši in počasnejši od novejših enostopenjskih modelov.

Alternativo predstavlja skupina modelov YOLO (*angl.* You Only Look Once, prevedeno »pogledaš samo enkrat«), ki detekcijo in klasifikacijo objektov izvede samo v enem koraku, brez predlaganja potencialnih območij. Takšna arhitektura omogoča bistveno hitrejšo obdelavo slik in lažjo uporabo za namene detekcije v realnem času. Slabost arhitekture pa je njena nekoliko manjša točnost pri detekciji zelo majhnih ali gosto razporejenih objektov [1, 15].

V zadnjih letih pa so se tudi modeli YOLO močno izboljšali – razlika v natančnosti med eno- in dvostopenjskimi modeli postaja vse manjša [1]. Izbira ustrezne arhitekture je zato odvisna predvsem od namena uporabe.

Podatkovne množice

Kot že omenjeno, je uspešnost modelov globokega učenja v veliki meri odvisna od kakovosti in velikosti učnih podatkov. Model se namreč detekcije ne uči iz učbenikov ali kakšnih drugih virov, ampak izključno na podlagi vhodnih podatkov oz. slik. Velike, raznolike in natančno označene podatkovne množice so zato ključnega pomena za razvoj zanesljivih in robustnih modelov [1, 4].

Ena izmed najpomembnejših javno dostopnih množic za razvoj modelov detekcije bakterijskih kolonij je množica AGAR (*angl.* Annotated Germs for Automated Recognition, prevedeno »označeni mikrobi za avtomatizirano detekcijo«). V množico je vključenih več kot 18 tisoč slik z več kot 330 tisoč označenimi kolonijami štirih predstavnic bakterij in ene predstavnice kvasovk na različnih gojiščih [4].

Izzivi in omejitve v mikrobiologiji

Kljub hitremu napredku umetne inteligence in nevronske mreže ostaja njihova uporaba v mikrobiologiji povezana s številnimi izzivi. Eden izmed največjih je velika variabilnost pogojev fotografiranja. Razlike med kamerami, osvetlitvijo in ločljivostjo slik ter vrstami gojišč, starostjo kolonij, števnostjo plošč in potencialnih okužb ali kokultur lahko pomembno vplivajo na videz kolonij ter posledično zmanjšajo napovedno točnost modela [1, 16].

Pomemben izziv predstavljata tudi posploševanje modelov in prenos v druge laboratorije. Model, ki dosega odlične rezultate pri analizi slik iz enega laboratorija, lahko pri analizi drugih slik napoveduje bistveno slabše zaradi razlik v pripravi vzorcev ali zajemu slik. Izdelava lastne učne množice pa je izjemno časovno zahtevna, saj ne zahteva samo veliko ročnega dela v laboratoriju z gojenjem kolonij, ampak tudi za računalnikom pri označevanju slik [16]. Zato raziskovalci namenjajo vse več pozornosti vzpostavitvi bolj raznolikih podatkovnih množic in ustreznim metodam bogatenja [1].

Še zadnji večji izziv pred vpeljavo sistemov za samodejno določanje kolonij v rutinsko diagnostiko pa predstavlja vzpostavitev sistema za ustrezno validacijo in skladnost z regulativnimi zahtevami. Modeli morajo izkazati primerljive rezultate z ocenami izkušenih mikrobiologov in šele takrat bo lahko postala umetna inteligenca pomembna podpora pri vsakodnevnem delu mikrobioloških laboratorijev.

Praktični primer klasifikacije mikrobnih kolonij

V tem delu članka se bomo iz splošne teorije o nevronske mrežah in njihovi uporabni vrednosti v biologiji premaknili na praktičen primer uporabe računalniškega vida za detekcijo in določitev vrste bakterijskih kolonij, na katerem smo delali v okviru tekmovanja RIS. Tekmovanje v razvoju novih analitskih metod v medicini je vsakoletni dogodek, ki ga organizirata Društvo matematikov, fizikov in astronomov Slovenije (DMFA) ter programska skupina Medicinska fizika UL FMF. Osrednja tema letošnjega tekmovanja je bila segmentacija in klasifikacija bakterijskih kolonij s pomočjo računalniškega vida.

Cilj obeh krogov tekmovanja je bil enak, tj. vsaki sliki dodeliti pravilno oznako vrste bakterije. V prvem krogu smo za lociranje posameznih kolonij na RGB-sliki uporabili YOLO-seg, tj. model za segmentacijo primerkov, ki za vsako zaznano kolonijo predlaga točen okvir, razred in stopnjo zaupanja. Te posamezne detekcije smo nato združili v eno samo klasifikacijsko odločitev za celotno sliko. V drugem krogu smo prejeli hiperspektralne slike, pri katerih

je ločitev kolonije od agarja že izvedel organizator tekmovanja; naša naloga je bila zato izključno klasifikacija, brez potrebe po lastni detekciji ali segmentaciji.

Kako se sploh lotiti označevanja kolonij?

V prvem krogu tekmovanja je bila naša naloga, da smo iz barvnih slik petrijevk pripravili model, ki je bil zmožen ločevanja med osmimi bakterijskimi vrstami, kontaminacijami in praznimi petrijevskami. Odločili smo se, da bomo delali v programskem jeziku Python. Ker je (dobro) delovanje modela zelo pogojeno z vhodnimi podatki, smo se kot ekipa odločili, da bomo ročno označili vsako posamezno kolonijo, kot je prikazano na sliki 3. Pri tem smo se odločili za poligonsko označevanje COCO, saj nam to omogoča natančen zajem oblike kolonije in pozneje služi kot eden izmed pomembnih faktorjev pri segmentaciji. Oznake, ki so definirale obliko vsake kolonije na sliki, smo pretvorili iz univerzalnega zapisa COCO (poligoni v absolutnih pikslih) v zapis YOLO, ki ga uporablja naš model s koordinatami, normaliziranimi med 0 in 1.

Bogatenje podatkov

Preden smo lahko začeli bogatiti podatke, smo se spoprijeli z neenakomerno razporeditvijo po vrstah in z zelo majhnim vzorcem razredov bakterijskih kolonij. Celoten vzorec je bil sestavljen iz 85 slik petrijevk, pri čemer so imele določene vrste samo štiri slike, ena pa celo 21. Za model to ni nepomembna podrobnost. Kot smo omenili v teoretičnem delu, se pri premajhnem in neuravnoteženem učnem vzorcu model namesto splošnih vzorcev hitreje prilagodi šumu in naključnim posebnostim konkretnih primerov, kar poslabša posploševanje na testnih slikah, ki jih model med učenjem ni videl. Ta problem smo reševali z bogatenjem. V našem primeru smo slike rotirali, dodajali ter odvezemali svetlost in kontrast, dodajali šum in zameglili slike, dokler iz 85 slik petrijevk nismo dobili več kot 3.000 slik kolonij, ki so bile zdaj izenačene po razredih.

Učenje modela in določevanje kolonij

Po pripravljenih vhodnih podatkih smo se lahko lotili učenja modela na Arnesovem superračunalniku, do katerega smo imeli dostop med tekmovanjem. Kot model smo uporabili model YOLOv8x-seg podjetja Ultralytics, razvitega za hitro detekcijo objektov na slikah. Pripona -seg označuje segmentacijsko različico modela, ki namesto da bi samo označil pravokotni okvir okrog detektiranega objekta, za vsak detektiran objekt napove natančno obliko. To je bilo za naš problem ključno, saj so bakterijske kolonije nepravilnih, okroglih oblik različnih velikosti in bi pravokotni okvir poleg kolonije nujno zajel tudi del okoliškega agarja, kar bi model motilo pri učenju značilk posamezne vrste. Učenje je potekalo 100 epoh pri velikosti slike 640 x 640 pikslov in pri velikosti paketa 8. Podatki so bili razdeljeni 70 % za učenje, 15 % za validacijo in 15 % za testiranje; enako je bilo v drugem krogu. Podatki za testiranje so uporabljeni izključno za testiranje končne uspešnosti, medtem ko so podatki za validacijo igrali ključno vlogo pri sprotnem prilagajanju modela.

Napoved vrste bakterijskih kolonij je temeljila na detekciji kolonij, za katere je imela nevronska mreža določeno stopnjo zaupanja (*angl.* confidence), kot je prikazano na sliki 3. Nato smo za vsak razred sešteli vrednosti zaupanja vseh detekcij in izbrali razred z najvišjo vsoto, kar je bila potem naša napoved. Če ni bilo detektiranih kolonij, je to pomenilo, da je petrijevka prazna.

Rezultati prvega kroga

Na novih podatkih se je naš model izkazal z 38,0 % klasifikacijsko točnostjo, kar je skoraj 3,5-krat več, kot če bi se odločal naključno, vendar veliko manj kot izkušen strokovnjak za to področje. Menimo, da je bila ena izmed glavnih omejitev, kot že prej opisano, majhnost in nereprezentativnost vzorca ter omejena količina podatkov, ki jih lahko nevronska mreža izlušči iz slike. Tak primer je blešč kolonij pod svetlobo, ki ga je človek zmožen »odmisлити«, medtem ko ga nevronska mreža obravnava kot enakovredno informacijo.

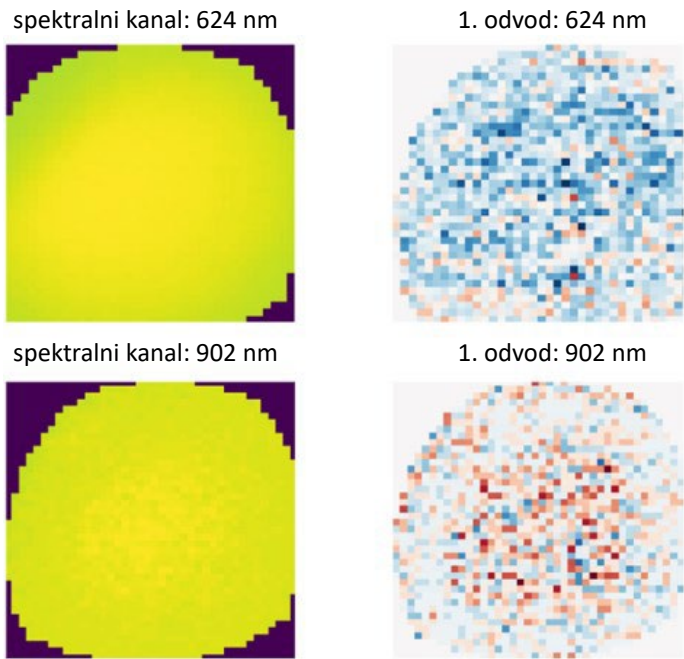
Kaj je hiperspektralno slikanje?

Hiperspektralno slikanje je neinvazivna tehnika, ki za vsak slikovni element (piksel) zajame zvezen spekter odbite svetlobe v velikem številu ozkih spektralnih pasov, s čimer združuje prostorsko in spektralno informacijo [17]. V našem primeru je bil razpon valovnih dolžin od 450 do 950 nm, zajet v 184 spektralnih kanalih s povprečnim korakom približno 2,7 nm, kar nam omogoča, da lahko analiziramo razlike v optičnih lastnostih materialov, ki se nahajajo tudi zunaj našega vidnega polja. Metoda nudi visoko ločljivost, zaradi česar se uveljavlja na področjih bioloških ali okoljskih znanosti [17].

Predobdelava hiperspektralnih podatkov

Za učenje modelov smo pridobili 659 segmentiranih slik bakterij osmih različnih vrst. Podobno kot v prvem delu tekmovanja smo tudi zdaj namenili očitni del časa predobdelavi slik. V prvem koraku smo ohranili samo piksele z vrednostjo večjo od -0,5, saj smo tako ločili kolonijo od agarja, preostale vrednosti pa omejili na razpon [0–1,5], saj prava reflektanca ne more biti negativna, obenem pa zgornji rob prepreči obstoj osamelcev, ki bi lahko popačili nadaljnjo normalizacijo. Ker je oblika kolonije elipsasta, je signal kolonije proti njenemu robu sestavljen iz večjega dela podlage. Da bi izolirali signal kolonije brez šuma ozadja, smo se poslužili rezanja roba kolonij, ki smo ga izvedli z zavrženjem pikslov, katerih vsota vrednosti signala čez vse valovne dolžine (integral spektra) pade pod 10. percentil vseh vsot. Temu je sledila normalizacija SNV (*angl.* Standard normal variate), katere učinek je bil, da smo prešli iz absolutnih reflektanc piksla na relativna razmerja med valovnimi dolžinami, zaradi česar postanejo oblike spektrov pomembnejše kot sama vrednost signala. Za tem smo izračunali približek prvega odvoda spektra vzdolž valovnih dolžin z metodo centralnih diferenc, ki je v CNN poleg normaliziranega spektra služil kot drugi vhodni kanal. Odvod poudari lokalne spremembe med sosednjimi valovnimi dolžinami, zaradi česar je model poleg absolutne oblike

spektra prejel še informacijo o hitrosti njegovega spreminjanja, kar je prispevalo k bolj informativnemu vходу za lažje razlikovanje med razredi (slika 4). Podatke smo bogatili z izpadom naključnih spektralnih kanalov, dodajanjem spektralnega šuma in z blago sinusno popačitvijo spektra. Ključni korak pa je bilo vzorčenje 1.500 naključnih pikslov iz vsake kolonije, saj je tako vsaka slika namesto enega samega povprečnega spektra prispevala do 1.500 ločenih učnih primerov, ki si delijo isto oznako, kar je učno množico iz nekaj sto slik razširilo na več sto tisoč pikseljskih spektrov. Poleg tega smo med učenjem vsakemu paketu podatkov ob vsakem koraku dodali šibek Gaussov šum, kar je delovalo kot dodatna oblika bogatenja podatkov.



Slika 4: Spektralni kanal hiperkocke bakterijske kolonije pri dveh izbranih valovnih dolžinah (624 nm in 902 nm). Na levi je prikazana surova reflektanca, pri čemer temno vijolični vogali predstavljajo maskirano okolico kolonije. Na desni pa je prikazana pripadajoča vrednost prvega odvoda pri isti valovni dolžini, pri čemer modra barva nakazuje negativen naklon spektra, rdeča pa pozitivnega.

Arhitektura modela

Pot do končne arhitekture ni bila neposredna. Najprej smo preizkusili naključni gozd na povprečnem spektru kolonije in nato ResNet34 s prilagojenim vhomom, a nobeden izmed pristopov ni bil dovolj natančen. Iz teh neuspehov se je porodila ideja: namesto cele kolonije naenkrat poskusimo klasificirati posamezne piksele. Na podlagi prejšnjih pristopov smo se odločili za vzorčenje 1.500 naključnih pikslov bakterijske kolonije, če jih je imela manj, pa smo vzorčili isti piksel večkrat, dokler nismo nabrali 1.500 vzorcev. Model za vsak piksel prejme dva kanala, enega za spekter SNV, drugega za njegov prvi odvod. Namesto dvodimenzionalne konvolucije, ki smo jo uporabili pri analizi slik, tukaj uporabimo enodimenzionalno konvolucijo, pri kateri filter drsi vzdolž valovnih dolžin spektra enega piksla. Število filtrov se skozi zaporedne konvolucijske plasti večja (64 → 128 → 256 → 512), kar ustrezno poveča

tudi globino aktivacijskega volumna po vsaki plasti, zaradi česar lahko vsaka naslednja plast zazna še kompleksnejše vzorce v spektru. Po vsaki plasti sledi združevalna plast z maksimizacijo, ki zmanjša dolžino zaporedja z izborom najmočnejših signalov, to pa poskrbi, da se nevronska mreža osredinja le na najizrazitejše značilke. Poleg tega uporabimo še paketno normalizacijo, ki stabilizira učenje z normalizacijo vrednosti med plastmi in ReLU. Vmes je dodana tudi funkcija izpustne plasti, ki med učenjem naključno izklopi del nevronov, kar prepreči, da bi prišlo do prekomernega prilagajanja, in ga sili, da se nauči splošnejših vzorcev. Izhod modela za en piksel smo določili s funkcijo softmax, pri čemer izhod modela ni ena sama bakterijska vrsta, ampak verjetnostna porazdelitev čez vseh osem razredov. Verjetnost povprečimo čez 1.500 pikslov in dobimo eno samo skupno porazdelitev za celotno kolonijo, na kateri izberemo razred z najvišjo povprečno vrednostjo.

Analogija glasovanja: Iz ene same slike kolonije smo pridobili 1.500 neodvisnih »glasov« za končno odločitev. To je podobno, kot bi namesto enega samega zdravnika o diagnozi odločalo 1.500 zdravnikov, končna diagnoza pa bi bila njihova povprečna ocena.

Učenje modela

Model smo učili 40 epoh, podatki pa so bili razdeljeni s 5-kratno shemo StratifiedKFold, ki podatke razdeli na pet delov, pri čemer vsak del vsebuje sorazmerno enak delež vsakega razreda (»stratified«), kar je pomembno, ker je bilo v vsakem delu okoli 50 % vzorcev iste vrste. Brez stratifikacije bi lahko imeli posamezni deli zelo neuravnoteženo zastopanost razredov, kar bi popačilo oceno uspešnosti modela. Za učenje smo uporabili optimizator uteži AdamW. Uporabili smo še CosineAnnealingLR, ki je razporejevalnik hitrosti učenja in nadzoruje, kako hitro se spreminjajo spremembe uteži skozi učenje. Na začetku učenja je tako hitrost učenja višja, kar omogoči hitro grobo iskanje dobrih uteži, sčasoma pa se hitrost učenja zmanjša, kar v poznejših korakih omogoči bolj fino uglaševanje optimalnih uteži.

Rezultat drugega kroga

Na koncu je bil naš naučeni model zmožen klasificirati bakterijske kolonije, ki jih prej še ni videl, s 94,6-odstotno klasifikacijsko točnostjo. V primerjavi s prvim krogom je to očitni preskok v kakovosti našega modela, ki je neposredno povezan z drugačnimi vhodnimi podatki. Informacije, ki so jih zajele hiperspektralne kamere, so razkrile razlike, ki jih z golim očesom ali navadno RGB-sliko ne bi opazili. V primerjavi z ročnim določanjem se metoda izkaže za hitrejšo, saj smo lahko po izdelavi modela klasificirali na desetine slik bakterijskih kolonij skoraj v trenutku. Ne glede na hitrost in primerljivo klasifikacijsko točnost našega modela pa je veliko težje oceniti zanesljivost modela v robnih ali neobičajnih primerih, saj je naš sistem črna škatlica, katerega odločitve niso neposredno razložljive in je lahko podvržen neznanim motnjam, ki bi jih izkušen mikrobiolog pri ročnem pregledu mogoče opazil in ustrezno upošteval. Vsekakor integracije sistemov globokega učenja v standardne (mikro)biološke prakse kažejo obetavne rezultate in možnosti vključitve v že vzpostavljene sisteme, v katerih bi človek prevzel vlogo validiranja rezultatov nevronske mreže, kar bi močno pospešilo pridobivanje rezultatov in mu drastično olajšalo delo.

Zaključek

Strojno učenje se je izkazalo za učinkovit pristop pri reševanju izzivov segmentacije in klasifikacije mikrobnih kolonij s pomočjo RGB in hiperspektralnih slik. Pristop z uporabo nevronske mreže se izkaže za zanimivega zaradi hitrosti delovanja, visoke klasifikacijske točnosti in neinvazivnosti metode, vendar odpira nova vprašanja o validaciji takšnih sistemov. Pridobivanje zadostne količine reprezentativnih podatkov za učenje ostaja eden izmed glavnih izzivov na tem področju, prav tako tudi sama standardizacija zajema podatkov. Naša pot skozi oba kroga tekmovanja je hkrati pokazala, kako močno lahko narava vhodnih podatkov vpliva na uspešnost modela. Z RGB-slikami in arhitekturo YOLO smo dosegli 38-odstotno klasifikacijsko točnost, medtem ko nam je prehod na hiperspektralne podatke in prilagojeno 1D-arhitekturo omogočil skok na 94,6-odstotno klasifikacijsko točnost.

- [1] Pereira J. D., Veloso B., Gama J. 2026. Deep neural networks in medical microbiology for bacterial colonies classification. Scientific Reports, <https://doi.org/10.1038/s41598-026-48621-0>
- [2] Fabris F., Magalhães J. P. de, Freitas A. A. 2017. A review of supervised machine learning applied to ageing research. Biogerontology, 18, 2: 171–188, <https://doi.org/10.1007/s10522-017-9683-y>
- [3] LeCun Y., Bengio Y., Hinton G. 2015. Deep learning. Nature, 521, 7553: 436–444, <https://doi.org/10.1038/nature14539>
- [4] Majchrowska S., Pawłowski J., Guła G., Bonus T. ..., Drulis-Kawa Z. 2025. Assessing microbial colony counting: A deep learning approach with the AGAR image dataset. Neurocomputing, 630: 129654, <https://doi.org/10.1016/j.neucom.2025.129654>
- [5] Przymus P., Rykaczewski K., Martin-Segura A., Truu J. ... Nechyporenko A. 2025. Deep learning in microbiome analysis: a comprehensive review of neural network models. Frontiers in Microbiology, 15, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1516667>
- [6] Loshchilov I., Hutter F. 2018. Decoupled weight decay regularization. ICLR 2019 (7th International Conference on Learning Representations), <https://openreview.net/forum?id=Bkg6RiCqY7>
- [7] Loshchilov I., Hutter F. 2017. SGDR: Stochastic gradient descent with warm restarts. ICLR 2017 (5th International Conference on Learning Representations), <https://openreview.net/forum?id=Skq89Scxx>
- [8] Goodfellow I., Bengio Y., Courville A. 2016. Deep learning. MIT Press, <http://www.deeplearningbook.org>
- [9] Shorten C., Khoshgoftaar T. M. 2019. A survey on image data augmentation for deep learning. Journal of Big Data, 6, 1: 60, <https://doi.org/10.1186/s40537-019-0197-0>
- [10] Kohavi R. 1995. A study of cross-validation and bootstrap for accuracy estimation and model selection. International Joint Conference on Artificial Intelligence. <https://api.semanticscholar.org/CorpusID:2702042>
- [11] Lecun Y., Bottou L., Bengio Y., Haffner P. 1998. Gradient-based learning applied to document recognition. Proceedings of the IEEE, 86, 11: 2278–2324, <https://doi.org/10.1109/5.726791>
- [12] Kiranyaz S., Avci O., Abdeljaber O., Ince T. ..., Inman D. J. 2021. 1D convolutional neural networks and applications: A survey. Mechanical Systems and Signal Processing, 151: 107398, <https://doi.org/10.1016/j.ymssp.2020.107398>
- [13] He K., Gkioxari G., Dollár P., Girshick R. 2017. Mask R-CNN. IEEE International Conference on Computer Vision (ICCV), <https://doi.org/10.1109/ICCV.2017.322>
- [14] Ren S., He K., Girshick R., Sun J. 2016. Faster R-CNN: Towards Real-Time Object Detection with Region Proposal Networks. NIPS 2015, https://papers.nips.cc/paper_files/paper/2015/hash/14bfa6b-b14875e45bba028a21ed38046-Abstract.html
- [15] Redmon J., Divvala S., Girshick R., Farhadi A. 2016. You only look once: Unified, real-time object detection. IEEE International Conference on Computer Vision (ICCV), <https://doi.org/10.1109/CVPR.2016.91>
- [16] Li M., Yao X., Zhang M., Hu B. 2026. Artificial intelligence for microbial isolation and cultivation: Progress and challenges. Microorganisms, 14, 3: 654, <https://doi.org/10.3390/microorganisms14030654>
- [17] Bhargava A., Sachdeva A., Sharma K., Alsharif M. H. ... Uthansakul M. 2024. Hyperspectral imaging and its applications: A review. Heliyon, 10, 12, <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e33208>

Ali lahko

VAMPIRSKE BAKTERIJE

rešijo izzive sodobne medicine

Tina Skočaj¹, Sara Skvarč¹, Katja Marinko¹, Gaja Turnšek¹

¹ Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za mikrobiologijo, Večna pot 111, 1000 Ljubljana

Ključne besede: *Bdellovibrio bacteriovorus*, plenilske bakterije, živi antibiotiki, odpornost proti antibiotikom, biofilmi, bakterijsko inženirstvo

IZVLEČEK

Naraščajoča odpornost bakterij proti antibiotikom in zmanjšana učinkovitost protimikrobnega zdravljenja okužb, povezanih z biofilmi, predstavljata vse večji izziv, kar spodbuja razvoj novih terapevtskih pristopov. Obetavno alternativo predstavlja uporaba plenilskih oziroma »vampirskih« bakterij rodu *Bdellovibrio*, ki napadajo predvsem Gram-negativne bakterije. Po prepoznavi in pritrditvi na bakterijski plen prodrejo skozi njegovo celično ovojnico, se naselijo v periplazemskem prostoru, tam rastejo in se razmnožujejo, nato pa se z lizo gostiteljske bakterije sprostijo kot nove plenilske celice. Ta edinstveni življenjski cikel bi lahko izkoristili kot strategijo, pri kateri bi bakterije rodu *Bdellovibrio* služile kot »živ antibiotik« za zdravljenje lokalnih in sistemskih okužb. Bakterije rodu *Bdellovibrio* lahko prispevajo k omejevanju širjenja odpornosti proti antibiotikom, izboljšanju prodiranja antibiotikov v biofilme in njihovi razgradnji. Poleg izkoriščanja naravnih plenilskih lastnosti bi omenjene bakterije lahko dodatno izboljšali s sodobnimi inženirskimi pristopi, pri katerih bi jih prilagodili za bolj usmerjeno, učinkovito ali kombinirano protimikrobno delovanje. Kljub številnim možnostim uporabe bakterij rodu *Bdellovibrio* na različnih področjih medicine ostaja uporaba pri ljudeh v zgodnji fazi razvoja ter zahteva nadaljnje raziskave varnosti, učinkovitosti in klinične izvedljivosti.

Uvod

Razvoj novih antibiotikov ne sledi hitrosti naraščanja odpornosti bakterij, kar predstavlja pomemben izziv javnega zdravstva po vsem svetu. Večkratno odporne bakterije glede na raziskave povzročajo 27 % daljšo hospitalizacijo, 33 % višje stroške in kar 62 % višjo smrtnost v bolnišnicah [1]. Vsako leto v državah EU/EGP umre več kot 35.000 ljudi zaradi bolezni, povzročenih z odpornimi bakterijami [2], svetovno breme pa je še večje, in sicer vsaj 700.000 smrti. Študije ocenjujejo, da bi bilo brez sprejetja ukrepov do leta 2050 po svetu letno ogroženih 10 milijonov življenj, skupna ekonomska škoda pa bi dosegla okoli 87 bilijonov evrov [3]. Raziskovalci zato iščejo nove pristope za obvladovanje bakterijskih okužb. Med obetavnimi možnostmi so plenilske bakterije, ki za svoje preživetje ali razmnoževanje izkoriščajo druge bakterije, pri čemer odpornost proti antibiotikom sama po sebi ne zagotavlja zaščite pred plenjenjem [4–7].

Plenilske bakterije so pomemben dejavnik pri oblikovanju bakterijskih združb v kopenskih in vodnih ekosistemih; razvile so različne strategije prepoznavanja, napada in izkoriščanja plena. Medtem ko nekatere uporabljajo strategijo volčjega krdela oziroma skupinskega plenjenja, so druge popolnoma odvisne od samostojnega lova [8]. Glede na način interakcije s plenom lahko razlikujemo endobiotsko

plenjenje, pri katerem plenilec vstopi v celico plena in se v njej razmnožuje, epibiotsko plenjenje, pri katerem ostane na njeni površini, in transbiotsko plenjenje, pri katerem plenilske bakterije izločajo litične dejavnike in izkoriščajo sproščeno celično vsebino [4].

Ena najbolje raziskanih plenilskih bakterij je *Bdellovibrio bacteriovorus*, ki jo zaradi napada na bakterijski plen in izkoriščanja njegovih hranil za lastno rast pogosto opisujejo tudi kot »vampirsko bakterijo« [8]. Odkrita je bila pred več kot 60 leti, v zadnjem času pa se povečuje zanimanje za njeno potencialno biomedicinsko uporabo. Zaradi širokega nabora po Gramu-negativnih bakterij, ki jih lahko pleni, jo raziskujejo kot mogoč »živi antibiotik« proti povzročiteljem okužb, vključno z večkratno odpornimi sevi, pa tudi za odstranjevanje biofilmov [5] in druge biotehnološke aplikacije [9]. Poleg medicine so preučevali tudi njeno uporabo pri biološkem zatiranju bakterijskih patogenov v kmetijstvu in ribogojstvu ter pri sproščanju znotrajceličnih produktov v biotehnoloških procesih [9].

Namen tega članka je predstaviti plenilsko bakterijo *B. bacteriovorus* kot obetavno alternativo za omejevanje okužb, ki jih povzročajo po Gramu-negativne bakterije, ter osvetliti izbrane novejšje raziskave, ki kažejo na naraščajoče zanimanje za njen (terapevtski) potencial.

Življenjski cikel

B. bacteriovorus je po Gramu-negativna, monotriha in obligatno aerobna bakterija velikosti približno 0,3–0,5 × 0,5–1,4 µm. Sposobna je endobiotskega plenjenja drugih po Gramu-negativnih bakterij, od katerih je odvisno tudi njeno razmnoževanje [4]. Njen življenjski cikel sestavlja dve jasno ločeni fazi: napadalna faza, v kateri živi kot prostoživeča in nerazmnožujoča se celica, ter od plena odvisna reproduktivna faza [10].

V napadalni fazi je celica asimetrična, z bičkom na enem celičnem polu in s pili na drugem. Biček ji omogoča hitro gibanje in olajša iskanje plena, pili pa imajo ključno vlogo pri plenjenju [10]. Doseže lahko hitrost nad 160 µm/s, in ko s kemotakso naleti na primeren plen, se pritrdi na njegovo zunanjo membrano in prodre v periplazemski prostor, ne da bi pri tem poškodovala citoplazemsko membrano plena. Po vstopu povzroči preoblikovanje plasti peptidoglikana in s tem celico plena spremeni v zaobljeno strukturo, imenovano bdeloplast. Takšno preoblikovanje prepreči prezgodnjo lizo plena ter plenilski bakteriji zagotovi zaščiten prostor za rast in razmnoževanje [4].

S tem se začne reproduktivna faza, v kateri *B. bacteriovorus* v periplazmi plena raste v obliki podolgovatega filameta in razgrajuje njegove celične komponente, ki jih uporablja kot vir hranil za svojo rast [5, 10]. Ko izrabi razpoložljiva hranila, začne delitev: pri plenjenju manjših celic tvori dve hčerinski celici, pri plenjenju večjih celic pa tri ali več potomcev [10]. Število nastalih potomcev je odvisno od velikosti plena in s tem od količine hranil, ki so plenilski bakteriji na voljo med rastjo [8]. Ob koncu reproduktivne faze se z delovanjem litičnih encimov razgradi celična stena plena, bdeloplast lizira, novonastale plenilske celice pa se sprostijo v okolje. Te ponovno preidejo v gibljivo napadalno fazo in začnejo iskati nov plen, s čimer se življenjski cikel ponovi [4].

Plenjenje *B. bacteriovorus* zahteva usklajeno delovanje molekularnih mehanizmov, ki omogočajo prepoznavo plena, vstop vanj in njegovo končno lizo. Signalne poti pri tem usklajujejo vezavo na plen, delovanje litičnih encimov in preoblikovanje plena ter tako omogočajo nadzorovan prehod iz napadalne v reproduktivno fazo [4].

B. bacteriovorus kot »živi antibiotik«

Zaradi vse pogostejše odpornosti povzročiteljev okužb na antibiotike se povečuje potreba po alternativnih pristopih. Ena izmed možnosti je uporaba bakterije *B. bacteriovorus* kot »živega antibiotika«. Zaradi njene sposobnosti plenjenja po Gramu-negativnih bakterij, kot so: *Escherichia coli*, *Vibrio vulnificus*, *Pseudomonas aeruginosa* in *Yersinia pestis*, bi lahko predstavljala alternativo ali dopolnilo pri zdravljenju okužb, pri katerih je učinkovitost antibiotikov zmanjšana. Uspešnost njene uporabe je odvisna tudi od vrste in mesta okužbe, saj mora plenilec priti v stik s povzročiteljem, ohraniti svojo aktivnost in delovati ob prisotnosti oz. sinergistično z imunskim sistemom gostitelja.

Terapevtski potencial *B. bacteriovorus* je zato preučevan v različnih modelih sistemskih, respiratornih in lokalnih okužb [11–13].

Sistemske okužbe predstavljajo poseben izziv, saj se lahko povzročitelj z mesta vstopa razširi v notranje organe in povzroči smrt gostitelja. Za uspešno uporabo »živega antibiotika« zato ni dovolj, da plenilska bakterija patogen uničuje v pogojih *in vitro*, ampak mora njegovo širjenje omejiti tudi v živem organizmu. Tak terapevtski pristop je bil opisan pri sistemski okužbi z bakterijo *Yersinia pestis* CO92, pri kateri je uporaba *B. bacteriovorus* HD100 povzročila preživetje miši SKH-1 in zmanjšala širjenje povzročitelja z mesta okužbe. Pri večini preživelih živali v vranici ni bilo mogoče zaznati živih celic *Y. pestis*, kar nakazuje na to, da lahko plenilska bakterija prispeva ne le k lokalnemu zmanjšanju količine patogena, ampak tudi k omejevanju njegovega širjenja po organizmu [11].

Terapevtski odziv se je med različnimi linijami miši razlikoval, saj pri miših Balb/c v predhodnem poskusu zaščitnega odziva niso zanesljivo potrdili. To nakazuje, da izid zdravljenja ni odvisen samo od sposobnosti *B. bacteriovorus* za plenjenje, ampak tudi od genetskega ozadja in imunskega odziva gostitelja. Zaščitni mehanizem še ni pojasnjen, zato ni znano, kolikšen delež učinka je posledica neposrednega plenjenja *Y. pestis* in kolikšen sodelovanja imunskega sistema. Poleg tega je bila plenilska bakterija prvič vnesena že pred okužbo, zato rezultati ne dokazujejo učinkovitosti zdravljenja že razvite sistemske okužbe. *B. bacteriovorus* tako predstavlja obetaven pristop za omejevanje sistemskega širjenja patogena, pri njegovi terapevtski uporabi pa bo treba v prihodnje določiti ustrezen čas aplikacije ter bolje razumeti interakcije med plenilsko bakterijo, povzročiteljem okužbe in imunskim sistemom gostitelja [11].

Respiratorne okužbe, zlasti pljučnice, ki jih povzročajo proti antibiotikom odporne po Gramu-negativne bakterije, predstavljajo pomemben terapevtski izziv, saj je učinkovitost obstoječih antibiotikov pogosto omejena. Čeprav *B. bacteriovorus* učinkovito pleni po Gramu-negativne bakterije, je njegova uporaba pri zdravljenju pljučnih okužb omejena, saj ga po vnosu v pljuča lahko fagocitirajo pljučni makrofagi. S tem namenom je bil razvit inhalacijski nosilec v obliki velikih poroznih mikrosfer iz kopolimera mlečne in glikolne kisline (PLGA), ki zaradi velikega geometrijskega premera zmanjšujejo privzem na strani makrofagov, zaradi majhnega aerodinamičnega premera in visoke poroznosti pa omogočajo odlaganje globoko v pljučih in postopno sproščanje *B. bacteriovorus*. Tak pristop je v mišjem modelu pljučnice pokazal zmanjšano bakterijsko breme seva divjega tipa in proti meropenemu odpornega seva *P. aeruginosa* v primerjavi s prosto raztopino *B. bacteriovorus*, hkrati pa zmanjšal vnetni odziv, omejil poškodbe pljučnega tkiva in izboljšal dihalno funkcijo, nasičenost krvi s kisikom in telesno zmogljivost živali. Ustrezno zasnovani nosilci torej lahko pomembno izboljšajo terapevtski potencial *B. bacteriovorus* pri zdravljenju okužb dihal, ki

jih povzročajo po Gramu-negativne bakterije [12]. Okužbe opeklinskih ran so pogosto povezane z dolgotrajnim zdravljenjem in predstavljajo ugodno okolje za razrast bakterij, zato se kot mogoča alternativa obstoječemu zdravljenju kaže tudi uporaba plenilskih bakterij. Na mišjem modelu opeklinске rane, okužene z bakterijo *P. aeruginosa*, je lokalna aplikacija *B. bacteriovorus* vplivala na zmanjšanje bakterijskega bremena skozi celotno obdobje spremljanja in preprečila ponovno povečanje števila bakterij v poznejših fazah zdravljenja, ki so ga opazili v kontrolni skupini in skupini, zdravljeni z meropenemom. Histološke analize so pokazale zgodnejšo migracijo fibroblastov, izrazitejšo epitelizacijo in krajše trajanje vnetne faze. Povečano izražanje genov za transformirajoči rastni dejavnik beta 1, vaskularni endotelijski rastni dejavnik in kolagen tipa I je bilo skladno z okrepljeno angiogenezo, tvorbo kolagena in obnovo poškodovanega tkiva. Poleg protibakterijskega učinka je uporaba *B. bacteriovorus* pri okuženih opeklinških ranah ugodno vplivala tudi na procese celjenja poškodovanega tkiva [13]. *B. bacteriovorus* so zaznali tudi v črevesni mikrobioti zdravih ljudi [14], novejša raziskava pa je iz človeških fekalnih vzorcev izolirala žive in plenilsko aktivne seve te vrste [15]. To kaže, da je *B. bacteriovorus* lahko naravno prisoten v človeškem prebavnem traktu, vendar samo po sebi še ne dokazuje varnosti njegove terapevtske uporabe. Predklinične raziskave so pokazale, da seva 109J in HD100 nista bila citotoksična za pet preučevanih človeških celičnih linij, v štirih od petih pa nista povzročila izrazitega povečanja proinflammatory citokinov [16]. Tudi po intranazalnem ali intravenskem vnosu pri miših niso opazili zmanjšanja preživetja ali patoloških sprememb tkiv, vnetni odziv pa je bil prehodan [17]. Po intravenskem vnosu se je količina *B. bacteriovorus* v miših postopoma zmanjševala, po 20 dneh pa plenilskih bakterij niso več zaznali [17]. Kljub spodbudnim predkliničnim rezultatom bo treba pred klinično uporabo natančneje raziskati varnost, čas zadrževanja in odstranjevanja *B. bacteriovorus* iz organizma ter njegove interakcije z imunskim sistemom in mikrobioto gostitelja. *B. bacteriovorus* predstavlja velik terapevtski potencial za zdravljenje različnih vrst bakterijskih okužb. Poleg neposredne terapevtske uporabe se vse več pozornosti namenja tudi drugim potencialnim načinom uporabe tega plenilskega mikroorganizma, ki bi lahko dodatno prispevali k učinkovitejšemu obvladovanju bakterijskih povzročiteljev [11–13].

Omejevanje širjenja odpornosti proti antibiotikom

Ker *B. bacteriovorus* pleni različne po Gramu-negativne bakterije, med njimi tudi seve, odporne proti antibiotikom, bi njegova uporaba v okviru alternativnih protimikrobnih strategij lahko zmanjšala potrebo po klasičnih antibiotikih in s tem selekcijski pritisk, ki spodbuja razvoj ter ohranjanje odpornosti. Samo uničenje odporne bakterije pa še ne odpravi nevarnosti, ki jo predstavlja njen genski material. Ob lizi celice se namreč lahko v okolje sprosti DNA, v kateri so lahko geni za odpornost. Ti so lahko vključeni v bakterijski kromosom ali pa se nahajajo na plazmidih, ki se lahko med bakterijami prenašajo s horizontalnim prenosom genov. Po lizi celice lahko sproščena DNA v okolju vztraja tudi po smrti izvirne bakterije, nekatere naravno kompetentne bakterije pa jo lahko sprejmejo s transformacijo in s tem pridobijo odpornost. Pri pristopih, katerih cilj je poleg zdravljenja okužbe tudi omejevanje nadaljnega širjenja odpornosti, je zato smiselno uničenje odpornih bakterij združiti z razgradnjo sproščenega genskega materiala [11–13, 18].

Rao in sodelavci so v ta namen pripravili večnamenski konstrukt Ce-PEA@*Bdello*. Površino *B. bacteriovorus* so funkcionalizirali s polidopaminom in z razvejanim polietileniminom, na katerega so nato vezali cerijeve(IV) ione [18].

Površinska obdelava ni bistveno zmanjšala viabilnosti in gibiljivosti celic *B. bacteriovorus*, posamezne komponente pa so konstrukt zagotovile dodatne funkcionalne lastnosti. Polidopamin ne predstavlja le osnove za vezavo drugih molekul, ampak deluje tudi kot fototermični material, ki ob obsevanju z bližnjo infrardečo svetlobo pretvarja svetlobno energijo v toploto, kar okrepi uničevanje bakterij in poškodovanje biofilmske strukture. Fototermični učinek lahko uniči tudi same plenilske bakterije, s čimer bi se po zdravljenju lahko zmanjšalo tveganje njihovega nadaljnjega zadrževanja v tkivu [18].

Cerijevi(IV) kompleksi konstrukt zagotavljajo aktivnost, podobno delovanju deoksiribonukleaz, saj kot umetne nukleaze hidrolitično cepijo fosfodiesterne vezi v DNA. Konstrukt tako poleg zunajcelične DNA v biofilmskem matriksu razgrajuje tudi DNA, ki se sprosti po uničenju odpornih bakterij. Raziskovalci so pokazali, da je Ce-PEA@*Bdello* razgradil plazmidno in genomsko DNA proti kanamicinu odporne bakterije *P. aeruginosa*. Po štirih urah ni bilo več mogoče zaznati niti pomnožka tarčnega zaporedja gena za odpornost proti kanamicinu, medtem ko konstrukt brez cerijevih ionov takšne razgradnje ni povzročil [18].

Učinek so preverili tudi na mišjem modelu opeklinске rane, okužene s proti kanamicinu odporno bakterijo *P. aeruginosa*. Zdravljenje s Ce-PEA@*Bdello* in z bližnjo infrardečo svetlobo je zmanjšalo število živih bakterij v rani. V izlužku gaze, ki je štiri ure prekrivala rano, po zdravljenju s Ce-PEA@*Bdello* prav tako niso več zaznali pomnožka gena za odpornost proti kanamicinu, medtem ko je bil ta v kontrolnih skupinah še vedno zaznaven. Konstrukt je tako združil uničevanje odporne povzročitelja in razgradnjo njegovega genskega materiala, kar bi lahko zmanjšalo možnost nadaljnega širjenja odpornosti. Raziskovalci sicer niso neposredno merili prenosa gena v prejemne bakterije, zato rezultati dokazujejo predvsem razgradnjo DNA in potencial za omejevanje horizontalnega prenosa, ne pa še neposredno dokazanega preprečevanja širjenja odpornosti [18].

Pri morebitni terapevtski uporabi živega bakterijskega plenilca je poleg njegove učinkovitosti pomembno upoštevati tudi možnost prevzema genskega materiala plena. Dolgotrajno gojenje *B. bacteriovorus* na bakterijskem plenu in poskusi zaporednega plenjenja niso pokazali zaznavnega vključevanja kromosomske DNA plena v genom plenilca [19]. Ker raziskava ni bila usmerjena posebej v gene za odpornost, možnosti redkih dogodkov horizontalnega prenosa v drugih pogojih ni mogoče povsem izključiti.

Vpliv *B. bacteriovorus* na biofilme in kombinirano protimikrobno zdravljenje

Biofilmi so prostorsko organizirane skupnosti bakterij, obdane z zunajceličnim matriksom, ki ga sestavljajo predvsem polisaharidi, proteini, lipidi in zunajcelična DNA. Matriks bakterije ščiti pred neugodnimi vplivi okolja, hkrati pa upočasnjuje prehajanje antibiotikov v globlje plasti biofilma. To je eden izmed razlogov, da so bakterije v biofilnu pogosto manj občutljive za antibiotično zdravljenje kot planktonske bakterije, tudi kadar nimajo pridobljenih genetskih mehanizmov odpornosti [20].

Bakterija *B. bacteriovorus* predstavlja obetavno možnost pri premagovanju teh ovir, saj je v napadalni fazi zelo gibljiva, kar ji omogoča prodiranje skozi gosto strukturo biofilma. Pri tem izloča hidrolitične encime, ki poškodujejo zunajcelični matriks in olajšajo dostop do bakterijskih celic v njegovih globljih plasteh. S plenjenjem lizira po Gramu-negativne bakterije, tudi kadar so vključene v biofilm [20].

Čeprav po Gramu-pozitivnih bakterij navadno ne pleni, lahko vpliva tudi na njihove biofilme. Tang in sodelavci so pokazali, da je sama *B. bacteriovorus* zmanjšala površino

biofilmov po Gramu-negativnih bakterij za približno 70–80 %, biofilmov po Gramu-pozitivnih bakterij pa za približno 20–40 % [20]. Podobno so Im in sodelavci pokazali, da sev HD100 brez neposrednega plenjenja razgrajuje matriks biofilma *S. aureus*, iz katerega pridobiva hranila ter poveča tvorbo in izločanje proteolitičnih encimov [21].

Protibiofilmsko delovanje *B. bacteriovorus* pa ni omejeno le na razgradnjo že oblikovanih biofilmov, ampak lahko vpliva tudi na njihov nastanek. Monnappa in sodelavci so pokazali, da so zunajcelični produkti *B. bacteriovorus*, predvsem izločene proteaze, zmanjšali nastanek biofilma *S. aureus* za najmanj 75 % in v podobnem obsegu razgradili že oblikovane biofilme [22].

Te lastnosti je mogoče izkoristiti tudi pri kombiniranem protimikrobnem zdravljenju. Tang in sodelavci so ampicilin enkapsulirali v liposome in jih pritrdili na površino *B. bacteriovorus*. Nastali konstrukt, imenovan ALP@*Bdello*, je z aktivnim gibanjem prodiral v biofilm in s seboj prenašal antibiotik, ki bi sicer v njegove globlje plasti prehajal predvsem s počasno difuzijo. Med gibanjem skozi biofilm in ob stiku s plenom je prihajalo do številnih trkov, za katere avtorji predvidevajo, da so spodbujali razpad liposomov in sproščanje ampicilina [20].

Tak pristop je združil neposredno protibakterijsko delovanje *B. bacteriovorus* in ampicilina. Pri biofilmih po Gramu-negativnih bakterij *Escherichia coli* in *P. aeruginosa* so bakterije *B. bacteriovorus* neposredno plenile in lizirale bakterijske celice. Pri biofilmih po Gramu-pozitivnih bakterij *S. aureus* in *Streptococcus mutans* pa so bakterije *B. bacteriovorus* predvsem poškodovale matriks in omogočile boljše prodiranje ampicilina, ki je nato deloval protibakterijsko. ALP@*Bdello* je v modelih *in vitro* površino vseh štirih preučevanih biofilmov zmanjšal za približno 90–95 % ter bil učinkovitejši od liposomov z ampicilinom, same plenilske bakterije in njune nepritrjene kombinacije. To kaže, da je bila za učinek pomembna aktivna dostava antibiotika z bakterijo, ne le sočasna prisotnost obeh komponent [20]. Konstrukt so preizkusili tudi na biofilmih *S. mutans* na zobnih površinah in v mišjih modelih okuženih ran, kjer je pokazal učinkovito protibakterijsko in protibiofilmsko delovanje ter spodbudno biokompatibilnost. Pri navadnih ranah je skoraj popolnoma odstranil *E. coli*, pri diabetičnih ranah, okuženih s *S. aureus* in *E. coli*, pa je bilo zdravljenje povezano s hitrejšim celjenjem [20]. Ti rezultati kažejo na potencial *B. bacteriovorus* in njenih zunajceličnih produktov za zaviranje nastanka in razgradnjo biofilmov ter za uporabo v kombiniranih protimikrobnih terapijah. Kljub obetavnim predkliničnim rezultatom varnost in učinkovitost takšnih pristopov pri ljudeh še nista bili raziskani [20–22].

BAKTERIJSKI DUHOVI:

od strašnih patogenov do pomočnikov v medicini

Zoja Andoljšek¹

¹ Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za mikrobiologijo, Večna pot 111, 1000 Ljubljana

Ključne besede: bakterijski duhci, biomedicina, imunski odziv, cepiva, tarčna dostava zdravil, sinergistična kemoimunoterapija

IZVLEČEK

Nalezljive bolezni že od nekdaj predstavljajo velik izziv v javnem zdravstvu, zato je razvoj varnih in učinkovitih rešitev, kot so na primer cepiva in sistemi za dostavo zdravil, pomemben cilj sodobne medicine. Živa oslabljena cepiva predstavljajo nevarnost povrnitve virulence. Pri pripravi inaktiviranih cepiv pa pogosto uporabljamo toploto in formaldehid, ki sicer uspešno izničiata patogenost mikroorganizmov, vendar hkrati poškodujeta antigene na površini njihovih celic. Učinkovitost takšnih pripravkov je zaradi slabše imunogenosti omejena. Zato pozornost namenjamo razvoju novih pristopov, ki združujejo varnost pa tudi imunogenost. V tem kontekstu zelo obetajo bakterijski duhci (*angl.* bacterial ghosts; BGs). Gre za izpraznjene patogene Gram-negativne bakterijske celice, iz katerih s posebnimi postopki odstranimo nukleinske kisline in drugo citoplazemsko vsebino, medtem ko v celoti ohranimo njihove površinske antigene. Zaradi tega BGs ne predstavljajo tveganja za okužbo in horizontalni genski prenos, sprožijo pa močen imunski odziv. Ker jih lahko napolnimo z izbranimi nukleinskimi kislinami, proteini ali drugimi učinkovinami, so BGs zelo zanimivi kandidati za razvoj cepiv, adjuvansov in sistemov za tarčno dostavo zdravil. V tem članku se bom osredinila na predstavitev priprave BGs, njihovega delovanja in raznolikih možnosti uporabe na področju biomedicine. Posebno pozornost bom namenila študiji, v kateri so BGs uporabili kot ključne pomočnike pri sinergističnem kemoimunoterapevtskem zdravljenju pljučnih metastaz raka dojke pri miših.

Uvod

Ob omembi bakterij veliko ljudi najprej pomisli na povzročitelje nevarnih bolezni, toda razvoj sodobne znanosti je pokazal, da jih je mogoče izrabiti tudi v prid človeštvu, na primer na področju biomedicine. En tak primer so BGs. Gre za prazne ovojnice Gram-negativnih bakterij z ohranjenimi površinskimi antigeni. Ponašajo se z biološko varnostjo, imunogenostjo in s praznim prostorom v notranjosti, ki ga je mogoče napolniti s poljubnimi učinkovinami. Predstavljajo zelo obetavne kandidate za razvoj cepiv, adjuvansov in sistemov za tarčno dostavo zdravil. Obetavne so tudi raziskave, pri katerih izkoriščajo njihovo dvojno vlogo za učinkovitejše zdravljenje rakavih sprememb [1].

Priprava bakterijskih duhcev

Gensko inženirstvo

BGs najpogosteje pripravljamo z metodo genskega inženirstva, saj s slednjim zares dobro zagotovimo ohranjenost površinskih antigenov [1]. V Gram-negativne bakterije vstavimo plazmid z genom E, ki pripada bakteriofagu ΦX174. Izraženi protein E zavira delovanje MurNAC-pentapeptid translokaze (MraY), ki je ključen encim pri sintezi peptidoglikana. Protein E oligomerizira in tvori transmembranske kanale premera 40–200 nm. Zaradi razlik v osmotskem pritisku skozi celice izteče citoplazemska vsebina. Izražanje proteina E natančno uravnavamo z uporabo inducibilnih promotorskih sistemov [2]. Za zagotovitev varnosti priprava se moramo znebiti vseh proti lizi odpornih celic; običajno to storimo z antibiotikom [1]. Celično lizo so pred kratkim izboljšali s postopkom, pri katerem so v celice vstavili plazmid z mutiranim genom E in genom za stafilokokno nukleazo A (SNUC), ki razgradi preostale nukleinske kisline v celici. Ta postopek zagotavlja povečano izpraznitev citoplazme in večjo varnost. Z metodo genskega inženirstva so do zdaj uspešno proizvedli BGs iz bakterij *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae*, *Helicobacter pylori*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*, *Vibrio cholerae* in še iz veliko drugih [2].

[1] Serra-Burriel M., Keys M., Campillo-Artero C., Agodi A. ... López-Casasnovas G. 2020. Impact of multi-drug resistant bacteria on economic and clinical outcomes of healthcare-associated infections in adults: Systematic review and meta-analysis. PLOS ONE, 15, 1: e0227139, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0227139>

[2] ECDC. 2023. Increase in cases of carbapenem-resistant E. coli carrying the blaNDM-5 gene, EU/EEA countries. <https://www.ecdc.europa.eu/en/news-events/increase-cases-carbapenem-resistant-e-coli-carrying-blaNDM-5-gene-eueea-countries> (15. avg. 2026)

[3] O'Neill J. 2016. Tackling drug-resistant infections globally: Final report and recommendations. AMR, https://amr-review.org/sites/default/files/160518_Final%20paper_with%20cover.pdf (15. avg. 2026).

[4] Kanwal A., Azeem B., Amin M. H. J., Elomeiri L. 2026. Bdellovibrio bacteriovorus: mechanisms, problems, and prospects against MDR respiratory infections. Frontiers in Microbiology, 17: 1736645, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2026.1736645>

[5] Maurmann de Souza C., Fleitas Martínez O., Morales Duque H., Franco O. L. 2023. Expanding therapeutic potential of Bdellovibrio bacteriovorus against multidrug-resistant pathogens. Drug Discovery Today, 28, 6: 103595, <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2023.103595>

[6] Smith W. P. J., Wucher B. R., Nadell C. D., Foster K. R. 2023. Bacterial defences: mechanisms, evolution and antimicrobial resistance. Nature Reviews Microbiology, 21, 8: 519–534, <https://doi.org/10.1038/s41579-023-00877-3>

[7] Thierry S., Kaïmer C. 2020. The Predation Strategy of Myxococcus xanthus. Frontiers in Microbiology, Volume 11-2020 <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00002>

[8] Santin Y. G., Sogues A., Bourigault Y., Remaut H. K., Laloux G. 2024. Lifecycle of a predatory bacterium vampirizing its prey through the cell envelope and S-layer. Nature Communications, 15, 1: 3590, <https://doi.org/10.1038/s41467-024-48042-5>

[9] Salgado S., Hernández-Herreros N., Prieto M. A. 2024. Controlling the expression of heterologous genes in Bdellovibrio bacteriovorus using synthetic biology strategies. Microbial Biotechnology, 17, 6: e14517, <https://doi.org/10.1111/1751-7915.14517>

[10] Płaskowska K., Zakrzewska-Czerwińska J. 2023. Chromosome structure and DNA replication dynamics during the life cycle of the predatory bacterium Bdellovibrio bacteriovorus. FEMS Microbiology Reviews, 47, 6: fuad057, <https://doi.org/10.1093/femsre/fuad057>

[11] Findlay J. S., Flick-Smith H. C., Keyser E., Cooper I. A. ... Oyston P. C. F. 2019. Predatory bacteria can protect SKH-1 mice from a lethal plague challenge. Scientific Reports, 9, 1: 7225, <https://doi.org/10.1038/s41598-019-43467-1>

[12] Liu Y., Wang W., Li R., Zhang H. ... Jin Y. 2025. Inhaled predatory bacteria-loaded large porous microspheres to eradicate drug-resistant Pseudomonas aeruginosa from the lung. Materials Today Bio, 31: 101562, <https://doi.org/10.1016/j.mtbio.2025.101562>

[13] Tajabadi F. H., Karimian S. M., Mohsenipour Z., Mohammadi S. ... Feizabadi M. M. 2023. Biocontrol treatment: Application of Bdellovibrio bacteriovorus HD100 against burn wound infection caused by Pseudomonas aeruginosa in mice. Burns, 49, 5: 1181–1195, <https://doi.org/10.1016/j.burns.2022.08.020>

[14] Iebba V., Santangelo F., Totino V., Nicoletti M. ... Schippa S. 2013. Higher prevalence and abundance of Bdellovibrio bacteriovorus in the human gut of healthy subjects. PLOS ONE, 8, 4: e61608, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061608>

[15] Romero-Rivera M., Fernández-de-Bobadilla M. D., Beltrán M., del Campo R. ... Herencias C. 2026. Genome assembly and functional predation analysis of novel Bdellovibrio isolates from human gut microbiota. Frontiers in Microbiology, 17: 1752098, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2026.1752098>

[16] Gupta S., Tang C., Tran M., Kadouri D. E. 2016. Effect of predatory bacteria on human cell lines. PLOS ONE, 11, 8: e0161242, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0161242>

[17] Shatzkes K., Chae R., Tang C., Ramirez G. C. ... Kadouri D. E. 2015. Examining the safety of respiratory and intravenous inoculation of Bdellovibrio bacteriovorus and Micavibrio aeruginosavorus in a mouse model. Scientific Reports, 5: 12899, <https://doi.org/10.1038/srep12899>

[18] Rao Y., Wang Y., Zhang H., Wang Y. ... Chen H. 2024. A strategy of killing two birds with one stone for blocking drug resistance spread with engineered Bdellovibrio bacteriovorus. Advanced Materials, 36, 41: 2406910, <https://doi.org/10.1002/adma.202406910>

[19] Gupta S., Lemenze A., Donnelly R. J., Connell N. D., Kadouri D. E. 2018. Keeping it together: absence of genetic variation and DNA incorporation by the predatory bacteria Micavibrio aeruginosavorus and Bdellovibrio bacteriovorus during predation. Research in Microbiology, 169, 4–5: 237–243, <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2018.03.002>

[20] Tang Y., Chen Y., Qi Y.-D., Yan H.-Y. ... Huang C. 2025. Engineered Bdellovibrio bacteriovorus enhances antibiotic penetration and biofilm eradication. Journal of Controlled Release, 380: 283–296, <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2025.01.075>

[21] Im H., Dwidar M., Mitchell R. J. 2018. Bdellovibrio bacteriovorus HD100, a predator of Gram-negative bacteria, benefits energetically from Staphylococcus aureus biofilms without predation. The ISME Journal, 12, 8: 2090–2095, <https://doi.org/10.1038/s41396-018-0154-5>

[22] Monnappa A. K., Dwidar M., Seo J. K., Hur J.-H., Mitchell R. J. 2014. Bdellovibrio bacteriovorus inhibits Staphylococcus aureus biofilm formation and invasion into human epithelial cells. Scientific Reports, 4: 3811, <https://doi.org/10.1038/srep03811>

Kemijske metode

Čeprav metoda genskega inženirstva ostaja zlati standard, pa kemijske metode omogočajo pripravo duhcev iz mikroorganizmov, pri katerih z genom E posredovana liza ni mogoča, kot so na primer Gram-pozitivne bakterije in kvasovke. Temeljijo na kratki izpostavitvi bakterijskih celic nizkim koncentracijam učinkovin, ki zmotijo integriteto celične membrane, vendar ne porušijo njene celotne strukture. Gre za spojine, kot so: natrijev dodecil sulfat (SDS), natrijev hidroksid (NaOH) in vodikov peroksid (H₂O₂), ki selektivno raztopijo membranske lipide ali pa ošibijo peptidoglikanske povezave. Najbolj uveljavljena kemijska metoda se imenuje »sponge-like protocol«, pri kateri se sproščene citoplazemske vsebine na koncu znebimo s centrifugiranjem [2].

V različnih člankih pa so pozornost namenili tudi pred kratkim razviti metodi, s katero so uspešno pripravili duhce iz bakterije *Salmonella enterica serovar Typhimurium*, ob tem pa nobena celica ni ostala viabilna. Metoda temelji na izpostavitvi celic neionskemu surfaktantu Tween 80 za 24 ur pri 37 °C. Nato za eno uro dodamo mlečno kislino, ki vrednost pH zniža na 3,6 [3]. Tween 80 delno raztopi hidrofobne komponente na zunanji membrani, zaradi česar pride do tvorbe šibkih mest. Zakisanje z mlečno kislino na teh mestih povzroči nastanek lukenj, skozi katere se sprostijo citoplazemske vsebine [2]. Metoda je preprosta, ceno- vno ugodna in zagotavlja večjo varnost produkta, rezultati pa so ponovljivi [3].

Karakterizacija končnega produkta

Uspešen nastanek BGs preverimo z uporabo elektronske mikroskopije, metodami barvanja, biokemijskimi in molekularnimi testi ter z gojitvenimi metodami. Nastali duhci morajo biti votli in imeti ohranjene površinske antigene, zaradi zagotavljanja biološke varnosti pa nobena celica ne sme ostati živa [2].

S presevno elektronsko mikroskopijo (TEM) opazujemo intaktne celice s perforacijami na določenih mestih, ki se morfološko razlikujejo od samo mehansko naluknjanih celic. Z vrstično elektronsko mikroskopijo (SEM) preverimo, ali so ovojnice ostale gladke in neporušene. Z negativnim barvanjem potrdimo, da so duhci zares votli, medtem ko z uporabo barvil, ki se vežejo na nukleinske kisline, preverimo, da zadnje zares niso več prisotne v notranjosti duhcev. S spektrofotometričnimi metodami kvantificiramo sproščene nukleinske kisline in proteine. Ohranjenost antigenih struktur preverimo s poliakrilamidno gelsko elektroforezo z natrijevim dodecil sulfatom (SDS-PAGE) in s prenosom western, z gojitvenimi metodami pa dokončno potrdimo odsotnost živih celic [2].

Bakterijski duhci in imunski sistem

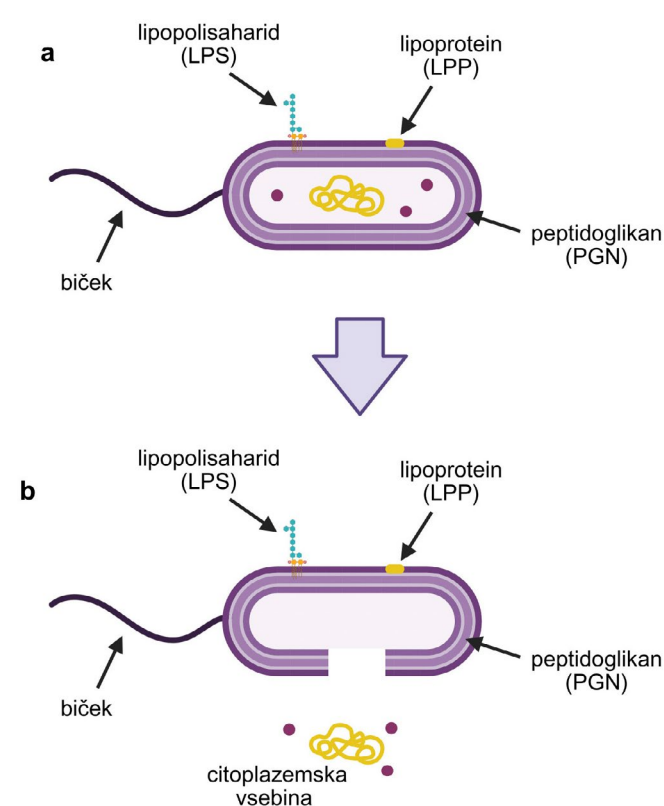
Zaradi natančno nadzorovanega nastanka transmembranskih kanalov, skozi katere se sprostijo citoplazemske vsebine, pa površina BGs po drugi strani ostane nespremenjena. Posledično so na njej ohranjene strukture, ki spodbujajo imunski odziv. To so za patogena značilni molekularni vzorci (*angl.* pathogen-associated molecular patterns; PAMPs), ki jih imunski sistem dojame kot telesu tuje in potencialno nevarne, zato sproži ustrezen odgovor. Pri Gram-negativnih bakterijah med PAMPs uvrščamo strukture, kot so: flagelin v bičku, lipopolisaharid (LPS) v zunanji membrani, lipoprotein (LPP) in peptidoglikan (PGN) v celični steni. Prepoznajo jih celice prirojene imunosti s svojimi receptorji za zaznavanje vzorcev (*angl.* pattern recognition receptors; PRR) [1].

Odziv vodi do dozorevanja antigen predstavitevni celic (APCs), kot so: dendritične celice, makrofagi in limfociti B. Sprostijo se vnetni citokini in dodatne imunske celice, zaradi česar je odziv še močnejši [2].

LPS je odgovoren za postopno aktivacijo toličnega receptorja 4 (TLR4) na APCs. Ob tem pride do aktivacije dveh glavnih signalnih poti. Hitrejša se imenuje od MyD88 odvisna pot, počasnejša pa od MyD88 neodvisna pot. Prva vodi do nastanka vnetnih citokinov, kot so interleukini 1 in 6 (IL-1, IL-6) in dejavnik tumorske nekroze alfa (TNF- α), medtem ko pri drugi nastanejo interferoni tipa 1. Ti citokini spodbujajo in uravnavajo vnetje, privabljajo imunske celice in povzročajo proces programirane celične smrti oziroma apoptoze. Tudi PGN in LPP povzročata nastanek vnetnih citokinov [1].

Bakterijski biček je zgrajen iz proteina flagelin. Ta z aktivacijo različnih receptorjev – tako kot LPS – povzroča nastanek vnetnih citokinov, poleg tega pa spodbuja tudi nastanek inflamasma in proces drugačne oblike programirane celične smrti, ki jo spremlja vnetje, tj. piroptoza [1].

APCs in nekatere epitelijske celice pa so sposobne BGs tudi vnesti v svojo notranjost oziroma internalizirati. Tam pride do razgradnje in obdelave antigenov, ki jih nosijo BGs. Nato jih celice predstavijo na svoji površini prek pglaviti- nih kompleksov tkivne skladnosti tipa I in tipa II (MHC-I, MHC-II). To spodbudi zorenje različnih tipov limfocitov T: celic pomagalk (CD4+) in citotoksičnih celic (CD8+) [1].



Slika 1: Nastanek bakterijskih duhcev. Intaktna bakterijska celica a) in pripravljen bakterijski duhec b), ki ima ohranjene za patogena značilne molekulske vzorce. Opazna je tudi izločena citoplazemska vsebina. Ustvarjeno na BioRender.com.

Bakterijski duhci v biomedicini

BGs imajo velik potencial v biomedicini zaradi svoje biološke varnosti, imunogenosti in praznega prostora v notranjosti, ki ga je mogoče poljubno napolniti z izbranimi učinkovinami. Iz njih lahko izdelamo učinkovita cepiva, adjuvanse in dostavljavce zdravilnih učinkovin [2].

Cepiva in adjuvansi

Cepiva iz BGs imajo številne prednosti pred drugimi. Živa oslajbljena cepiva namreč še vedno predstavljajo tveganje za ponovno vzpostavitev virulence, na primer s povratno mutacijo. Predstavljajo tudi nevarnost za povzročitev bolezni pri imunsko oslajbljenih posameznikih. Kemijsko ali toplotno inaktivirana cepiva pa pogosto niso dovolj imunogena. Toplota ali formaldehid, ki ju uporabljamo za inaktivacijo, namreč poškodujeta antigene na površini celic. Zato moramo inaktiviranim cepivom dodajati različne adjuvanse. To so snovi, ki pomagajo izzvati močnejši imunski odziv. Tem težavam pa se cepiva iz BGs izognejo. Kljub pripravi BGs z genskim inženirstvom pravzaprav ne gre za gensko spremenjene organizme, saj celice niso več žive. Posledično ni nevarnosti za horizontalni genetski prenos in taka cepiva veljajo za biološko varna. Zaradi ohranjenih

PAMPs na svoji površini tudi ugodno spodbujajo delovanje imunskega sistema in zato sama po sebi delujejo kot naravni adjuvansi [2].

S posebnimi postopki pa lahko pripravimo tudi take BGs, ki na svoji površini predstavljajo tuje proteinske antigene. Te lahko poljubno usmerimo na določeno mesto na BGs. To lahko dosežemo z genskim inženirstvom, pri čemer tarčni antigen izrazimo kot fuzijski protein skupaj z nekim značilnim membranskim proteinom. Nespecifično vezavo molekul antigena na notranjo membrano BGs pa dosežemo med koinkubacijo [1].

Kot že povedano, so nekatere celice sposobne internalizacije BGs. To lahko v biomedicini izkoristimo za izdelavo cepiv DNA [1]. V en BG lahko vnesemo do 6.000 kopij plazmidne DNA [2]. Na njej je zapis za poljuben antigen. BGs ščitijo to DNA pred razgradnjo med potovanjem po telesu in hkrati spodbujajo imunski odziv. APCs jih nato internalizirajo in na podlagi DNA izdelajo antigeni protein, nato pa ta tarčni antigen predstavijo na svoji površini. S tem omogočijo, da telo proti njemu razvije ustrezen imunski odziv [1].

Sistemi za tarčno dostavo zdravil

BGs so pravzaprav ovojnice s praznim prostorom v notranjosti. Tega je mogoče napolniti s poljubnimi učinkovinami, kot so na primer kemoterapevtiki. BGs izboljšajo stabilnost kemoterapevtikov in povečajo njihov vnos v tarčne celice [2]. En tak primer so duhci *E. coli* Nissle 1917, ki specifično ciljajo naravna tumorska mikrookolja v črevesju. Posledično lahko v BGs vnesemo tudi nižje odmerke kemoterapevtikov, kot bi jih sicer morali odmeriti pacientom pri navadni kemoterapiji [1].

Sinergistična kemoimunoterapija z bakterijskimi duhci

Izjemno zanimiv pa je tudi vidik izrabe dvojne vloge BGs, ki niso samo pasivni dostavljavci učinkovin. Poleg tega, da na tarčno mesto prinesejo zdravilno učinkovino, kot je kemoterapevtik, ob tem zaradi ohranjenih PAMPs delujejo tudi kot naravni adjuvansi, ki spodbujajo imunski odziv. Zato so zelo primerni za uporabo v sinergistični kemoimunoterapiji, kar so tudi natančno pokazali v članku, objavljenem leta 2024. Govori o poskusu z mišmi, ki so ga izvedli raziskovalci na Kitajskem [4].

Cilj tega poskusa je bil izboljšati zdravljenje pljučnih metastaz raka dojke pri miših, in sicer z uporabo kemoterapevtika paclitaksela, zapakiranega v liposom (LP). Tega so enkapsulirali v BGs *E. coli*, te pa so nato še dodatno obdali z membranami rakavih celic (*angl.* cancer cell membranes; CCMs). Nato so opazovali protirakavi učinek tega pripravek, ki so mu dodelili oznako LP@BG@CCM. Spremljali so tudi odziv imunskega sistema miši [4].

Kaj so CCMs?

Ker navadna kemoterapija ni dovolj specifična, pride do poškodb tudi sicer zdravega tkiva. Raziskovalci so zato razvili strategijo, ki temelji na uporabi s celično membrano pokritih nanodelcev (*angl.* cell membrane-coated nanoparticles; CNPs). Ti delci so obdani s plastjo naravno pridobljenih celičnih membran, na katerih so ohranjene površinske biomolekule izvirnih celic [5].

Izhodiščne celice največkrat pridobimo iz že vzpostavljenih celičnih linij. Nato z mehansko razgradnjo izoliramo celične membrane in z ekstruzijo povzročimo, da se organizirajo okrog izbranih nanodelcev [5].

En tak primer so CCMs. Posnemajo površinske lastnosti rakavih celic, katerih značilnost je visoka afiniteta za medsebojno adhezijo, kar sicer spodbuja razvoj tumorja in nastanek metastaz. Ravno zaradi te sposobnosti homotipične vezave so delci, obdani s CCMs, primerni za tarčno dostavo kemoterapevtikov [5]. Ker pa so na CCMs prisotne tudi naravne molekule rakavih celic, ki zavirajo imunski odziv, so takšni delci pogosto slabo imunogeni [4]. Zato za boljšo imunostimulacijo v notranjost CCMs dodamo tudi adjuvanse [5]. V poskusu iz članka so kitajski raziskovalci povezali ravno to dvojce.

Izvedba poskusa

Kemoterapevtik paclitaxel so najprej s preprostim postopkom enkapsulacije zapakirali v liposome. BGs so pripravili z metodo genskega inženirstva, nato pa so zaradi dodatne varnosti še z gentamicinom uničili morebitne preostale žive celice. CCMs so pripravili iz rakavih celic celične linije 4T1. Liposome s paclitaxelom so v BGs vnesli z elektroporacijo, nastale skupke pa so v CCMs vnesli z ekstruzijo [4]. Uspešen nastanek pripravka LP@BG@CCM so preverili z opazovanjem morfologije s TEM in z merjenjem potenciala zeta. Zadnjega določa najbolj zunanja ovojnica. Ker je bil zelo podoben potencialu zeta samih CCMs, so lahko potrdili uspešnost enkapsulacije. S SDS-PAGE in prenosom western so preverjali, ali sta se med pripravo na CCMs ohranila značilna membranska proteina CD44 in CD47 [4]. Mišim so injicirali celice 4T1 in opazovali razvoj tumorjev pljučnega tkiva. Nato so izbrali bolne miši in jih naključno razvrstili v skupine. Nato so jim injicirali različne pripravke: fiziološko raztopino s fosfatnim pufrom (PBS), samo LP, samo BGs, LP v BGs (LP@BG) in LP v BGs v CCM (LP@BG@CCM). Po 23 dneh so miši žrtvovali in jim odvzeli pljuča ter vranice za nadaljnje preiskave. Naštete pripravke so prav tako zmešali s celicami 4T1 v 96-vdolbinskih ploščah z namenom opazovanja zaviralnega učinka na rakave celice in vitro. [4].

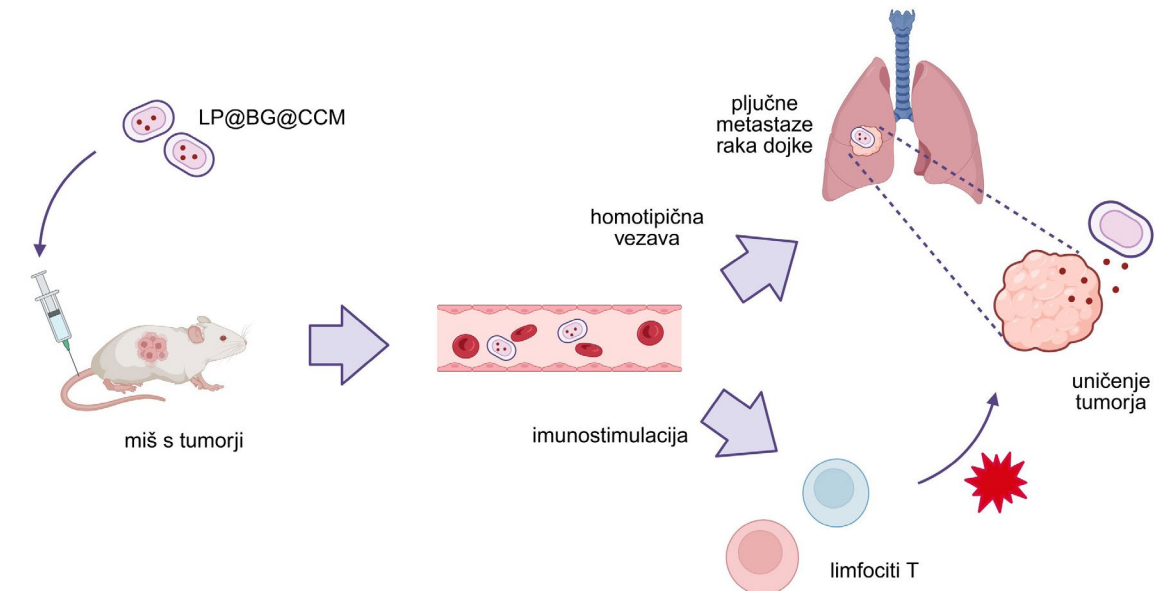
Pomembne ugotovitve poskusa

Protirakavi učinek in vitro je bil največji pri mešanici rakavih celic in LP@BG@CCM. Količina 8 $\mu\text{mol/L}$ paclitaksela v notranjosti pripravka je skoraj popolnoma zavrla rast celic 4T1. Zaradi svoje sposobnosti homotipične vezave je bil pripravek LP@BG@CCM najdovzетnejši za vnos v celice 4T1 in je posledično tudi najbolj učinkoval nanje [4]. Pljuča prej bolnih miši, ki so jim injicirali LP@BG@CCM, so bila po videzu, volumnu in po teži izjemno podobna zdravim. Prav tako so tu dokazali izrazito povečanje apoptoze rakavih celic. Z encimskoimunskim testom (ELISA) so v teh pljučih zaznali tudi povišane ravni vnetnih citokinov, kar so pripisali imunostimulacijskemu vplivu PAMPs s površine BGs [4].

V vranicah miši, ki so prejele LP@BG@CCM, so s pretočno citometrijo zaznali najvišje količine različnih podtipov limfocitov T – CD4+ in CD8a+. To so pripisali sinergističnemu učinku komponent v pripravku pa tudi velikemu številu propadlih rakavih celic, ki na svoj način prav tako spodbujajo imunski odziv. Končni pripravek je torej v miših spodbudil največji imunski odziv v primerjavi z drugimi [4].

Glavni organi, kot so jetra, srce in ledvice, so ostali nespremenjeni tudi ob večkratnem vnosu pripravka LP@BG@CCM, kar podpira sklep, da je to zdravilo varno [4].

Članek so raziskovalci sklenili z mislijo, da sta navadna kemoterapija in bakterijska imunoterapija sicer lahko učinkoviti v smislu protirakavega učinka, vendar ob povišanih odmerkih tudi zelo toksični. Po drugi strani pa imajo prenizki odmerki pogosto premajhen protirakavi učinek. Z razvojem pripravka LP@BG@CCM jim je uspelo združiti prednosti kemoterapije in tudi bakterijske imunoterapije v sinergističen sistem. Z uvedbo komponente CCM pa so zagotovili tarčno delovanje tega pripravka, zato menijo, da ima LP@BG@CCM velik potencial za zdravljenje pljučnih metastaz raka dojke [4].



Slika 2: Sinergistična kemoimunoterapija z bakterijskimi duhci. Ustvarjeno na BioRender.com.

Zaključek

Spoznali smo, da imajo BGs velik potencial za zanimive načine uporabe v biomedicini. Ker ne gre več za žive bakterijske celice, so to biološko varni pripravki. Lahko jih napolnimo z različnimi izbranimi učinkovinami, zaradi česar imajo zelo širok spekter uporabnosti. Zaradi ohranjenih PAMPs učinkovito spodbujajo imunski odziv, kar lahko izkoristimo pri cepivih in tumorski imunoterapiji. BGs torej hkrati igrajo dve pomembni vlogi; dostavo učinkovin in imunostimulacijo. Raziskovalcem na Kitajskem je leta 2024 uspelo združiti dobre lastnosti BGs s kemoterapijo in to uporabiti pri tarčnem zdravljenju pljučnih metastaz raka dojke pri miših. Nadaljnje raziskave bodo pomembne za prenos teh ugotovitev v klinično prakso, prav tako pa bodo mogoče ponudile nove možnosti uporabe BGs še na drugih področjih.

- [1] Chen H., Ji H., Kong X., Lei P. ... Sun D. 2021. Bacterial Ghosts-Based Vaccine and Drug Delivery Systems. *Pharmaceutics*, 13, 11: 1892. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13111892>
- [2] Hetta H. F., Mwafey I. M., Ellah N. H. A., Alanazi F. E. in Ramadan Y. N. 2026. Bacterial ghosts (BGs): A promising approach as candidate vaccine. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 42, 69. <https://doi.org/10.1007/s11274-026-04783-7>
- [3] Rabaa S., Salem-Bekhit M. M., Alanazi F. K., Yassin A. S. ... Hashem A. E. M. 2018. A novel protocol for bacterial ghosts' preparation using Tween 80. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 26, 2: 232–237. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2017.12.006>
- [4] Ling D., Jia X., Wang K., Yan Q. ... Jin Y. 2024. Cancer cell membrane-coated bacterial ghosts for highly efficient paclitaxel delivery against metastatic lung cancer. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 14, 1: 365–377. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2023.08.012>
- [5] Fang R. H., Gao W. in Zhang L. 2023. Targeting drugs to tumours using cell membrane-coated nanoparticles. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 20: 33–48. <https://doi.org/10.1038/s41571-022-00699-x>

REGULATORNE CELICE T

in njihove biomedicinske aplikacije

Martin Steblovnik¹

¹ Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije, Jamnikarjeva 101, 1000 Ljubljana

Ključne besede: regulatorne celice T, FOXP3, avtoimunost

IZVLEČEK

Eden največjih izzivov sodobne medicine je zdravljenje avtoimunskih bolezni, ki izrazito negativno vplivajo na kakovost življenja in pričakovano življenjsko dobo obolelih, zanje pa večinoma še ne poznamo metod zdravljenja. Regulatorne celice T ali celice Treg so vrsta limfocitov T oz. celic T, katerih naloga je zaviranje drugih vrst imunskih celic, ki kot antigene prepoznavajo telesu lastne molekule in s tem preprečujejo nastanek avtoimunskih obolenj. Diferenciacijo predniških limfocitov v celice Treg pogojuje selektivna ekspresija transkripcijskega faktorja *FOXP3*, nastali limfociti pa uravnavajo imunski odziv na različne načine. Kot ključni regulatorji avtoimunosti imata njihovo razumevanje in uporaba ogromen terapevtski potencial. V članku predstavljam pot do odkritja celic Treg, način, na katerega uravnavajo imunski sistem, in njihovo potencialno uporabo pri zdravljenju nekaterih najbolj problematičnih sodobnih bolezni.

Uvod

Začetki poznavanja regulatornih celic T (celic Treg) izvirajo iz raziskovanja vpliva odstranitve priželjca na razvoj novorojenih miši. Že leta 1969 sta Nishizuka in Sakakura poročala o razvoju avtoimunske bolezni, ki je zavrila razvoj jajčnikov pri samicah, na katerih so pri starosti treh dni izvedli timektomijo, s tem pa nakazala na obstoj mehanizma, ki izhaja iz priželjca in zavira imunski odziv na telesu lastne antigene [1]. Leta 1995 je Shimon Sakaguchi s skupino identificiral posebno podskupino limfocitov T CD4+, ki izražajo α -verigo receptorja za interleukin-2 (IL-2), imenovano tudi CD25. Odstranitev te skupine limfocitov CD4+CD25+ je pri miših povzročila huda avtoimunska obolenja, ponoven vnos teh celic pa je zavrl avtoimunski odziv [2]. Sčasoma se je za to skupino celic uveljavilo poimenovanje regulatorne celice T, ostajala pa je dilema, kako jih nedvoumno identificirati, saj se izražanje CD25 poveča pri vseh aktiviranih celicah T. Tako (še) ni bilo mogoče z gotovostjo trditi, da gre za v celoti različno podskupino celic in ne le za stanje njihove aktivacije [3].

Fenotip *scurfy* in *FOXP3*

Leta 1949 se je v mišji koloniji laboratorija za genetiko sesalcev na Nacionalnem laboratoriju v Oak Ridgeu v ZDA spontano pojavila mutacija, ki so jo poimenovali *scurfy* (*sf*) oz. model luskaste miši. Miši iz te linije so imele luskasto, nagubano kožo, pordele oči, povečano vranico in bezgavke ter so predčasno poginile (po približno treh tednih). Linijo so sprva preučevali za namene raziskovanja na spolne kromosome vezanega dedovanja, saj je bila mutacija vezana na X-kromosom [4]. Šele po izvedbi prvih imunoloških študij linije so ugotovili, da je vzrok dramatične patologije linije *sf* avtoimunska reakcija – napad imunskih celic miši na lastna tkiva [5].

Dejstvo, da je bil fenotip vezan na X-kromosom, je omejilo število kandidatov za gene, katerih okvara bi lahko povzročila fenotip *sf*. Ekipa pod vodstvom Mary Brunkow je število kandidatov uspela skržiti na 20, prav dvajseti analizirani gen, ki so ga poimenovali ‘*forkhead box P3*’ (*FOXP3*), pa je bil tisti, na katerem je 2 bp velika insercija povzročila izgubo funkcije proteina in fenotip *sf* [6]. Hkrati je ista raziskovalna ekipa identificirala ortologni človeški gen *FOXP3* in pokazala, da mutacije v tem genu pri človeku povzroča sindrom IPEX (*Immune dysregulation, Polyendocrinopathy, Enteropathy, X-linked*). Gre za resno bolezensko stanje, ki se začne kazati že v otroštvu, najpogostejše prek avtoimunskih obolenj črevesja in endokrinih žlez ter kožnih vnetij, povzroča pa lahko tudi avtoimunske citopenije (zmanjšanja števila krvnih celic), bolezni jeter in ledvic ter alergije [7]. Mutacije v mišjem in človeškem genomu povzročajo avtoimunske obolenje [8].

Leta 2003 so tri različne raziskovalne skupine objavile članke, ki so protein FOXP3 identificirali kot specifični marker pa tudi transkripcijski faktor regulatornih celic T v miših. Ugotovili so, da sta raven ekspresije proteina FOXP3 in količina *FOXP3* mRNA v celicah Treg visoka, hkrati pa sta *in vitro* transdukcija retroviralnega ekspresijskega vektorja s *FOXP3* v CD4+CD25- celice T ali in vivo ekspresija transgena v celicah T povzročili pojav fenotipa Treg [9–11]. Podobno vlogo gena *FOXP3* pri človeških celicah Treg so potrdili Yagi in sodelavci leto pozneje, ko so z retroviralnim prenosom gena *FOXP3* pri CD4+CD25- celicah dosegli spremembo fenotipa v podobnega Treg [12].

Za svoja odkritja na področju periferne imunske tolerance pri raziskovanju celic Treg so Mary Brunkow, Fred Ramsdell in Shimon Sakaguchi leta 2025 prejeli Nobelovo nagrado za fiziologijo ali medicino [13].

Diferenciacija regulatornih celic T

Celice Treg v osnovi delimo na dve podskupini. Prva so timusne regulatorne celice T (imenujemo jih tTreg ali tudi naravne celice oz. celice nTreg). Njihova diferenciacija se zgodi v priželjcu in je odvisna od jakosti interakcije peptida lastnega izvora (*angl.* self-peptide) na kompleksu MHC II (*angl.* major histocompatibility complex II) antigen-predstavitvene celice (APC) in T-celičnega receptorja (TCR) nediferencirane CD4+ celice T [3]. Proces poteka v dveh fazah. V korteksu priželjca potečeta zaznava in sprožitev apoptoze celic z močno interakcijo s korteksnimi epitelnimi celicami priželjca (cTEC), ki na MHC II nosijo peptide lastnega izvora in v tem primeru delujejo kot APC. Preostale celice potujejo v medulo priželjca, v kateri kot APC delujejo medularne epitelne celice priželjca (mTEC) s peptidi lastnega izvora na MHC II. V tem primeru močna interakcija sproži diferenciacijo v celico Treg, šibka pa v konvencionalno CD4+ celico T. V obeh korakih kot APC lahko delujejo tudi specializirane dendritične celice (DC), za uspešno diferenciacijo v celico Treg pa mora spremljati tudi signalizacija z IL-2 [14,15].

Druga podskupina so periferne regulatorne celice T (pTreg ali tudi inducirane celice oz. celice iTreg), ki se razvijejo v tkivih zunaj priželjca oz. perifernih limfatičnih organih po emigraciji konvencionalnih CD4+ celic T iz priželjca ob tolerogenih pogojih, torej takih, v katerih imunski sistem favorizira imunske toleranco, ne pa sprožitve vnetnega odziva [3]. Ključni vpliv na diferenciacijo imata citokina

IL-2 in TGF- β (transformirajoči rastni faktor beta, *angl.* transforming growth factor beta); oba delujeta posredno in povečujeta ekspresijo FOXP3, vendar prek različnih signalnih poti [14]. Tudi pri nastanku celic pTreg je nujna povišana jakost interakcije med kompleksom MHC II na APC (v tem primeru je to DC) in receptorjem TCR na naivni CD4+ celici T, a tokrat so v MHC II predstavljeni telesu tuji antigeni. Najpogostejše so to alergeni, antigeni iz hrane in antigeni, povezani s komenzalno mikrobioto v telesu [14, 15].

Mehanizmi delovanja regulatornih celic T

Celice Treg zavirajo vnetne reakcije na veliko različnih načinov, ki so različno dobro raziskani in opisani, ni pa poznan univerzalni mehanizem, ki bi bil odgovoren za vsako izmed njihovih supresorskih funkcij [3]. Kljub temu pa sta za njihovo supresorsko aktivnost ključnega pomena stimulacija T celičnih receptorjev [16] in stimulacija z IL-2 [17].

V preglednem članku iz leta 2008 Vignali in sodelavci poudarjajo štiri osnovne načine delovanja celic Treg, in sicer: **i)** proizvodnjo inhibitornih citokinov, ki zavirajo delovanje efektorskih celic T v tkivu; **ii)** proizvodnjo proteinov granzima A in granzima B, ki povzročita citolizo efektorskih celic T; **iii)** ustvarjanje motenj v metabolizmu, ki vodijo do apoptoze efektorskih celic T; **iv)** targetiranje dendritičnih celic z mehanizmi, ki vplivajo na njihovo zorenje in delovanje [18]. Pomembno je poudariti, da je vzpostavljanje lokalne imunske supresije kompleksnejše in efektorske celice T niso edina tarča celic Treg, ampak delujejo tudi na druge imunske celice, kot so celice B in naravne celice ubijalke (celice NK) [19].

V novejšem preglednem članku iz leta 2025 Wardell in sodelavci delovanje celic Treg razdelijo na tri faze. V prvi fazi so tarča njihovega delovanja antigen-predstavitvene celice (APC), npr. dendritične celice. Celice Treg se z lastnim TCR vežejo na kompleks MHCI na APC, hkrati pa se njihovi membranski proteini, na primer CTLA4, preferenčno vežejo na kostimulatorne proteine CD80 in CD86 na APC. S tem celica Treg blokira vezavna mesta za aktivacijo efektorskih celic T in njihov kostimulatorni receptor CD28. Poleg tega ob sprostitvi z APC celica Treg odstrani kompleks MHC-antigen in kostimulatorne proteine, kar dodatno zmanjša zmožnost aktivacije efektorskih celic T. Ta faza se odvija zlasti v sekundarnih limfatičnih organih, na primer v bezgavkah [20, 21].

V drugi fazi poteka ustvarjanje supresivnega mikrookolja. Celice Treg v tej fazi delujejo po mehanizmi, navedenih v točkah i), ii) in iii) dva odstavka prej. Njihova glavna tarča so efektorske celice T v tkivu. Glavna protivnetna citokina, ki ju proizvajajo, sta IL-10, ki ga celice Treg sproščajo v okolje, in TGF-β, ki ga z različnimi mehanizmi, na primer z delovanjem integrina αβ8, pretvarjajo iz latentne oblike v aktivno. Hkrati ta citokina tudi inhibirata APC in promovirata ekspresijo *FOXP3* [20]. Glavna metabolna sprememba, s katero celice Treg zavirajo aktivnost efektorskih celic T, je posledica povečane ekspresije CD25 (oz. α-podenote receptorja za IL-2). Ta se s podenotama β in γ poveže v trimerni receptor, ki ima več kot 100-krat večjo afiniteto vezave IL-2 kot dimerni receptor samo iz podenot β in γ, ki je prisoten na efektorskih celicah T. Tako celice Treg delujejo kot »ponori« IL-2, ki je nujno potreben za preživetje efektorskih celic T [20, 22]. Celice prav tako izražajo ektonukleotidazi CD39 in CD73, ki pretvarjata zunajcelični ATP v adenzin, ki ima imunosupresivni učinek [20]. Tretja faza je povezana z ustvarjanjem dolgotrajne imunske tolerance, tako da celice Treg spodbujajo nalezljivo toleranco (*angl.* infectious tolerance). Gre za pojav, pri katerem celice Treg inducirajo ekspanzijo drugih celic Treg ali povzročijo diferenciacijo efektorskih celic T v celice Treg. Tako se dolgoročno spremeni razmerje efektorskih in regulatornih celic T v tkivu, kar povzroči višjo dolgoročno odpornost tkiva na avtoimunske reakcije [20]. Celice Treg sproščajo tudi mediatorske molekule, ki v telesu pripomorejo k obnovi tkiv. Ob zaznavi poškodbe pljučnega tkiva s prepoznavo značilnih citokinov začnejo proizvajati amfiregulin (AREG), ki stimulira regeneracijo tega tkiva [23]. Prav tako z mediatorjem CCL3 (*angl.* Cellular Communication Network Factor 3) spodbujajo diferenciacijo oligodendrocitov in ponovno mielinizacijo živčnega tkiva [24].

Biomedicinske aplikacije regulatornih celic T Avtoimunske bolezni

Celice Treg so zaradi svojega delovanja kot zaviralci avtoimunskih reakcij zanimiv kandidat za zdravljenje ali lajšanje avtoimunskih obolenj. Pojavnost avtoimunskih obolenj se povečuje – v svetovnem merilu gre za tretjo najpogostejšo kategorijo obolenj za rakom in srčnimi obolenji [25]. Pri več avtoimunskih boleznih so celice Treg okvarjene ali je njihovo število zmanjšano, kar povzroči zmanjšanja imunske tolerance in imunskega odziva proti organizmu lastnim celicam [19].

Revmatoidni artritis

Revmatoidni artritis (RA) je kronična bolezen, pri kateri imunski sistem napade sinovialno ovojnico sklepov in lahko pripelje do trajnih deformacij sklepov. Pri bolezni je značilna izguba ravnovesja med številom efektorskih in regulatornih celic T [26]. Pri razvoju novih terapevtskih pristopov zato znanstveniki iščejo načine, kako ponovno vzpostaviti to ravnovesje, zlasti s presaditvijo ex vivo gojenih celic Treg ali z učinkovinami, kot so analogi IL-2, ki stimulirajo njihovo rast in diferenciacijo v organizmu [19, 26]. Prav tako so nizko število CD4+CD25+ celic T zaznali pri pacientih s sladkorno boleznijo tipa 1 (T1D), pri kateri imunski sistem napade celice β trebušne slinavke, ki proizvajajo inzulin [27]. Zvišano delovanje celic Treg ali njihovo večje število se je izkazalo za faktor, ki lahko zavre ali odloži pojav T1D in vzdržuje normalno raven glukoze v krvi [19]. Pri multipli sklerozi (MS) CD4+ celice T in celice B napadejo osrednji živčni sistem, pride do demielinizacije, poškodb aksonov in vnetja. V mišjem modelu MS lahko terapija z antigen-specifičnimi celicami Treg prepreči pojav bolezni [28].

Rak

Če je pri avtoimunskih obolenjih težava prenizka aktivnost celic Treg, ki ne zavrejo imunske prepoznave telesu lastnih celic, je pri raku slika nasprotna – (pre)močno delovanje celic Treg lahko pripelje do tega, da imunski sistem ne prepozna nastajajočih tumorjev in jih ne uniči [19]. Glede na tip tumorjev (trdni ali hematološki) se delovanje celic Treg razlikuje, prognoza pa je pri različnih tipih raka ob njihovem povečanem številu ali aktivnosti različna [19]. Pri trdnih tumorjih celice Treg delujejo predvsem prek citokinov, zlasti IL-10 in TGF-β, in povzročijo supresijo protitumorske imunosti, pri hematoloških rakah pa neposredno zavirajo celice B in celice NK ali spreminjajo diferenciacijo mieloidnih celic. To bi lahko vplivalo na mikrookolje v kostnem mozgu in promoviralo preživetje levkemičnih matičnih celic [19].

Presaditev organov

Kot zaviralci imunskega odziva so celice Treg zanimiv kandidat za terapijo, ki bi po presaditvi organov ustvarila imunosupresivno okolje in zmanjšala potrebo po imunosupresivih, ki lahko povzročajo neželene stranske učinke [19]. Pri presaditvah ledvic, jeter in srca sta aktivnost in število celic Treg povezana z nižjo stopnjo zavrnitve in boljšim preživetjem presadka [29–31]. Terapija s celicami Treg s himernim antigenskim receptorjem (CAR-Treg) še posebej

v kombinaciji z rapamicinom dolgoročno zmanjša potrebo po jemanju imunosupresivov in poveča uspešnost presaditve srca [32]. Celice Treg predstavljajo tudi obetavno terapijo za bolezen presadka proti gostitelju (*angl.* graft versus host disease, GvHD). Gre za zaplet, ki se pojavi po alogenski presaditvi matičnih celic ali kostnega mozga, na primer pri zdravljenju agresivnih krvnih rakov, pri katerem imunske celice presadka (oz. donorja) napadejo tkiva prejemnika. Idejo, da bi z uporabo donorjevih celic Treg lahko zavrla delovanje donorjevih imunskih celic pri GvHD, podpirajo tudi rezultati zgodnjih kliničnih preizkusov [33].

Druge bolezni

Celice Treg igrajo vlogo tudi pri različnih drugih obolenjih – motnjah metabolizma, srčno-žilnih obolenjih in nevrodegenerativnih boleznih. Obstajajo povezave med številom in/ali aktivnostjo celic Treg in sladkorno boleznijo tipa 2 (T2D), debelostjo in z njo povezanimi metabolnimi motnjami, aterosklerozo, s srčnim infarktom, z amiotrofno lateralno sklerozo (ALS) ter z Alzheimerjevo in s Parkinsonovo boleznijo [19].

Zaključek

Regulatorne celice T so CD4+CD25+ limfociti T, za njihovo diferenciacijo pa je ključen transkripcijski faktor *FOXP3*. Njihova vloga v organizmu je preprečevanje avtoimunskih reakcij. Ločimo timusne in periferne celice Treg, ki se razlikujejo glede na nastanek in vlogo v telesu. Po prepoznavi antigena celice Treg zavirajo delovanje drugih imunskih celic, zlasti efektorskih celic T in antigen-predstavitvenih celic, ustvarjajo imunosupresivno okolje in proizvajajo mediatorje obnove tkiv. Modulacija njihovega delovanja predstavlja obetavno terapevtsko sredstvo ne le za avtoimunske bolezni, ampak tudi za rakasta obolenja, preprečevanje zavrnitve presadkov in več drugih skupin bolezni.

- [1] Nishizuka Y., Sakakura T. 1969. Thymus and reproduction: Sex-linked dysgenesis of the gonad after neonatal thymectomy in mice. *Science*, 166(3906): 753–755
- [2] Sakaguchi S., Sakaguchi N., Asano M., Itoh M., Toda M. 1995. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *The Journal of Immunology*, 155: 1151–1164
- [3] Plitas G., Rudensky A. Y. 2016. Regulatory T cells: Differentiation and function. *Cancer Immunol Res*, 4(9): 721–725, doi:10.1158/2326-6066
- [4] Russell W. L., Russell L. B., Gower J. S. 1959. Exceptional inheritance of a sex-linked gene in the mouse explained on the basis that the X/O sex-chromosome constitution is female. *Genetics*, 45(4): 554–560
- [5] Godfrey V. L., Wilkinson J. E., Russell L. B. 1991. X-linked lymphoreticular disease in the scurfy (sf) mutant mouse. *American Journal of Pathology*, 138: 1379–1387
- [6] Brunkow M. E., Jeffery E. W., Hjerrild K. A., Paepfer B. ... Ramsdell F. 2001. Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfy, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nature Genetics*, 27: 68–73, https://doi.org/10.1038/83784
- [7] Verbsky J. W., Chatila T. A. 2013. Immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked (IPEX) and IPEX-related disorders: An evolving web of heritable autoimmune diseases. *Current Opinion in Pediatrics*, 708–714, doi: 10.1097
- [8] Wildin R. S., Ramsdell F., Peake J., Faravelli F. ... Ochs H. D. 2001. The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nature Genetics*, 27: 20–21
- [9] Fontenot J. D., Gavin M. A., Rudensky A. Y. 2003. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nature Immunology*, 4(4): 330–336, doi:10.1038/ni904
- [10] Hori S., Nomura T., Sakaguchi S. 2003. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science*, 299: 1057–1062
- [11] Khattri R., Cox T., Yasayko S. A., Ramsdell F. 2003. An essential role for Scurfin in CD4+CD25+T regulatory cells. *Nature Immunology*, 4(4): 337–342. doi:10.1038/ni909
- [12] Yagi H., Nomura T., Nakamura K., Yamazaki S. ... Sakaguchi S. 2004. Crucial role of FOXP3 in the development and function of human CD25+CD4+ regulatory T cells. *Int Immunol*, 16(11): 1643–1656, doi:10.1093/intimm/dxh165
- [13] Singh K. Regulatory T cells: the 2025 Nobel prize in physiology or medicine. 2026. *Ups J Med Sci*, 131:1–2. doi:10.48101/ujms.v131
- [14] Josefowicz S. Z., Lu L. F., Rudensky A. Y. 2012. Regulatory T cells: Mechanisms of differentiation and function. *Annual Review of Immunology*, 531–564, doi:10.1146/annurev.immunol
- [15] Li M. O., Rudensky A. Y. 2016. T cell receptor signalling in the control of regulatory T cell differentiation and function. *Nature Reviews Immunology*, 220–233, doi:10.1038/nri.2016.26
- [16] Levine A. G., Arvey A., Jin W., Rudensky A. Y. 2014. Continuous requirement for the TCR in regulatory T cell function. *Nat Immunol*, 15(11):1070–1078. doi:10.1038/ni.3004
- [17] Chinen T., Kannan A.K., Levine A.G., Fan X. ... Rudensky A. Y. 2016. An essential role for the IL-2 receptor in T reg cell function. *Nat Immunol*, 17(11): 1322–1333. doi:10.1038/ni.3540
- [18] Vignali D. A. A., Collison L. W., Workman C.J. 2008. How regulatory T cells work. *Nat Rev Immunol*, 8(7): 523–532, doi:10.1038/nri2343
- [19] Wang L., Liang Y., Zhao C., Ma P. ... Shi Y. 2025. Regulatory T cells in homeostasis and disease: molecular mechanisms and therapeutic potential. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, doi:10.1038/s41392-025-02326-4
- [20] Wardell C. M., Boardman D. A., Levings M.K. 2025. Harnessing the biology of regulatory T cells to treat disease. *Nature Reviews Drug Discovery*, 93–111, doi:10.1038/s41573-024-01089-x
- [21] Akkaya B., Oya Y., Akkaya M., Al Souz J. ... Shevach E. M. 2019. Regulatory T cells mediate specific suppression by depleting peptide–MHC class II from dendritic cells. *Nat Immunol*, 20(2): 218–231, doi:10.1038/s41590-018-0280-2
- [22] Wang X., Rickert M., Christopher Garcia K. 2005. Structure of the quaternary complex of interleukin-2 with its a, b, and g c receptors. *Science*, 310: 1159–1163
- [23] Arpaia N., Green J. A., Molledo B., Arvey A. ... Rudensky A. Y. 2015. A distinct function of regulatory T cells in tissue protection. *Cell*, 162(5): 1078–1089, doi:10.1016/j.cell.2015.08.021
- [24] Dombrowski Y., O’Hagan T., Dittmer M., Penalva R. ... Fitzgerald D. C. 2017. Regulatory T cells promote myelin regeneration in the central nervous system. *Nat Neurosci*, 20(5): 674–80, doi:10.1038/nn.4528
- [25] Zeng S. Q., Zhen J. H., Pu Y., Liu C. ... Dong W. G. 2025. Global, regional, and national burden of autoimmune disease in older adults (≥60 years) from 1990 to 2021: Results from the Global Burden of Disease Study 2021. *Journal of Nutrition, Health and Aging*, 29(11), doi:10.1016/j.jnha.2025.100681 .
- [26] Li X., Xu H., Huang J., Luo D. ... Xiao C. 2021. Dysfunctions, molecular mechanisms, and therapeutic strategies of regulatory T cells in rheumatoid arthritis. *Frontiers in Pharmacology*, doi:10.3389/fphar.2021.716081
- [27] Kukreja A., Cost G., Marker J., Zhang C. ... Maclaren N. 2002. Multiple immuno-regulatory defects in type-1 diabetes. *Journal of Clinical Investigation*, 109(1): 131–140, doi:10.1172/jci200213605
- [28] Pohar J., O’Connor R., Manfroi B., El-Behi M. ... Fillatreau S. 2022. Antigen receptor-engineered Tregs inhibit CNS autoimmunity in cell therapy using nonredundant immune mechanisms in mice. *Eur J Immunol*, 52(8):1335–1349, doi:10.1002/eji.202249845
- [29] Ni X., Wang Q., Gu J., Lu L. 2021. Clinical and basic research progress on Treg-induced immune tolerance in liver transplantation. *Frontiers in Immunology*, doi:10.3389/fimmu.2021.535012
- [30] Huang D. L., He Y. R., Liu Y. J., He H. Y. ... Ju M. J. 2023. The immunomodulatory role of Th17 and Treg in renal transplantation. *Frontiers in Immunology*, doi:10.3389/fimmu.2023
- [31] Fisher J. D., Balmert S. C., Zhang W., Schweizer R. ... Little S. R. 2019. Treg-inducing microparticles promote donor-specific tolerance in experimental vascularized composite allotransplantation. *PNAS*, 116(51): 25784–25789, doi:10.1073/pnas.1910701116/-/DCSupplemental
- [32] Wagner J. C., Ronin E., Ho P., Peng Y., Tang Q. 2022. Anti-HLA-A2-CAR Tregs prolong vascularized mouse heterotopic heart allograft survival. *American Journal of Transplantation*, 22(9):2237–2245, doi:10.1111/ajt.17063
- [33] Lysandrou M., Kefala D., Vinnakota J. M., Savvopoulos N. ... Spyridonidis A. 2025. Regulatory T cell therapy for Graft-versus-host disease. *Bone Marrow Transplantation*. Springer Nature, 933–939, doi:10.1038/s41409-025-02553-x

INTERVJU

z izr. prof. dr. Cenetom Gostinčarjem

Dr. Cene Gostinčar je raziskovalec in izredni profesor na Oddelku za biologijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani. Njegovo raziskovalno delo sega na področja molekularne biologije, genomike in bioinformatike, osredinja pa se predvsem na glive iz ekstremnih okolij in njihove prilagoditve. Poleg raziskovalnega in pedagoškega dela sodeluje tudi v javnih razpravah o znanstvenih in širših družbenih vprašanjih.

V intervjuju smo se dotaknili njegove raziskovalne poti in dela z glivami iz ekstremnih okolij, nato pa zašli tudi precej dlje od laboratorija. Govorili smo o možnostih življenja zunaj Zemlje, odprti znanosti, etičnih vprašanjih genskega inženirstva in o tveganjih, ki jih prinaša razvoj sodobne biotehnologije. Pogovor je zajel tudi vlogo znanosti v družbi, znanstveno fantastiko ter prikaz znanosti v filmih in serijah.

Raziskovalno se ukvarjate predvsem z glivami iz ekstremnih okolij. Kako ste se usmerili v to raziskovalno področje? Ali so vas glive in ekstremna okolja zanimali že od začetka raziskovalne poti ali se je to zanimanje razvilo pozneje?

»To se je pojavilo zelo zgodaj in pravzaprav precej po naključju. Mislim, da ima danes veliko mladih precej dobre predstave o tem, kaj si želijo v karieri. Jaz nisem bil tak in mislim, da smo bili tudi sicer v moji generaciji glede tega mogoče nekoliko bolj izgubljeni.

Ko je prišel čas za diplomsko delo – takrat smo imeli še štiriletni študij, ki smo ga končali z nekoliko obsežnejšim diplomskim delom –, smo šli z nekaj kolegicami in kolegi na fakulteti do več profesorov in profesorjev ter jih povprašali, ali je pri njih mogoče opravljati diplomsko delo in katere teme so na voljo. Zbrali smo nekaj informacij, nato pa se je vsak odločil za eno izmed možnosti.

Jaz sem se takrat odločil za diplomsko delo pri svoji poznejši mentorici, profesorici Gunde - Cimerman, in tako so glive ekstremnih okolij postale tudi moje izbrano področje. Pozneje sem v isti skupini dobil tudi mesto mladega raziskovalca. Ta mesta so se takrat podeljevala precej drugače kot danes, vendar je bil rezultat podoben – redna zaposlitev do doktorata.

Po doktoratu sem bolj ali manj nadaljeval v isti raziskovalni skupini, pa čeprav na različnih pogodbah in pri različnih delodajalcih. Začetek je bil torej zelo naključen, potem pa sem vztrajal, ker je tematika zelo fina in zanimiva.«

Tudi razmere v vesolju so za zemeljske organizme izrazito ekstremne. Kaj vemo o vplivu mikrogravitacije in omejene dostopnosti kisika na rast in delovanje gliv?

»Tukaj moramo pravzaprav ločiti dve stvari. Eno je medplanetarni prostor, v katerem je gravitacije zelo malo, v izpostavljenih predelih pa vlada vakuum.

Ne gre torej samo za pomanjkanje kisika, ampak za pomanjkanje tlaka, zaradi česar se organizmi izsušijo in običajno tudi zamrznejo. Večina vesolja je zelo mrzla.

Drugače je, če je organizem v notranjosti meteorita ali vesoljske kapsule, ki jo izstrelimo v vesolje, ker je v njej atmosfera, in tako naprej. Tudi razmere na planetih in njihovih lunah so izjemno raznolike. To poznamo že iz našega Osončja, v katerem imamo planete z izjemno različnimi povprečnimi temperaturami, zelo različne pa so lahko tudi njihove lune. Raznolika je tudi kemijska sestava. Zato težko govorimo o vesolju kot enem samem sklopu razmer, saj gre za veliko raznolikost.

Kar se tiče potovanja po vesolju, glive in drugi zemeljski organizmi v vakuumu medplanetarnega prostora zaradi nizkih temperatur in izgube vode ne morejo imeti aktivnega metabolizma. Velik problem so tudi visoki odmerki sevanja. Na Zemlji smo pred tem sevanjem precej zaščiteni, takoj ko gremo zunaj te zaščite, pa ga je zelo veliko. Izkazalo pa se je, da lahko nekateri mikroorganizmi, med katerimi so zelo uspešne tudi glive, predvsem v izsušenem in zamrznjenem stanju preživijo ogromne odmerke sevanja, še posebej, če bi bile skrite v meteoritih. V tem smislu lahko govorimo o možnosti, da bi glive uspele potovati celo med lunami in planeti, če bi jih meteoriti izstrelili s planeta, na katerem sicer živijo. Tako bi lahko precej dolgo potovale po vesolju.

To je tako imenovana hipoteza o panspermiji, torej o širjenju življenja med planeti ali njihovimi lunami. Danes domnevamo, da je bil Mars za razvoj življenja prijazen prej kot Zemlja. Zato se sprašujemo, ali je mogoče naše življenje dejansko nastalo na Marsu in nato prek meteoritov priletelo na Zemljo. V tistem zgodnjem obdobju je bilo izmenjave materiala med Marsom in Zemljo verjetno kar veliko, zato je to zanimiva možnost.

Razmere na planetih in njihovih lunah so seveda drugačne od medplanetarnega prostora. Prav mikroorganizmi iz ekstremnih okolij, s katerimi se ukvarjamo, pa so dober model tudi za življenje v takšnih razmerah. Nekatera zemeljska okolja, na primer antarktične puščave, lahko služijo kot

približek razmeram na Marsu.

Glive imajo glede življenja na Marsu sicer težavo, da za svojo rast večinoma potrebujejo kisik, v nasprotju s številnimi bakterijami. Seveda obstajajo tudi glive, ki rastejo brez kisika, vendar so v manjšini. Lahko pa številne glive rastejo pri razmeroma nizkih koncentracijah kisika. Ni nujno, da ga je tako veliko, kot ga imamo v naši atmosferi.

Kar se tiče gojenja gliv za hrano, glive niso primarni producenti. Zato ne bi mogli živeti samo od njih, saj potrebujemo tudi vir, sposoben fotosinteze ali vsaj kemotsinteze.

So pa glive dober vir do človeka prijaznih hranil. Če bi v vesolju gojili rastlinsko biomaso, je ta za človeka zelo slabo prebavljiva. Škrob v žitnih zrnih še lahko prebavimo, lignocelulozne biomase pa neposredno ne. To lignocelulozno biomaso lahko z glivami zelo učinkovito in hitro, v razmeroma majhnih volumnih ter nadzorovanih sistemih, tudi brez prisotnosti svetlobe, pretvorimo v nekaj, kar je za človeka veliko lažje prebavljivo in ima boljšo hranilno vrednost. Hitin v glivah sicer ni idealen, lahko pa glive tvorijo veliko proteinov in služijo kot nadomestek mesa ter podobno.«

Če nezemeljsko življenje obstaja, ali bi po vašem mnenju temeljilo na podobnih molekularnih in biokemijskih principih kot življenje na Zemlji ali bi bilo lahko zasnovano povsem drugače?

»Ali življenje obstaja še kje drugje v vesolju, je seveda čisto ugibanje, saj nimamo statističnega vzorca, na podlagi katerega bi lahko sklepali. Zanimivo pri našem planetu je, da se je življenje po zadnjih dognanjih pojavilo izjemno hitro po tem, ko je planet sploh postal prijazen za življenje, ko se je dovolj ohladil, pojavila se je tekoča voda in tako naprej. Kmalu zatem smo že imeli življenje. Še vedno sicer govorimo o desetinah ali stotinah milijonov let, kar je za človeka nepredstavljivo, vendar v geološki zgodovini Zemlje to ni dolgo obdobje. Če lahko iz tega kar koli sklepamo, je, da mogoče nastanek življenja ni tako malo verjetna stvar, kot si včasih predstavljamo.

Glede na razsežnosti vesolja si težko predstavljamo že eno samo galaksijo, kaj šele celotno množico galaksij, ki obstaja, koliko zvezd in eksoplanetov je tam zunaj. Mislim, da je dejansko neverjetno, da se življenje ne bi pojavilo še kje drugje.

Ali ga bomo kdaj našli, je zaradi velikih razdalj v vesolju veliko vprašanje. Zelo zanimivo se mi zdi, kaj bomo mogoče našli na Marsu v prihodnjih letih in desetletjih. S tem se bomo mogoče tudi naučili kaj o našem planetu. Spektakularno bi bilo, če bi tam našli vsaj ostanke prvotnega življenja. Drugo vprašanje je, ali bi bilo to življenje identično našemu in bi prav tako temeljilo na RNA, DNA ter na proteinih. Če bi bilo popolnoma identično, bi se verjetno lahko vprašali, ali se je življenje pred milijardami let dejansko izmenjalo med planetoma.

Kar se tiče drugih oblik življenja, pa mislim, da so stvari tudi po zaslugi znanstvene fantastike kar dobro raziskane. S tem se veliko ukvarjajo astrobiologi. Življenje, kot ga poznamo, temelji na biokemiji, ki ima določene prednosti. Ogljik s svojimi štirimi vezmi in kiralnostjo ter voda kot univerzalno topilo imata lastnosti, ki jih ne najdemo kar povsod drugje v periodnem sistemu elementov. Kemijskih elementov je omejeno število.

Med drugimi topili, ki bi lahko služila namesto vode, se na primer omenja tekoči metan na luni Titan. V takšnem primeru bi morale biti že celične membrane sestavljene povsem drugače. V preteklosti se je veliko pisalo tudi o možnosti, da bi življenje namesto na ogljiku temeljilo na siliciju. Ta lahko do neke mere tvori spojine, podobne ogljikovim, vendar ima tudi veliko omejitev.

Ogljikov dioksid, ki ga izdihujemo, je na primer plin, silicijev dioksid pa je trdna snov, zato je veliko manj praktičen za izmenjavo v ekosistemu.

Ogljik in voda sta zato verjetno dobra osnova za življenje, vsaj tako, kot ga običajno razumemo. Veliko več prilagodljivosti pa je po mojem mnenju v podrobnostih. Elementov v periodnem sistemu je omejeno število, število mogočih aminokislin pa je bistveno večje od dvajsetih, ki sestavljajo naše proteine.

Če življenje obstaja še kje drugje v vesolju, ima torej na voljo veliko kombinacij. Če bi takšno življenje kdaj našli, bi bilo izjemno zanimivo videti, ali obstaja resničen fizikalni ali biokemijski razlog, zakaj smo sestavljeni točno tako, kot smo, ali pa smo v biokemijskem smislu v dobršni meri tudi splet naključij.«

Znanstvena skupnost se postopoma usmerja proti modelu odprte znanosti, saj postaja vse več člankov in drugih znanstvenih virov prosto dostopnih. Kako kot raziskovalec, ki objavlja svoja dela v revijah, gledate na platforme (kot je Sci-Hub), ki so priljubljene tudi med študenti in omogočajo dostop do sicer plačljivih znanstvenih vsebin brez dovoljenja imetnikov avtorskih pravic?

»Najprej moramo priznati, da je Sci-Hub s pravnega vidika neposredna kršitev avtorskih pravic in da je v tem smislu problematičen.

Osebnost pa mislim, da Sci-Hub in podobne spletne strani predstavljajo predvsem simptom veliko večjega problema. Ta problem je, da se je sistem objavljanja znanstvene literature razvil v izjemno dobičkonosno dejavnost, v kateri velike založbe služijo ogromno denarja. To jim omogoča sistem, ki je na neki način precej grotesken.

Raziskovalci, predvsem v javnih ustanovah, smo plačani z davkoplačevalskim denarjem. Pridobivamo tudi projektna sredstva, ki so pogosto prav tako davkoplačevalski denar. Rezultate raziskav želimo nato objaviti, da rezultate delimo z drugimi raziskovalci, v to pa nas silijo tudi sistemi vrednotenja znanstvene kakovosti in odličnosti. Rokopis članka pošljemo založniku, ta pa ga pošlje v recenzijo drugim raziskovalcem, ki to delo navadno opravijo brezplačno. Tudi veliko urednikov svoje delo opravlja brezplačno. Revija nato članek pripravi v obliki .PDF-ja. V zadnjih letih ga ni treba niti natisniti, ampak ga samo objavijo na internetu. Nato zaračunajo naročnino na revijo ali pa stroške objave članka. To pomeni, da univerza, ki je najprej zagotovila denar za plače raziskovalcev in raziskave, plačuje še za to, da imajo raziskovalci dostop do rezultatov teh istih raziskav. Zaslužek največkrat poberejo zasebne založbe.

V zadnjih letih se pospešeno uveljavlja načelo odprtega objavljanja oziroma objavljanja z odprtim dostopom, pri katerem so objave takoj brezplačno dostopne vsem na spletu. Ta sistem se mi zdi po eni strani veliko boljši, ker ne diskriminira med raziskovalci iz bogatejših in manj bogatih držav, ki si drage naročnine težje privoščijo. A tudi ta sistem ni zmanjšal ali odpravil dobičkonosnosti založniških podjetij, ampak je stroške samo prenesel na tistega, ki objavlja. Če želimo objaviti članek, moramo reviji za to plačati nekaj tisoč evrov, potem pa je članek prosto dostopen vsem.

Priljubljenost platform, kot je Sci-Hub, tako opozarja na problem znanstvenega založništva. Seveda krši tudi avtorske pravice, ampak pri tem smo raziskovalci še najmanj oškodovani, saj od znanstvenih objav v finančnem smislu pravzaprav nimamo ničesar.«

Gensko inženirstvo je v zadnjem desetletju doživelo velik razmah, predvsem zaradi razvoja metode CRISPR-Cas. Leta 2018 je kitajski raziskovalec s to metodo gensko uredil človeška zarodka dvojčic. Kakšno je vaše mnenje o moratoriju, ki je uveden za genetsko spreminjanje dednih človeških celic?

»Mislim, da je ta moratorij, vsaj v tem trenutku, zelo upravičen, in sicer iz več razlogov. Nanaša se na spreminjanje dednega materiala. Samo gensko zdravljenje posameznika, pri katerem spreminjamo somatske celice, ni vključeno v ta moratorij in je tudi prav, da ni. Gensko zdravljenje v zadnjih letih precej napreduje in z njim lahko zdravimo veliko bolezni, ki prej niso bile ozdravljive, seveda pod strogim nadzorom.

Pri spreminjanju dednine pa gre za nekaj, kar potencialno vpliva na vse prihodnje generacije. Tukaj vidim tri pomisleke. Prvi je, da čeprav je CRISPR-Cas res fenomenalno orodje, ni stoodstotno zanesljivo. Vemo, da imajo lahko tudi najboljši sistemi netarčne učinke v genomu. Spremenimo lahko nekaj, česar nismo želeli spremeniti, kar lahko vodi do neželenih učinkov. To je torej varnostni vidik.

Drugo je vprašanje soglasja. Pri zdravstvenih posegih načelno velja, da mora imeti pacient možnost zavrnitve posega. Pri spreminjanju dednine tega pogoja ne moremo izpolniti, saj ne moremo dobiti dovoljenja prihodnjih generacij za to, kar počnemo. To je do neke mere čisto filozofsko vprašanje, o katerem bi verjetno lahko veliko več povedali etiki. Tretja stvar, ki se mi zdi s tega vidika vprašljiva, pa je: CRISPR-Cas je danes res široko dostopen, razvoj genskega zdravljenja in genskih zdravil pa je še vedno izjemno drag. Stroški genskega zdravljenja se merijo v milijonih evrov. To seveda ne pomaga pri neenakosti, ki je imamo v družbi že tako preveč. Ali imamo vsi enak dostop do genskega zdravljenja? In kje bomo potegnili mejo med tem, kaj je zdravljenje in kaj nekakšen estetski poseg v prihodnje generacije? Ali pa, če bi na primer znali izboljšati intelekt naslednje generacije, ali bi to smeli početi in ali bi si lahko to vsi privoščili? Ali bomo končali pri tem, da si bodo bogati lahko privoščili svojim otrokom zagotoviti še več prednosti, tokrat tudi genetskih, poleg vseh drugih, ki jim jih omogočajo že danes? To bi lahko vodilo v še veliko večje razslojevanje človeštva, kot smo mu priča zdaj.«

Katero knjigo, film ali serijo bi priporočili vsakemu študentu zaradi znanstvene, znanstvenofantastične ali družbenokritične vsebine?

»Kar se tiče knjig, je še vedno ena mojih najljubših znanstvenofantastičnih knjig, čeprav je zdaj že kar v letih, knjiga *Stik* pisatelja Carla Sagana, ki je bil raziskovalec in odličen komunikator znanosti, in to v času, ko poljudnoznanstveno komuniciranje še ni bilo tako razvito, kot je danes. Knjiga je sicer povsem znanstvenofantastična, je čista fikcija, vendar mislim, da je dobro napisana in tudi znanstveno sorazmerno dobro utemeljena. Kar dobro znanstveno utemeljena je tudi serija *Chernobyl*. Med drugimi knjigami in serijami, ki mogoče niso tako izrazito znanstveno orientirane, je na primer *The Expanse*. Gre za serijo znanstvenofantastičnih knjig, po katerih so posneli tudi televizijsko serijo. Te sicer niso povsem dokončali, kar je po mojem mnenju škoda. So pa tako knjige, zlasti prvih nekaj knjig, pa tudi sama serija, čisto prava znanstvena fantastika, ki temelji na fiziki, kot jo poznamo, in je dobro utemeljena, podobno kot *Projekt Zadnje*

upanje. Hkrati obravnava tudi kar nekaj zelo zanimivih družbenopolitičnih vprašanj. V tem smislu je večplastna, obenem pa še vedno dovolj lahkotna za branje in ne gre za posebej težko oziroma ‘zateženo’ literaturo.«

Kako pomembno se vam zdi, da znanstveniki in študentje kritično spremljajo tudi širše družbeno dogajanje, ki se pojavlja v Sloveniji in svetu? Kaj bi svetovali mladim pri oblikovanju lastnega mnenja o svetu okrog njih?

»Mislim, da je zelo pomembno, da smo vsi vključeni v družbeno dogajanje, da ga spremljamo in po možnosti v njem tudi aktivno sodelujemo. Ne zato, ker bi bili raziskovalci ali univerzitetno izobraženi, ampak zato, ker imamo ob vseh problemih, ki jih imamo v svetu, hkrati tudi srečo, da živimo na delu sveta in v času, ko imamo precej svobode ter lahko vplivamo na to, kaj se v naši družbi dogaja. In tak demokratični sistem zares dobro deluje samo takrat, ko so posamezniki informirani in družbeno aktivni. Kako se informirati? V današnjih časih je to razmeroma težko, saj je dezinformacij res veliko. Mislim, da je prav, da spremljamo resne medije in ne samo družbenih omrežij. Kaj so resni mediji? Medijske hiše, ki so še vedno bolj ali manj kredibilne.

Ob zgodbah, ki jih preberemo, se moramo vprašati, ali so kredibilne oziroma ali imajo znake, ki kažejo na to, da so izmišljene, pretirane, in podobno. Tudi kot dobri raziskovalci moramo vedno dvomiti, tudi o rezultatih drugih in znanstvenih rezultatih na splošno. Znanstveni dvom je del znanstvene metode.

Hkrati pa moramo biti pripravljeni spremeniti svoje mnenje, kadar jasni dokazi pokažejo, da je bilo naše prvotno mnenje mogoče pomanjkljivo ali celo napačno. Lahko smo trdno prepričani, da imamo prav, ampak moramo hkrati ostati odprti za dokaze, da se motimo.

Mislim, da je danes posebej pomembno tudi, da se ne zapiramo v svoje mnenjske mehurčke. To je zelo preprosto in udobno; verjetno to vsi vsaj po malem počnemo, ker je prijazneje brati mnenja, s

katerimi se strinjamo, in precej bolj neprijetno brati ali poslušati mnenja, s katerimi se ne strinjamo. Kljub temu je prav, da prisluhnemo tudi ‘drugi strani’. Ni nujno, da se z njo strinjamo ali da zaradi tega spremenimo svoje mnenje, pomembno pa je, da jo vsaj poslušamo. Ko se prenehamo poslušati, tudi družba ne deluje več dobro. Takrat dobimo pojave, kakršnim smo priča tudi danes, ko smo vsi na nasprotnih bregovih.«

Mikroorganizmi so zelo uporabno orodje v biotehnologiji in medicini, hkrati pa lahko predstavljajo tudi veliko grožnjo za ljudi. Kako realna se vam zdi nevarnost, da bi bile sodobne biotehnoške metode zlorabljene za namerno ustvarjanje nevarnejših patogenov ali sintetičnih virusov? Ali menite, da bi to lahko v prihodnosti predstavljalo resen problem za človeštvo? Vas to področje tudi osebno zanima?

»Mislim, da je to področje zelo zanimivo in tudi precej skrb vzbujajoče iz več razlogov. Prvi je, da tehnologija napreduje in znamo vse več. Že pred leti so pokazali, da je mogoče nevaren virus sestaviti iz povsem komercialno sintetizirane DNA. Virusi so majhni, zato sinteza virusnega genoma ni tako zelo zahtevna.

Drugi razlog je razvoj umetne inteligence. Vanjo sicer poskušajo vključiti veliko varovalk, vendar nobena ni popolna. Z umetno inteligenco bo verjetno sčasoma oziroma je do neke mere že danes mogoče napovedovati ali konstruirati gene za proteine, ki bi lahko delovali kot toksini. V prihodnosti bo verjetno mogoče konstruirati tudi nove ali spremenjene viruse.

Dodatna težava je, da postaja sinteza DNA in RNA vse dostopnejša. Za zdaj je še vedno razmeroma draga in centralizirana na ponudnike, ki jim plačamo za sintezo določenih delov DNA. Dokler je ta dejavnost centralizirana, lahko ponudniki izvajajo varnostne preglede naročil, preden sintetizirane dele pošljejo naročniku. Če bo nekega dne sinteze DNA sposobna aparatura, ki bo v vsakem laboratoriju, tak nadzor ne bo več mogoč. Za zdaj še nismo tam. Tudi v povezavi s CRISPR-Cas se veliko govori o demokratizaciji molekularne biologije, na

to temo pa obstajajo tudi številni umetniški projekti in podobno. Včasih se to predstavlja, kot da se lahko že vsak v svoji garaži ukvarja z biotehnologijo. Tako preprosto vendarle še ni. Je pa biotehnologija veliko dostopnejša in cenejša (in zmogljivejša), kot je bila pred tridesetimi leti, in verjetno bomo šli še naprej v tej smeri.

Konec koncev nas ne skrbijo le zasebniki z laboratorijem v svoji garaži, ampak tudi državni akterji, teroristične skupine in drugi, ki imajo dostop do veliko več infrastrukture in veliko višjih finančnih sredstev. Danes se na primer znova veliko pogovarjamo o jedrskem orožju. To je res strašljivo, a njegov razvoj je razmeroma preprosto spremljati, tudi s sateliti. Če nekdo pod zemljo detonira poskusno jedrsko eksplozijo, je to sorazmerno preprosto zaznati. Sintezo novega virusa v skritem laboratoriju pa je bistveno težje izslediti. Zato je tudi mednarodni nadzor nad takšnim orožjem veliko težji.«

Torej se vam zdi, da so biološka orožja pravzaprav nevarnejša od jedrskega orožja?

»Težko je primerjati. Če bi zaradi večjega jedrskega spopada prišlo do jedrske zime, bi to gotovo povsem predrugačilo planet. Če bi imeli biološko orožje, bi bilo verjetno bolj specifično in bi na primer delovalo samo na ljudi. To bi seveda prav tako pomenilo bistvene spremembe na planetu, ampak ne v čisto v podobnem obsegu.

Hkrati je pa izpust biološkega orožja, ko se enkrat zgodi, dejansko nemogoče nadzorovati. Po eni strani, če govorimo o vojskovanju med državami, to verjetno zmanjšuje privlačnost takšnega orožja. Orožje, ki ga ni mogoče nadzorovati, za vojsko ni tako zelo zanimivo. Drugo vprašanje pa je, kaj bi se zgodilo, če bi takšno orožje prišlo v roke terorističnim organizacijam, ki jim je vseeno, kaj se bo zgodilo, in želijo predvsem povzročiti radikalne spremembe.«

pripravila Matej Novak in Tina Skočaj

Potencial in etično ozadje GENSKEGA SPREMINJANJA ZARODKOV v postopku IVF

Živa Koder¹, Vita Lebič¹, Eva Rems¹, Iza Wallner¹, Ela Zemljič¹

¹ Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije, Jamnikarjeva 101, 1000 Ljubljana

Ključne besede: IVF, gensko spreminjanje, humani zarodki, etika, CRISPR-Cas9, dedne bolezni

IZVLEČEK

V sodobni družbi *in vitro* oploditev oz. fertilizacija (IVF) vse pogostejše nastopa kot pomoč parom pri težavah z zanositvijo. Z napredkom znanja iz embriologije in razvojem metode IVF ter genomike in njenih diagnostičnih metod se ponujajo možnosti izbire genetsko najoptimalnejših zarodkov iz nabora pripravljenih, prek tega pa izbira zarodka, ki se bo razvil v genetsko zdravega otroka. Hkrati se izjemno hitro razvijajo tudi metode genskega spreminjanja dednega materiala dejansko vseh živih bitij, s čimer se nam ponuja možnost zdravljenja genskih bolezni še pred rojstvom otroka. Uporaba gruče enakomerno prekinjenih palindromskih ponovitev in endonukleaze Cas9 (metoda CRISPR/Cas9) bi lahko omogočila precej natančne modifikacije genoma, s katerimi bi preprečili razvoj nekaterih dednih monogenskih bolezni, kot so: spinalna mišična atrofija, cistična fibroza in razne nevrološke bolezni, ter tako zvišali kakovost življenja rojenih otrok. Kljub temu raziskovalce še vedno vežejo etični zadržki in zakonski okviri, zaradi katerih je poseg v genom humanih zarodkov opredeljen kot kaznivo dejanje, zaradi česar so znanstveniki prestajali tudi zaporno kazen.

Zakaj človeštvo še vedno čuti zadržke do poseganja in potencialnega spreminjanja človeškega genoma, predvsem v zarodkih, čeprav se to dokazano lahko uspešno izvede v številnih drugih sesalskih vrstah? Uporaba teh novodobnih pristopov bi lahko predstavljala velik korak k razvoju učinkovitega zdravljenja dednih bolezni in izboljšanja kakovosti življenja tistih, ki za njimi trpijo.

Uvod

Znanje genetike v zadnjih letih izjemno napreduje, z njim pa napredujejo tudi metode, orodja in tehnologije, ki jih genetika uporablja. Raziskovalci s področja ved o življenju že od 70. let naprej ustvarjajo gensko spremenjene organizme, kot so: bakterije, glive, rastline in celo primati. Z napredkom tehnologij, večjo natančnostjo in z vse boljšim poznavanjem genetike organizmov ter principov dedovanja pa se mnogim zdi, da svet, v katerem obstaja gensko spremenjen človek, ni več tako oddaljen. Konec koncev v zadnjih letih spremljamo izjemen razvoj zdravljenja z genskimi terapijami. Ameriška Uprava za hrano in zdravila (FDA) je leta 2023 odobrila prvo gensko terapijo za zdravljenje bolezni srpastih eritrocitov [1], konec leta 2024 in v letu 2025 so z gensko terapijo zdravili komaj triletnega dečka Oliverja Chuja [2], poleg tega pa se razvija vse več podobnih terapij. Z razvojem terapij za zdravljenje težkih dednih monogenskih bolezni pa se seveda pojavi vprašanje,

zakaj ne bi nastanek takih bolezni preprosto preprečili. Da to lahko storimo, je treba spremeniti »okvarjen« alel gena v vseh celicah človeškega telesa, torej še pred razvojem zarodka, kar nam omogoča postopek *in vitro* oplojevanja oz. fertilizacija (IVF). V zgodnji fazi, takoj po nastanku zarodka, lahko med postopkom IVF povzročimo spremembo izbranega gena s pomočjo različnih metod, med drugim z uporabo gruče kratkih enakomerno prekinjenih palindromnih ponovitev in proteina Cas9 (CRISPR-Cas9). Take modifikacije bi omogočile zdravljenje oz. preprečevanje nastanka številnih dednih monogenskih bolezni, kot so na primer: spinalna mišična atrofija, cistična fibroza in razne nevrološke bolezni. Na tak način bi lahko močno zvišali kakovost življenja bolnikov, vendar modifikacije s tehnologijo CRISPR-Cas9 zaradi številnih stranskih in netačnih učinkov še niso povsem zanesljive. Hkrati gensko spreminjanje človeških zarodkov odpira pomembna vprašanja, predvsem zaradi razvoja posameznikov z

vnaprej izbranimi lastnostmi. Takšno poseganje v naravno genetsko pestrost bi lahko pripeljalo do nastanka nove umetne populacije, kar bi povzročilo še večje razslojevanje družbe. Nazoren primer etičnih in pravnih pomislov je primer znanstvenika Heja Jiankuija, ki je zaradi genskega spreminjanja človeških zarodkov, iz katerih sta se rodila otroka, preстал triletno zaporno kazen. S svojim posegom ni kršil le zakonodaje in veljavnih etičnih smernic, ampak je otroke izpostavil tudi tveganju nepredvidenih in potencialno škodljivih posledic spreminjanja genoma zarodkov.

Metode

Izvedli smo integrativni pregled znanstvene in strokovne literature o potencialu, tehničnih možnostih ter o etičnih in družbenih vidikih genskega spreminjanja človeških zarodkov v povezavi s postopki IVF. Literatura je bila pridobljena predvsem z iskanjem v podatkovni zbirki PubMed in spletnem akademskem iskalniku Google Scholar. Dodatni viri so bili opredeljeni s pregledom seznamov literature ključnih člankov.

Iskanje je zajemalo članke, ki so bili objavljeni med letoma 1997 in 2026. Uporabili smo različne kombinacije ključnih besed, kot so »human embryo gene editing«, »CRISPR-Cas9«, »prenatal gene editing«, »IVF«, »designer babies«, »gene-edited babies«, »clinical application« in »ethics«, povezane z Boolovima operatorjema AND in OR. V osrednji pregled so bili vključeni recenzirani izvirni in pregledni znanstveni članki, ki so obravnavali gensko spreminjanje človeških zarodkov, zarodne linije ali fetusa ter tehnične, klinične, etične, pravne ali družbene vidike takšnih posegov oziroma njihove uporabe. Zaradi širine raziskovalnega vprašanja so bili poleg izvirnih raziskav vključeni tudi pregledni članki, etične analize, strokovni komentarji, smernice, konsenzna priporočila, knjige in referenčna poglavja.

Princip genskega spreminjanja

Sposobnost preprostega tarčnega spreminjanja genoma s pomočjo tehnologije CRISPR-Cas9 je korenito spremenila biotehnologijo. Gre za tehnologijo, ki temelji na imunskem sistemu bakterij. Te v svojem genomu vsebujejo zapise virusne DNK, ki jim omogočajo prepoznavanje ponovnih okužb. Ob novem napadu se ti zapisi prepisujejo v vodilno RNK, ki skupaj z encimom Cas9 prepoznajo in hidrolizirajo virusno DNK. Raziskovalci so vodilni RNK-verigi združili v eno samo enoverižno RNK-molekulo (single guide RNA, sgRNK), ki Cas9 usmeri na točno določeno mesto v genomu. Endonukleaza Cas9 tam povzroči dvojni prelom DNK, ki ga celica nato popravi s homologno rekombinacijo ali z nehomolognim spajanjem koncev. Popravilo lahko poteka natančno, če je prisotna matrična DNK. Če ta

proces ni uspešen, pa to običajno vodi do izklopa genov zaradi premika bralnega okvira. [3] Preprostost priprave tarčno specifičnih vodilnih RNK je zamisel o spreminjanju genoma človeške zarodne linije približala realnosti. Že dve leti po prvem opisu tehnologije kot molekularnem orodju so metodo uporabili na človeških zarodkih z namenom, da bi ocenili klinično izvedljivost popravljanja genov [4].

Z vnosom sistema CRISPR-Cas9 v zigoto so orali ledino v postavitvi metod, ki so omogočile nastanek prve generacije miši z želeno mutacijo [5]. Z uporabo podobnega pristopa so leta 2014 na zigotah miši z nesmiselno mutacijo v eksonu 23 gena *Dmd*, ki povzroča Duchennovo mišično distrofijo (DMD), s pomočjo injiciranja endonukleaze Cas9, sgRNK in matrice za homologno rekombinacijo popravili primarno gensko okvaro in preprečili razvoj značilnih znakov bolezni pri miših [6]. Te študije so pokazale potencial popravljanja genskih mutacij v celicah zarodne linije ali zgodnjih zarodkih kot rešitev za dedne bolezni. Niu in sodelavci so istega leta izvedli metodo CRISPR-Cas9 na opici *Macaca fascicularis* in s tem dokazali, da je mogoče ciljno spreminjati genom tudi pri nečloveških primatih [7].

Kang in sodelavci so v raziskavi leta 2016 želeli dokazati, da je mogoče naravno prisoten koristen alel vnesti v človeške zarodke. Kot ciljni gen so izbrali gen *CCR5*, ki kodira za glavni koreceptor, ki ga virus HIV-1 (human immunodeficiency virus) uporablja za okužbo človeških celic. Zaradi etičnih pomislov so metodo testirali na triponuklearnih (3PN) človeških zarodkih, ki ne preživijo dlje kot tri dni in se *in vivo* niso sposobni razvijati. V sklopu raziskave so preverjali, ali lahko alel *CCR5Δ32* (alel *CCR5*, ki vsebuje 32 baznih parov dolgo delečijo) uspešno vnesejo v zgodnje človeške zarodke 3PN. Omenjeni alel je namreč naravno prisoten v nekaterih populacijah, homozigoti in heterozigoti s takim zapisom pa kažejo povečano odpornost proti okužbi z virusom HIV. Za vnos alela so oblikovali dva enoverižna oligonukleotida na podlagi kodirajoče in nekodirajoče verige gena *CCR5*. Endonukleazo Cas9, mRNK, vodilno RNK in oligonukleotid so v zigote vnesli s pomočjo pronuklearne ali citoplazemske mikroinjekcije, pri čemer se je zadnja izkazala za učinkovitejšo. Pri tem je prišlo do homologne rekombinacije (HDR), ker je popravljanje z nehomolognim združevanjem koncev (NHEJ) običajno učinkovitejše, pa so poskus ponovili s sočasnim vnosom obeh vodilnih RNK-verig, kar se je izkazalo kot učinkovitejše [8]. Dve leti po omenjeni raziskavi so poročali o rojstvu prvih dojenčkov z geni, ki so jih spremenili s tehnologijo CRISPR-Cas9, ki jo bomo natančneje opisali v nadaljevanju. Kljub več raziskavam prinaša tovrstna tehnologija veliko

izzivov. Aktivnost kontrolnih točk celičnega cikla med zgodnjimi zarodnimi delitvami je manjša kot pri somatskih celicah, zato se človeški zarodki na poškodbe DNK pri uporabi tehnologije CRISPR-Cas9 ne odzovejo enako kot celični modeli. Ker se za urejanje genoma uporablja mikroinjiciranje komponent v oplojene zigote, lahko do nastanka prelomov in popravljanja pride še pred aktivacijo zarodnega genoma, ko razvoj še uravnavajo dejavniki matere. Do težav pa lahko pride tudi zaradi kondenzacije kromatina, ki onemogoči dostop endonukleaze Cas9 do tarčnega zaporedja [4].

Uporaba pri preprečevanju in zdravljenju dednih bolezni

Potencialne tarče zdravljenja

S tehnologijami za gensko modifikacijo bi potencialno lahko prenatalno obvladovali številne dedne monogenske bolezni [9]. Med takšne bolezni prištevamo tudi spinalno mišično atrofijo, za katero sta značilni oslabeledost mišic in njihova atrofija [10], ter cistično fibrozo, pri kateri so prizadeta pljuča in drugi telesni organi [11, 12]. S takšnim zdravljenjem bi bilo mogoče bistveno izboljšati kakovost življenja posameznikov, saj te dedne bolezni močno vplivajo nanje.

Na tak način bi lahko obvladovali tudi redke dedne bolezni. Več kot 80 % vseh redkih bolezni je namreč posledica monogenjskih mutacij, večina teh bolezenskih stanj pa je prirojena, neonatalna ali pediatrična [13]. Patološki znaki se kot posledica proteinskih deficitov kažejo že pri razvijajočem se plodu ali novorojenčku. Pomanjkanje ključnih proteinov prizadene razvoj in dozorevanje različnih organskih sistemov [14]. Na razvoj zarodka v maternici in zgodnji razvoj dojenčka močno vplivajo prirojene motnje metabolizma, ki povzročajo hude nevrološke okvare [13]. Prav zaradi nastanka razvojnih nevroloških bolezni med razvojem zarodka pa je poznejše zdravljenje zelo zahtevno [15]. Na razvoj zarodkov lahko vplivajo tudi deficiti surfaktantov, ki pozneje omejujejo funkcijo pljuč ter vplivajo na motnje koagulacije krvi in hemoglobinopatije [14].

Takšne dedne bolezni lahko posledično povzročajo hude zaplete v razvoju. Deficiti surfaktantov se lahko kažejo kot pljučna hipoplazija, ki je vodilni vzrok za smrtnost dojenčkov v neonatalnem obdobju [16]. Tudi prej omenjene hemoglobinopatije povzročajo simptome, ki so lahko blažji in se kažejo v obliki anemij, ali pa so hujši, kar lahko v nekaterih primerih vodi celo do smrti. Bolezen alfa talasemija major je najhujša oblika anemije, pri kateri zaradi odsotnosti izražanja fetalnega hemoglobina povzroča hudo anemičnost zarodka, kar vodi v srčno popuščanje in ob prepoznem ali nezadostnem zdravljenju zarodka v ma-

ternici tudi v smrt [17]. Motnje koagulacije krvi lahko prav tako sprožijo resne zaplete. Ena takšnih bolezni je hemofilija, pri kateri lahko pride do zapletov ob krvavitvah, ki jih je težje ustaviti. V takih primerih je ključno, da se že ob porodu jasno opredeli pot, ki bo zmanjšala možnost, da pride do krvavitev, med katerimi so najbolj problematične znotrajlobanjske [18]. Med redke dedne bolezni uvrščamo tudi veliko heterogeno skupino primarnih imunodeficitov [19]. Veliko število teh se začne izražati na različne načine prav v neonatalnem obdobju [20]. Primarni imunodeficit namreč nastanejo zaradi genetskih anomalij, ki spremenijo delovanje imunskega sistema. Zaradi spremenjene funkcije so prizadeti različni organski sistemi, hkrati pa zaradi velike heterogenosti te skupine bolezni prihaja tudi do širokega spektra potencialnih zapletov [21].

Potencialno obvladovanje

Številne monogenske dedne bolezni bi bilo mogoče zdraviti s popravljanjem mutacij, ki te bolezni povzročajo. Pravčasno in zgodnje zdravljenje teh bolezni bi tako potencialno preprečilo trajne poškodbe organov in zaustavilo patologijo celic, hkrati pa bi velika koncentracija matičnih celic in majhnost zarodka omogočali učinkovitejšo izvedbo terapije [22].

Za preverjanje ali zarodek vsebuje specifično mutacijo, ki povzroča bolezensko stanje, je na voljo genetska diagnostika. Ključno je namreč, da se med postopkom IVF v maternico vnese zdrav zarodek. S tem namenom se med postopkom IVF še pred vnosom zarodka v maternico izvaja predimplantacijska genetska diagnostika (PGD). Poglavitni cilj takšne diagnostike je opredeliti zdrave zarodke in tiste s poškodovanim alelom oz. mutacijo. Če je v njihovem dednem zapisu prisoten tak alel oz. mutacija, bi modifikacije genoma tako bolezensko stanje preprečile [23]. Popravljanje mutacij v zarodkovih pluripotentnih matičnih celicah bi lahko vodilo v nastanek zdravih hčerinskih celic, ki bi spodbujale normalen razvoj zarodka. To bi lahko pozitivno prispevalo k zdravljenju sindromov, ki prizadenejo širši spekter organskih sistemov. Zaradi takšnih sindromov je razvoj ploda med embriogenezo nenormalen. Posledično lahko takšne mutacije v zarodkovem genomu vodijo v splav, kompleksne prirojene nepravilnosti in bolezensko prizadetost organov ter v zaostanek v razvoju [14]. Zdravljenje preživelih oseb namreč pogosto temelji predvsem na blaženju prisotnih bolezenskih simptomov ali zdravljenju z nadomeščanjem encimov (ali specifičnih produktov genov). Običajno pa gre pri takih načinih zdravljenja le za kratkotrajen učinek, zato jih je treba sproti ponavljati [24].

Rojstvo otrok z umetno spremenjenim genom, ki je pretreslo svet

Konec novembra 2018 je kitajski znanstvenik He Jiankui svet pretresel z informacijo o rojstvu dveh otrok, katerih zarodka sta bila genetsko modificirana s tehnologijo CRISPR-Cas9. He naj bi dvojčicama Nani in Lulu na tak način omogočil odpornost na virus HIV, s katerim je že bil okužen njun oče. Virus HIV je virus humane imunske pomanjkljivosti in se prenaša prek telesnih tekočin, do prenosa okužbe pa lahko pride tudi med zanositvijo in samo nosečnostjo. Virus prek specifičnih receptorjev, med katerimi je tudi kemokinski receptor 5, ki ga kodira gen *CCR5*, vstopa v celice imunskega sistema in jih tako oslabi. Imunski sistem bolnikov je tako močno oslavljen, da postane dovzetnejši za razne bolezni, ki so za take posameznike običajno tudi smrtno nevarne. Za bolezen za zdaj še ne poznamo učinkovitega načina zdravljenja, ki bi omogočal popolno ozdravitev. Pri posameznikih s to boleznijo se zato le lajša simptome in izvaja razne preventivne ukrepe, ki napredovanje bolezni zavrejo [25].

Da bi He dvojčicama omogočil odpornost na okužbo z virusom HIV, je želel izvesti delekcijo daljše regije gena *CCR5*. Spreminjanje dednega materiala zarodkov so opravili med postopkom IVF. Sprva so znanstveniki očetovo spermo spirali, s čimer se je možnost za prenos okužbe z očeta na potomce dokazano izjemno zmanjšala [26]. Nato so s tako pripravljeno spermo oplodil jajčeca. V nastalem zarodku je s pomočjo metode CRISPR-Cas9 želel izvesti delekcijo 32 baznih parov dolge regije gena *CCR5*, ki kodira za kemokinski receptor 5 [27], kar bi vodilo v to, da HIV ne bi okužil levkocitov rojenega otroka [28]. Podobna mutacija naj bi bila sicer naravno prisotna pri okoli 10 % populacije. Ve se namreč, da virus HIV ni zmožen okužiti homozigotov s to mutacijo, pri heterozigotih pa bolezen napreduje počasneje [29].

Rezultati poznejših raziskav so pokazali, da modifikacija gena ni uspela, kot so predvidevali. Pri eni izmed dvojčic se je modificirala le ena kopija gena, druga pa je ostala nespremenjena. Poleg tega so pri obeh deklicah zasledili mozaicizem, za katerega je značilen pojav genetsko različnih celic v istem organizmu [30].

Čeprav je He Jiankui s svojim posegom preprečil okužbo deklic z virusom HIV in za zdaj nihče ne poroča o škodljivih nenačrtovanih učinkih, ki bi bili posledica nenatanečnega ali netačnega delovanja tehnologije CRISPR-Cas9, je bilo dejanje označeno za neetično, dr. He pa sta bili na sodišču izrečeni denarna in triletna zaporna kazen [31]. Poleg tega je revija The CRISPR Journal umaknila objavo njegovega dotedanjega dela na področju genskih modifikacij zarodkov in reproduktivnega zdravja. Dejanje je bilo izjemno

tvegano, saj metoda CRISPR očitno ni dovolj zanesljiva in natančna, poleg tega pa samo poznavanje gena *CCR5* ni dovolj dobro, da bi raziskovalci lahko zagotovili odsotnost kakršnih koli stranskih učinkov spreminjanja tega lokusa. Prav tako modifikacija zarodkov pomeni tudi modifikacijo zarodne linije in prenos spremenjenega gena na potomce, pri čemer ne poznamo posledic takšnega dogodka ne le na eno osebo, ampak tudi na celotno populacijo.

Pozneje so celo ugotovili, da spreminjanje dotičnega gena lahko pomeni spremembo (izboljšanje) možganskih sposobnosti [32], kar neposredno potrjuje možnost obstoja stranskih učinkov spreminjanja izbranih genov zaradi slabega poznavanja njihovih funkcij.

He naj bi med raziskavo sicer gensko modificiral zarodke več parov, ki so se odločili za postopek IVF. Vsem parom je bilo skupno, da je bil oče že okužen z virusom HIV. Parom je omogočil izbiro med uporabo nemodificiranih in modificiranih zarodkov; za modificirane se je tako odločil en, že prej omenjeni par [33]. Prav tako He ni objavil poročila o svojem delu, zelo verjetno pa je, da so regulatorni organi preprečili objavo. Poleg tega ne obstajajo podatki o trenutnem zdravstvenem stanju dvojčic oz. kako je genetsko spreminjanje vplivalo na njun razvoj, zdravje in na kakovost življenja.

Etika genskega spreminjanja humanih zarodkov

Spreminjanje genoma zarodkov ob trenutnih znanstvenih pomislekih o varnosti in uspešnosti metode postavlja tudi resna etična, moralna in pravna vprašanja.

Z razvojem te metode se najprej postavlja vprašanje, kdaj, če sploh, bo dovolj varno narediti prve uradne klinične študije. Mnenja pri tem so deljena; nekateri bi se izognili vsakršnim potencialnim tveganjem, medtem ko drugi menijo, da koristi pretehtajo tveganja. Pri uporabi tehnologije CRISPR-Cas9 na zarodkih je mogočih več negativnih stranskih učinkov, kot so delecije DNK ali celotnih kromosomov, mutacije in moziacizem, ki lahko povzročijo razvojne motnje in so dedni. Vsakršne genske spremembe zarodkov se izrazijo tudi v zarodni liniji, kar ne vpliva le na prvotno spremenjen zarodek in iz njega razvitega otroka, ampak tudi na njegove potomce. Zato obstaja možnost, da bi se te spremembe, katerih vpliva ne poznamo, razširile v populaciji in povzročile dodatne bolezni in slabšanje javnega zdravja. Hkrati je veliko znanstvenikov prepričanih, da bi lahko s to metodo uspešno preprečili nekatere resne in drugače neozdravljive bolezni – cistično fibrozo, Duchennovo mišično distrofijo in Tay-Sachsovo bolezen, zato bi prednosti odtehtale tveganja. Mnenja, katere so te resne bolezni, pa so med njimi deljena [34].

Če lahko vplivamo na gene, ki povzročajo bolezni, pa lahko vplivamo tudi na gene za vse druge lastnosti, kot so na primer: višina, barva oči, inteligenca, športne sposobnosti [35], kar bi v nadaljevanju pripeljalo do ustvarjanja tako imenovanih »designer babies« [36]. S tem se nam zastavljajo številna vprašanja, kot sta: kje sploh je meja med preprečevanjem bolezni in izboljševanjem lastnosti ter kaj je še etično sprejemljivo [35]. Sparrow je izrazil zaskrbljenost, da bi neprestane genetske izboljšave pripeljale do »zastarelih modelov ljudi«, ki niso več dovolj dobri [37].

Spreminjanje genoma pa nima vpliva le na posameznika, ampak v večjem obsegu lahko tudi na celotno družbo. Starši bi se za izboljšanje lastnosti bodočih otrok odločili tudi pod vplivom družbenih stereotipov. Z vprašanjem vpliva stereotipov o spolu sta se ukvarjala Niklas A. Döbler in Claus-Christian Carbon v raziskavi z naslovom *Does creating the perfect child mean enforcing or dismantling normative gender stereotypes? Evidence from an interactive virtual genetic engineering exhibit (Ali ustvarjanje popolnega otroka vodi v okrepitev ali opustitev stereotipov o spolu? Dokazi iz interaktivne virtualne razstave o genetskem inženiringu)*. Podatke za študijo sta pridobila v muzeju, v katerem so obiskovalci lahko ustvarili virtualnega »popolnega otroka«. Imeli so možnost izbire spola in določenih lastnosti, kot so na primer: barva oči in las, inteligenca, športnost, všečnost. Dokazala sta, da trenutni stereotipi o spolu vplivajo na izbiro »popolnega otroka« z mislijo in željo za dobrobit otroka. Zaradi omejitev pri zbiranju podatkov ta študija ni dovolj natančna, da bi lahko iz nje pridobili koristne in dovolj natančne informacije, kot ugotavljata tudi avtorja. Študija pa vseeno poda ugotovitve, da bi se ob pojavu možnosti spreminjanja genov zarodkov pojavila tudi želja po spreminjanju lastnosti otrok [38].

Zaradi omejene dostopnosti omenjene tehnologije nevarnost za družbo predstavlja tudi povečanje neenakosti. Znotraj ene družbe in tudi med njimi bi se lahko povečali razslojevanje, stigmatizacija in diskriminacija [39]. Z uporabo tehnologije CRISPR-Cas9 pa bi se po drugi strani lahko zmanjšala teža in pritisk na prizadete družine in bolnišnice [34].

Velik pomen pri etičnem vrednotenju uporabe genskega spreminjanja zarodkov predstavlja tudi problem neidentitete (non-identity problem), ki ga je prvi opisal Derek Partif v knjigi *Reasons and Persons (Razlogi in ljudje)*. Problem se osredinja na sam obstoj posameznikov, ne pa na njihove pravice in dobro počutje. S spreminjanjem zarodkov ne škodimo ali koristimo nikomur niti ne rešimo njegovega življenja. S tem postopkom ustvarimo novo osebnost, ki drugače sploh ne bi obstajala. Z izbiro zarodka z neko gensko napako ne škodimo bodočemu otroku, saj ta otrok ne bi obstajal brez te genske napake. Če pa bi

ta zarodek predhodno spremenili, bi se rodila druga oseba. Tako tudi He ni rešil življenja Lulu in Nane, ampak jima ga je omogočil, ustvaril je drugi osebi [33]. Od uporabe te metode pa nas zadržujejo tudi družbena pričakovanja, povezana z razmnoževanjem, vrednote in religija [39]. Ideja o izboljšanju javnega zdravja in izbiri družbeno želenih lastnosti s tehniko genskega spreminjanja zarodkov spominja na negativne zgodovinske prakse, še posebej tiste iz nacistične Nemčije. Zato je treba posebno pozornost nameniti preprečevanju zlorab te moderne tehnologije, raziskave pa naj ne bodo usmerjene le v razvoj tehnologije, ampak tudi v socialne, psihološke in v pravne vidike [34].

Zaključek

Gensko spreminjanje človeških zarodkov s tehnologijo CRISPR-Cas9 predstavlja pomemben znanstveni dosežek, ki bi v prihodnosti lahko preprečil razvoj ali olajšal zdravljenje številnih hudih monogenških bolezni že v najzgodnejših fazah razvoja posameznikov. Raziskave na živalskih modelih in človeških zarodkih so pokazale, da je ciljno spreminjanje genoma tehnično izvedljivo, vendar metoda še ni dovolj natančna in varna za rutinsko klinično uporabo. Med največja tveganja sodijo: spremembe genoma, mozaicizem, večje delecije DNK in nepredvidljive posledice teh sprememb, ki bi se lahko prenesle na prihodnje generacije.

Primer rojstva deklic Lulu in Nane je pokazal, da samo tehnična izvedljivost posega ne pomeni tudi njegove znanstvene, medicinske in etične upravičenosti. Poseg je bil opravljen kljub obstoju varnejših možnosti za zmanjšanje tveganja prenosa HIV, rezultati spreminjanja gena *CCR5* pa niso bili povsem predvidljivi. Primer je zato opozoril na potrebo po strogem nadzoru raziskav, preglednosti postopkov in mednarodno usklajenih pravilih za uporabo tehnologij spreminjanja zarodne linije.

Posebno pomembno je ločevanje med uporabo genskega spreminjanja za preprečevanje bolezni in njegovo zlora- bo za izboljšanje telesnih, kognitivnih ali drugih družbeno zaželenih lastnosti. Zadnja bi lahko povečala družbene neenakosti in diskriminacijo ter okrepila obstoječe stereotipe in norme. Nadaljnji razvoj genskega spreminjanja zato ne sme biti usmerjen le v izboljševanje učinkovitosti te tehnologije, ampak mora vključevati tudi etične, pravne, socialne in psihološke vidike.

Gensko spreminjanje zarodkov ima velik potencial v prihodnosti medicine, a so pred uvedbo potrebni zanesljivejši dokazi o varnosti, dolgoročnih posledicah in o medicinski upravičenosti posegov ter jasna določitev bolezni in okoliščin, pri katerih bi bila uporaba te tehnologije sprejemljiva.

-
- [1] U.S. Food And Drug Administration. 2023. FDA approves first gene therapies to treat patients with sickle cell disease. <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-approves-first-gene-therapies-treat-patients-sickle-cell-disease>
- [2] Manchester Rare Conditions Centre. 2025. New hope for children with Hunter Syndrome. <https://www.mrcc.org.uk/our-impact/new-hope-for-children-with-devastating-rare-genetic-disorder-thanks-to-world-first-research-in-manchester/>
- [3] Ma Y., Zhang L., Huang X. 2014. Genome modification by CRISPR/Cas9. The FEBS Journal, 281, 23:5186-5193, <https://doi.org/10.1111/febs.13110>
- [4] Lea R. A., Niakan K. K. 2019. Human germline genome editing. Nature Cell Biology. <https://doi.org/10.1038/s41556-019-0424-0>
- [5] Wang H., Yang H., Shivalilla C. S., Dawlaty M. M. ... Jaenisch R. 2013. One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. Cell. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.04.025>
- [6] Long C., McAnally J. R., Shelton J. M., Mireault A. A. ... Olson E. N. 2014. Prevention of muscular dystrophy in mice by CRISPR/Cas9-mediated editing of germline DNA. Science. 345, 6201:1184-1188. <https://doi.org/10.1126/science.1254445>
- [7] Niu Y., Shen B., Cui Y., Chen Y. ... Sha J. 2014. Generation of gene-modified cynomolgus monkey via Cas9/RNA-mediated gene targeting in one-cell embryos. Cell, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.01.027>
- [8] Kang X., He W., Huang Y., Yu Q. ... Fan Y. 2016. Introducing precise genetic modifications into human 3PN embryos by CRISPR/Cas-mediated genome editing. Springer Nature, <https://link.springer.com/article/10.1007/s10815-016-0710-8>
- [9] Mattar C. N. Z., Labude M. K., Lee T. N., Lai P. S. 2021. Ethical considerations of preconception and prenatal gene modification in the embryo and fetus. Human Reproduction, <https://doi.org/10.1093/humrep/deab222>
- [10] Prior T. W., Leach M. E., Finanger E. L. 2000. Spinal muscular atrophy. V: Adam M. P., Bick S., Mirzaa G. M. idr., ur. GeneReviews®. University of Washington, Seattle. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1352/>
- [11] Ernst M. P. T., Broeders M., Herrero-Hernandez P., Oussoren E. ... Pijnappel W. W. M. P. 2020. Ready for repair? Gene editing enters the clinic for the treatment of human disease. Molecular Therapy – Methods & Clinical Development, <https://doi.org/10.1016/j.omtm.2020.06.022>
- [12] Guggino W. B., Cebotaru L. 2020. Gene therapy for cystic fibrosis paved the way for the use of adeno-associated virus in gene therapy. Human Gene Therapy, <https://doi.org/10.1089/hum.2020.046>
- [13] Lee C. E., Singleton K. S., Wallin M., Faundez V. 2020. Rare genetic diseases: Nature’s experiments on human development. iScience, <https://doi.org/10.1016/j.isci.2020.101123>
- [14] Mattar C. N. Z., Chew W. L., Lai P. S. 2024. Embryo and fetal gene editing: Technical challenges and progress toward clinical applications. Molecular Therapy – Methods & Clinical Development, <https://doi.org/10.1016/j.omtm.2024.101229>
- [15] Major R. M., Juengst E. T. 2025. Prenatal gene editing for neurodevelopmental diseases: Ethical considerations. The American Journal of Human Genetics, <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2025.01.003>
- [16] Cotten C. M. 2017. Pulmonary hypoplasia. Seminars in Fetal and Neonatal Medicine, <https://doi.org/10.1016/j.siny.2017.06.004>
- [17] Musallam K. M., Cappellini M. D., Coates T. D., Kuo K. H. M. ... Taher A. T. 2024. Alpha-thalassemia: A practical overview. Blood Reviews, <https://doi.org/10.1016/j.blre.2023.101165>
- [18] Chalmers E., Williams M., Brennand J., Liesner R. ... Richards M., Paediatric working party of the United Kingdom Haemophilia doctors’ organization. 2011. Guideline on the management of haemophilia in the fetus and neonate. British Journal of Haematology, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2010.08545.x>
- [19] McCusker C., Upton J., Warrington R. 2018. Primary immunodeficiency. Allergy, Asthma & Clinical Immunology, <https://doi.org/10.1186/s13223-018-0290-5>
- [20] Dowling D. J., Levy O. 2014. Ontogeny of early life immunity. Trends in Immunology, <https://doi.org/10.1016/j.it.2014.04.007>
- [21] O’Connell A. E. 2019. Primary immunodeficiency in the NICU. NeoReviews, <https://doi.org/10.1542/neo.20-2-e67>
- [22] Sagar R., Almeida-Porada G., Blakemore K., Chan J. K. Y. ... David A. L. 2020. Fetal and maternal safety considerations for in utero therapy clinical trials: iFeTiS consensus statement. Molecular Therapy, <https://doi.org/10.1016/j.jymthe.2020.10.012>
- [23] Pang R. T. K., Ho P. C. 2016. Designer babies. Obstetrics, Gynaecology & Reproductive Medicine, <https://doi.org/10.1016/j.ogrm.2015.11.011>
- [24] Boyle B., Addor M.-C., Arriola L., Barisic I. ... Dolk H. 2018. Estimating global burden of disease due to congenital anomaly: An analysis of European data. Archives of Disease in Childhood – Fetal and Neonatal Edition, <https://doi.org/10.1136/archdischild-2016-311845>
- [25] World Health Organization. 2026. HIV and AIDS. World Health Organization, <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hiv-aids>
- [26] Zafer M., Horvath H., Mmeje O., van der Poel S. ... Brown J. 2016. Effectiveness of semen washing to prevent human immunodeficiency virus (HIV) transmission and assist pregnancy in HIV-discordant couples: A systematic review and meta-analysis. Fertility and Sterility, <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2015.11.028>
- [27] Rose B. I., Brown S. 2019. Genetically modified babies and a first application of clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR-Cas9). Obstetrics & Gynecology, <https://doi.org/10.1097/AOG.0000000000003327>
- [28] Harper J. C., Schatten G. 2019. Are we ready for genome editing in human embryos for clinical purposes? European Journal of Medical Genetics, <https://doi.org/10.1016/j.ejmg.2019.103682>
- [29] Martinson J. J., Chapman N. H., Rees D. C., Liu Y.-T., Clegg J. B. 1997. Global distribution of the CCR5 gene 32-basepair deletion. Nature Genetics, <https://doi.org/10.1038/ng0597-100>
- [30] Greely H. T. 2019. CRISPR’d babies: Human germline genome editing in the ‘He Jiankui affair’. Journal of Law and the Biosciences, <https://doi.org/10.1093/jlb/lz010>
- [31] Biscontini T. 2023. The He Jiankui affair. EBSCO Research Starters, <https://www.ebsco.com/research-starters/religion-and-philosophy/he-jiankui-affair>
- [32] Regalado A. 2019. China’s CRISPR twins might have had their brains inadvertently enhanced. MIT Technology Review, <https://www.technologyreview.com/2019/02/21/137309/the-crispr-twins-had-their-brains-altered/>
- [33] Alonso M., Savulescu J. 2021. He Jiankui’s gene-editing experiment and the non-identity problem. Bioethics, <https://doi.org/10.1111/bioe.12878>
- [34] Wiley L., Cheek M., LaFar E., Ma X. ... Iltis A. 2025. The ethics of human embryo editing via CRISPR-Cas9 technology: A systematic review of ethical arguments, reasons, and concerns. HEC Forum, <https://doi.org/10.1007/s10730-024-09538-1>
- [35] Chin A. H. B., Nguma J. D. B., Ahmad M. F. 2024. Stringent criteria needed for germline genome editing of human IVF embryos. Journal of Assisted Reproduction and Genetics, <https://doi.org/10.1007/s10815-024-03125-6>
- [36] Handside A. H. 2018. ‘Designer babies’ almost thirty years on. Reproduction, <https://doi.org/10.1530/REP-18-0157>
- [37] Sparrow R. 2019. Yesterday’s child: How gene editing for enhancement will produce obsolescence—and why it matters. The American Journal of Bioethics, <https://doi.org/10.1080/15265161.2019.1618943>
- [38] Döbler N. A., Carbon C. C. 2025. Does creating the perfect child mean enforcing or dismantling normative gender stereotypes? Evidence from an interactive virtual genetic engineering exhibit. Acta Psychologica, <https://doi.org/10.1016/j.actpsy.2025.104748>
- [39] Greely H. T. 2021. CRISPR people: The science and ethics of editing humans. The MIT Press, <https://doi.org/10.7551/mitpress/13492.001.0001>

Biotehnološki in farmakološki pristopi za PODALJŠEVANJE ŽIVLJENJSKE DOBE

Lara Comino¹, Zarja Černeka¹, Zara Kolenc¹, Pia Krušnik¹, Zoja Šauer¹

¹ Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije, Jamnikarjeva 101, 1000 Ljubljana

Ključne besede: staranje, genetska modifikacija, gerontogeni, CRISPR-Cas9, epigenetsko reprogramiranje

IZVLEČEK

Napredek genetike in biotehnologije je omogočil nove raziskave o podaljševanju življenjske dobe in upočasnjevanju procesov staranja. Znanstveniki danes raziskujejo gene in tehnologije, ki bi lahko vplivale na dolgoživost ter izboljšale kakovost življenja v starosti. Članek obravnava biološke procese staranja, ključne gerontogene in najpomembnejše biološke poti dolgoživosti. Predstavljeni so sodobni genetski in epigenetski pristopi, vključno s sistemom CRISPR-Cas, z gensko terapijo in epigenetskim reprogramiranjem. Članek prav tako analizira rezultate eksperimentalnih raziskav na modelnih organizmih in ovrednoti možnosti uporabe podobnih pristopov pri ljudeh. Pri uporabi genskih tehnologij pa je treba omeniti tudi etična vprašanja in nevarnosti takšnih metod.

Uvod

Težnje po podaljšanju človeške življenjske dobe že od nekdaj predstavljajo enega osrednjih izzivov v znanosti. Z razvojem molekularne biologije, genetike in biotehnologije pa se je razumevanje staranja preoblikovalo iz pasivnega biološkega dejstva v reguliran biološki proces, na katerega je mogoče do določene mere aktivno vplivati [1].

Čeprav se povprečna življenjska doba prebivalstva zaradi napredka medicine in izboljšanja življenjskih razmer podaljšuje, se s staranjem povečuje tudi pojavnost kroničnih bolezni, kot so Alzheimerjeva bolezen, Parkinsonova bolezen, srčno-žilne bolezni in rak. Zato sodobne raziskave niso usmerjene zgolj v podaljševanje življenjske dobe, temveč predvsem v podaljšanje obdobja zdravega življenja [2].

Genetske raziskave kažejo, da geni in njihovo izražanje pomembno vplivajo na hitrost biološkega staranja. Prav zato je bila tako pomembna identifikacija gerontogenov – genov, ki vplivajo na hitrost staranja. Razumevanje njihovega delovanja je postavilo temelje za razvoj tehnologij, kot je sistem CRISPR-Cas9, ki omogoča natančno spreminjanje genoma. Raziskovalci se vse bolj posvečajo tudi genski terapiji in epigenetskemu reprogramiranju, ki sodijo med najhitreje razvijajoča se področja sodobne biomedicine [3, 4].

Kljub izjemnemu napredku na modelnih organizmih pa prenos genetskih modifikacij v humano medicino prinaša številne izzive, med njimi tudi etična in družbena vprašanja, ki bodo pomembno vplivala na prihodnjo uporabo teh metod.

Kaj je staranje?

Staranje lahko opredelimo kot s časom povezano poslabšanje fizioloških funkcij, potrebnih za preživetje in plodnost [5].

Staranje pa ni enoten proces. Ne gre zgolj za kopičenje poškodb v organizmu. Mnogi evlucijski biologi [6, 7] menijo, da je staranje posledica zmanjšane vpliva naravne selekcije v odraslosti. Posledično se slabšajo mehanizmi, ki vzdržujejo prilagojenost organizma. Pomembno vlogo igrajo genetski in evlucijski dejavniki, celične spremembe ter okolje [8].

Na celični ravni se med staranjem kopičijo različne spremembe, kot so poškodbe DNK, krajšanje telomer, motnje v popravljanju DNK in zmanjšana sposobnost obnavljanja celic. Ena od pomembnih sprememb je celična senescenca, stanje, v katerem celice trajno prenehajo z delitvijo, vendar ostanejo presnovno aktivne. To prispeva k slabšemu delovanju tkiv in posledično delovanju organskih sistemov. V mišično-skeletnem sistemu se na primer pojavi izguba mišične mase in kostne gostote [9]. Spremembe v DNK so del razloga, da se ljudje biološko staramo različno hitro, vendar imajo na hitrost staranja velik vpliv tudi okoljski dejavniki, ki spreminjajo izražanje genov prek epigenetskih mehanizmov [10]. Novejše analize rodovnikov kažejo, da genetika pojasni le približno 10 do 15 % razlik v življenjski dobi, pri čemer postane vpliv genov na staranje izrazitejši predvsem po 60. letu starosti [11, 12].

Ker imajo pri hitrosti biološkega staranja pomembno vlogo geni in njihovo izražanje, se raziskave vse bolj osre-

dotočajo na prepoznavanje genov, ki vplivajo na dolgoživost. Boljše razumevanje njihovega delovanja omogoča razvoj genetskih in epigenetskih postopkov, s katerimi bi bilo mogoče upočasniti biološko staranje ter podaljšati obdobje zdravega življenja [13].

Geni, povezani z dolgoživostjo

Gene, ki vplivajo na dolgoživost, imenujemo gerontogeni. Ti geni z uravnavanjem ključnih celičnih procesov neposredno ali posredno vplivajo na hitrost staranja. Raziskovanje gerontogenov je izjemno pomembno, saj vplivajo na življenjsko dobo posameznika in tudi na njegovo obdobje zdravega življenja [2]. Pri tem je ključno razlikovati med obema pojmom. Medtem ko življenjska doba označuje celotno časovno obdobje od rojstva do smrti, obdobje zdravega življenja pomeni čas brez prisotnosti hujših kroničnih bolezni in upada funkcionalnih zmogljivosti [2, 14].

Genetika ima pomemben vpliv na staranje, vendar pa ne obstaja en sam gen za dolgoživost. Staranje je namreč poligenski proces, ki ga usmerja cela mreža medsebojno povezanih genov in celičnih poti. Znanstveniki so to kompleksno omrežje razdelili v štiri glavne biološke poti [2, 15]. Prva pot vključuje vzdrževanje genomske stabilnosti in ohranjanje telomer. S starostjo učinkovitost delitve celic ter delovanje encimov za popravljanje DNK upadeta, kar vodi do vse več genetskih poškodb [2]. Geni, ki kodirajo encime za popravo DNK, zato neposredno prispevajo k ohranjanju celične funkcije [1, 2]. Ključno vlogo pri tem ima gen *TERT*, ki kodira encim telomerozo. Ta ob vsaki delitvi prispeva k vzdrževanju dolžine telomer in s tem omejuje telomerno disfunkcijo ter prezgodnjo celično senescenco. Čeprav je z zvišanjem aktivnosti telomerase mogoče podaljšati življenjsko dobo celic, znanstveniki opozarjajo, da lahko njeno nenadzorovano delovanje povzroči razvoj tumorjev [2].

Druga pomembna pot vključuje uravnavanje celične rasti in zaznavanja hranil preko signalne poti tarče rapamicina pri sesalcih (mTOR). Beljakovinski kompleks mTOR (natančneje kompleks mTORC1) zaznava hranila v celici ter ob zadostni količini hrane spodbuja celično rast in nastajanje beljakovin [2]. Zaviranje mTORC1, na primer z rapamicinom, lahko posnema nekatere molekularne učinke energijskega oziroma hranilnega pomanjkanja ter spodbuja procese, povezane z vzdrževanjem celične homeostaze, vključno z avtofagijo. Avtofagija je proces, v katerem celica razgradi in reciklira svoje poškodovane beljakovine ter dele celic. S tem usmerjenim odstranjevanjem poškodovanih celičnih struktur se upočasni staranje tkiv in zmanjša nastanek starostnih bolezni [2, 15].

Tretjo pot predstavlja inzulinska signalna pot oziroma pot inulinu podobnega rastnega faktorja 1 (IGF-1), ki je prav tako tesno povezana z zaznavanjem hranil. Visoke ravni IGF-1 celici sporočajo, da je hrane dovolj in spodbujajo njeno rast, hkrati pa zavirajo njene popravilne me-

hanizme. Zmanjšanje aktivnosti te poti posnema učinke kalorične restrikcije, kar upočasni presnovo in poveča obrambo celice pred oksidativnim stresom [2]. Pomemben regulator te poti je beljakovina Klotho, ki jo kodira gen *KLOTHO*. Klotho je pomemben regulator signalizacije inzulina/IGF-1, ki lahko vpliva na procese, povezane z odzivom na stres in dolgoživostjo. Z zmanjšanjem aktivnosti inzulinske/IGF-1 signalne poti se zmanjša fosforilacija FOXO3, kar omogoča njegovo kopičenje v jedru in aktivacijo genov, povezanih s celično zaščito [16, 17, 18].

Četrto pot predstavlja epigenetsko preoblikovanje, v katerem ima osrednjo vlogo družina beljakovin, imenovanih sirtuini. Gre za skupino od NAD⁺ odvisnih encimov, ki jih pri človeku kodira sedem genov (*SIRT1-7*). Ti encimi uravnavajo izražanje genov, njihovo delovanje pa je neposredno odvisno od ravni molekule NAD⁺, katere količina s staranjem naravno pada. Ko so sirtuini aktivni, spreminjajo pakiranje DNK in s tem nadzorujejo, kateri geni so vklopljeni in kateri izklopljeni. S tem omogočajo popravilo poškodb genetskega zapisa, ohranjajo stabilnost celičnega jedra ter zavirajo vnetne procese. Poleg tega sirtuini spodbujajo nastajanje novih mitohondrijev in izboljšujejo porabo energije v celici. Zmanjšana aktivnost sirtuinov zaradi pomanjkanja NAD⁺ zato pospešuje nezaželene epigenetske spremembe, ki vodijo v celično oslabeitev in razvoj bolezni, povezanih s starostjo [2, 19].

Vse opisane celične poti ponujajo pomemben vpogled v mehanizme staranja, vendar so asociacijske študije celotnega genoma (GWAS) pokazale, da pri posameznikih, ki dočakajo sto ali več let, dosledno izstopata predvsem varovalna alela dveh genov. Gre za genetski različici, ki pomembno prispevata k odpornosti organizma proti okvaram in k ohranjanju zdravja v visoki starosti [19].

Prvi gen je gen *APOE*, ki kodira apolipoprotein E. Ta je pomemben za prenos holesterola ter usmerjanje transporta lipidov in obnovo poškodb v možganih. *APOE* se v populaciji pojavlja v treh glavnih alelnih različicah, in sicer ε2, ε3 in ε4, pri čemer je alel ε3 najbolj pogost. Alel ε4 znatno povečuje tveganje za razvoj Alzheimerjeve bolezni in srčno-žilnih obolenj. Nasprotno pa je pri posameznikih z izjemno dolgo življenjsko dobo veliko pogostejši alel ε2. Ta pomaga vzdrževati nižje ravni škodljivega LDL-holesterola ter s tem deluje kot pomemben genetski zaščitni mehanizem pred glavnimi vzroki smrti v starosti [14].

Drugi ključni gen je gen *FOXO3*, ki kodira beljakovino Forkhead box O3. Ta je osrednji dejavnik v inzulinski poti in poti signaliziranja IGF-1. Študije GWAS so pri posameznikih z izjemno dolgo življenjsko dobo po vsem svetu potrdile specifične polimorfizme posameznih nukleotidov v genu *FOXO3*, ki povečujejo njegovo aktivnost [19]. Ko se pot IGF-1 umiri, nefosforilirani FOXO3 vstopi v celično jedro, kjer deluje kot ključni regulator celične zaščite. V jedru sproži odziv na oksidativni stres, spodbuja razgradnjo in recikliranje poškodovanih celičnih sestavin ter ohranja celično homeostazo tudi v visoki starosti [16, 19].

Identifikacija teh dveh genetskih variant pojasnjuje pomemben del naravne zaščite pred staranjem. Spoznanje, kateri geni so v procesu staranja ključni, pa odpira tudi

Preglednica 1: Geni, povezani s staranjem

GEN	GLAVNA FUNKCIJA	POVEZAVA S STARANJEM
<i>TERT</i>	Kodira encim telomerozo, ki ohranja dolžino telomer ob celični delitvi.	Omejuje telomerno disfunkcijo ter prezgodnjo celično senescenco.
Geni v poti mTORC1	Kodirajo komponente beljakovinskega kompleksa mTORC1, ki zaznava hranila ter spodbuja celično rast in sintezo beljakovin.	Zaviranje te poti (npr. z rapamicinom) posnema pomanjkanje hranil in sproži avtofagijo, kar upočasni staranje tkiv in zmanjša nastanek starostnih bolezni.
<i>KLOTHO</i>	Kodira beljakovino Klotho, ki uravnava signalno pot inzulina/IGF-1.	Zmanjšuje aktivnost poti inzulina/IGF-1, kar zmanjša fosforilacijo FOXO3 in aktivira gene, povezane s celično zaščito.
<i>SIRT1-7</i>	Kodirajo sirtuine (od NAD ⁺ odvisne encime), ki uravnavajo izražanje genov.	Omogočajo popravilo DNK, ohranjajo stabilnost jedra, zavirajo vnetne procese ter spodbujajo nastanek mitohondrijev.
<i>APOE</i>	Kodira apolipoprotein E za prenos holesterola in usmerja transport lipidov ter obnovo poškodb v možganih.	Alel ε2 znižuje raven škodljivega LDL-holesterola ter deluje kot genetski zaščitni mehanizem pred glavnimi vzroki smrti v starosti.
<i>FOXO3</i>	Kodira beljakovino FOXO3, transkripcijski dejavnik, ki uravnava celično zaščito, odziv na stres in avtofagijo.	Povečana aktivnost gena omogoča vstop nefosforiliranega FOXO3 v jedro, kjer ta aktivira zaščitne mehanizme za ohranjanje homeostaze.

Metode genske modifikacije

Genska modifikacija je proces spreminjanja genskega materiala, ki ga lahko umetno izvajamo z metodami genskega inženirstva. Omogoča nam upočasnjevanje procesov staranja ter bolezni, ki so z njim povezane [20]. Ena izmed najpomembnejših metod z velikim potencialom za upočasnjevanje celičnega staranja (senescence) je uporaba gruč enakomerno prekinjenih kratkih palindromnih ponovitev in z njimi povezanega proteina Cas9 (CRISPR-Cas9). To je eno najnaprednejših in najnatančnejših orodij za urejanje genoma [21, 22]. Sestavljen je iz vodilne RNK in proteina Cas9. Prva omogoči prepoznavo tarčne DNK, drugi pa povzroči dvoverižni prelom [3]. To omog-

možnosti za njihovo spreminjanje s sodobnimi metodami genskega inženirstva.

oča natančno ciljanje treh različnih skupin genov: tistih, ki sodelujejo pri razvoju starostnih bolezni, uravnavanju celične senescence in vzdrževanju telomer [23]. CRISPR-Cas9 se preučuje kot potencialno orodje za popravljanje mutacij pri nevrodegenerativnih boleznih, kot sta Alzheimerjeva in Parkinsonova bolezen [22]. Potencial metode so dokazali tudi z uravnavanjem genov *KLOTHO* in *FOXO*, ki sodelujeta pri presnovnih procesih in uravnavanju celične senescence. Raziskave so prav tako pokazale, da je mogoče z uravnavanjem gena *TERT* vplivati na delovanje telomeraz in s tem na ohranjanje dolžine telomer [23, 24].

Čeprav je CRISPR-Cas9 zelo učinkovita metoda genske modifikacije, pa vzbuja tudi nekaj pomislekov. Ena od največjih skrbi so nepredvidljivi netarčni učinki, ki povzročajo škodljive spremembe v genomu [22, 23]. Za zmanjšanje teh tveganj sta bili razviti novejši tehnologiji CRISPR, imenovani bazno urejanje in urejanje s prajmerji (*angl.* Prime editing). Ti dve metodi omogočata neposredne in natančne točkovne mutacije DNK brez dvoverižnega preloma [25]. Bazno urejanje omogoča pretvorbo posameznih baznih parov, medtem ko prime editing omogoča tudi insercijo in delecijo [26]. Bazno urejanje so uporabili za odkrivanje različice genov, povezanih s telomernimi motnjami. Znanstveniki so z baznim urejanjem prav tako uspešno pretvorili gen *APOE4*, najpogostejši genetski dejavnik Alzheimerjeve bolezni, in s tem potrdili potencial metode za zdravljenje genetskih vzrokov starostnih bolezni [25, 27]. Kljub svoji natančnosti pa se pri obeh metodah srečujemo s problemom varnega in učinkovitega vnosa sistemov za urejanje genoma v celico [26]. Poleg metod genskega inženirstva, kot je CRISPR-Cas9, za zdravljenje in preprečevanje bolezni uporabljamo tudi gensko terapijo. Njena posebnost je, da omogoča vnos genov tudi v odrasle in starajoče se organizme. Z vnosom genov je mogoče vplivati na regulatorne gene in signalne poti ter s tem upočasniti procese staranja in podaljšati obdobje zdravega življenja [28, 29]. V boju s staranjem so najpogostejše terapije za podaljševanje telomer. Terapija z genom *TERT* je na miših kot modelnih organizmih izkazala potencial za zdravljenje mnogih nevrodegenerativnih bolezni, povezanih s starostjo, med katerimi je tudi Alzheimerjeva bolezen [29]. Tudi dostava faktorjev OSK, skupine transkripcijskih dejavnikov, je v živalskih modelih pokazala pomembne učinke na procese staranja. Ker je veliko starostnih bolezni med seboj povezanih, so najbolj učinkovite kombinirane genske terapije, ki hkrati delujejo na več bolezenskih procesov [30]. Genske terapije že napredujejo v fazah kliničnih preizkušenj, njihovo uporabo pa omejujejo predvsem izven tarčni učinki in imunski odziv organizma. Prav tako pa genske terapije ne delujejo le na posamezne bolezni, ampak osnovne biološke procese staranja, kar hkrati zmanjšuje tveganje za razvoj s staranjem povezanih kroničnih bolezni [28, 29]. Med najobetavnejše pristope sodi tudi epigenetsko reprogramiranje, ki temelji na uravnavanju izražanja genov z uporabo sodobnih metod genskega inženirstva [31]. Staranje spremljajo številne epigenetske spremembe, ki vplivajo na izražanje genov, ne da bi pri tem spreminjale zaporedje DNK. Te se z leti kopičijo in povzročijo postopno izgubo normalnega uravnavanja genov, kar vodi v moteno delovanje celic in pojav značilnosti staranja. Ker so epigenetske spremembe vsaj delno reverzibilne, predstavljajo

osnovo epigenetskega reprogramiranja, enega najsodobnejših pristopov k upočasnjevanju staranja [4, 31]. Med najobetavnejšimi strategijami je delno celično reprogramiranje z Yamanakovimi dejavniki (OSKM ali OSK faktorji), ki delno povrnejo mladostne lastnosti celice. To omili celično staranje, hkrati pa ohrani specializirano vlogo celic z manjšim tveganjem za tumorigenezo kot pri popolnem reprogramiranju. [4, 32]. Kljub velikemu potencialu ostajajo opisani pristopi predvsem v fazi eksperimentalnih raziskav. Njihovo učinkovitost, varnost in omejitve raziskovalci zato še naprej preučujejo v številnih poskusih na živalskih modelih [31].

Poskusi na živalih

Raziskave genetskih sprememb, ki vplivajo na proces staranja in dolgoživost, se večinoma izvajajo na modelnih organizmih, saj so neposredni poskusi na ljudeh zaradi dolge življenjske dobe ter etičnih omejitev izjemno zahtevni in praktično neizvedljivi. Med najpogostejše uporabljene modelne organizme so kvasovka (*Saccharomyces cerevisiae*), črv (*Caenorhabditis elegans*), navadna vinska mušica (*Drosophila melanogaster*) in laboratorijska miš (*Mus musculus*). Ti organizmi imajo kratko življenjsko dobo, dobro preučen genom ter številne evolucijsko ohranjene mehanizme staranja, ki so primerljivi s človeškimi [33]. Črvi (*C. elegans*) so služili kot ključni modelni organizmi v prvih obsežnejših genomskih raziskavah, usmerjenih v odkrivanje genov, ki vplivajo na dolgoživost. Te raziskave so temeljile na uporabi metode RNK-interference, ki omogoča selektivno zmanjšanje izražanja posameznih genov in s tem preučevanje njihovega vpliva na življenjsko dobo organizma [34]. Pri *C. elegans* je mogoče utišati skoraj kateri koli gen s hranjenjem z bakterijo *Escherichia coli*, ki sintetizira specifično dvoverižno RNK. Na podlagi tega mehanizma so z uporabo bakterijske knjižnice laboratorija Ahinger z več kot 15.000 sevi v dveh ključnih študijah preučevali vpliv utišanja genov na dolgoživost [34]. Preučevanje mehanizmov staranja se je bistveno preoblikovalo z odkritjem, da gen *DAF-2* pri *C. elegans* neposredno določa dolgoživost odraslih osebkov. Gen *DAF-2* in drugi geni iz družine *DAF* primarno uravnavajo prehode v stanje dauer. To je oblika mirovanja, ki se sproži ob neugodnih okoljskih pogojih, kot so pomanjkanje hrane, povišana temperatura ali visoka gostota populacije. V tem stanju organizem z zmanjšanjem gibljivosti in prekinitvijo hranjenja preživi neugodne razmere, ob izboljšanju okolja pa nadaljuje normalen razvoj do odraslosti. Ko so odrasli mutanti izpostavljeni povišani temperaturi, se pri njih namesto vstopa v stanje dauer pojavi do dvakratno podaljšanje življenjske dobe. Ta pojav nakazuje, da mutirani *DAF-2* aktivira specifične preživetvene mehanizme, značilne za dauer, ne da bi organizem dejansko prevzel to razvojno

obliko. Omenjena ugotovitev predstavlja prvi empirični dokaz obstoja namenske genetske signalne poti, ki neposredno nadzoruje dolgoživost [35].

Vinske mušice (*Drosophila melanogaster*) so zaradi kratke življenjske dobe, velikega števila potomcev (približno 200 potomcev na samico), enostavnega laboratorijskega gojenja in nizkih stroškov vzdrževanja eden izmed najpomembnejših modelnih organizmov za raziskovanje procesov staranja in dolgoživosti. Velika prednost vinskih mušic je, da imajo z ljudmi številne skupne transkripcijske faktorje ter mehanizme uravnavanja izražanja genov. Zato so primeren modelni organizem za raziskovanje procesov, ki so pomembni tudi pri človeku [36].

Na rezultate raziskav dolgoživosti pri vinskih mušicah poleg genetskih sprememb vplivajo tudi številni drugi dejavniki, kot so prehrana, temperatura in okoljski pogoji. Pomembno vlogo imata tudi spol in reproduktivni status živali. Raziskave so pokazale, da se samice na prehransko restrikcijo odzovejo z večjim podaljšanjem življenjske dobe kot samci, neparjene samice pa živijo dlje od parjenih. Pri načrtovanju poskusov je zato nujno zagotoviti primerljivo genetsko ozadje vseh preučevanih linij [36].

Znanstveniki so ugotovili, da imajo vinske mušice več inzulinu podobnih peptidov (Ilp1-Ilp7). Če izklopijo gen za Ilp2 (ta je najbolj podoben človeškemu), ali pa uničijo celice, ki te peptide proizvajajo, se življenjska doba mušic izrazito podaljša. Podoben učinek imajo tudi mutacije na inzulinskem receptorju (InR) in njegovi pomožni beljakovini (chico). Vendar pa so učinki odvisni od spola mušice in specifične genske kombinacije. Pri določenih kombinacijah mutacij InR se je življenjska doba samic podaljšala kar za 85 % [36].

Možnost uporabe pri ljudeh

Številne raziskave so usmerjene v upočasnitev bioloških procesov staranja, saj je staranje eden najpomembnejših dejavnikov tveganja za razvoj kroničnih bolezni. Med najpogostejše bolezni, povezane s staranjem, spadajo srčno-žilne bolezni, sladkorna bolezen tipa 2, nevrodegenerativne bolezni (npr. Alzheimerjeva in Parkinsonova bolezen), osteoporoza ter različne oblike raka [37]. Med najobetavnejše pristope za zdravljenje starostnih bolezni sodijo zdravila, ki delujejo na temeljne biološke procese staranja, kot so: celična senescenca, motnje signalne poti mTOR, kronično vnetje in poškodbe DNK. V

središču raziskav so senolitiki, metformin, rapamicin in druge učinkovine, ki so pri različnih živalskih vrstah že pokazale sposobnost podaljšanja življenjske dobe ter izboljšanja zdravstvenega stanja. Kljub obetavnim rezultatom pa za zdaj ni dovolj dokazov, da bi bilo mogoče te ugotovitve neposredno prenesti tudi na ljudi, saj trenutno prihajajo iz modelnih organizmov. Človeško staranje je bistveno kompleksnejše od staranja modelnih organizmov, prav tako pa podaljšanje življenjske dobe ne pomeni nujno tudi podaljšanja zdravega življenja [37].

Trenutno ni še nobene odobrene genske terapije za podaljševanje življenjske dobe. Večina podatkov izhaja iz predkliničnih raziskav, ki pa so v boju proti staranju bolj usmerjene v raziskovanje metformina in rapamicina in ne v genske terapije, zato njihova dolgoročna varnost zaenkrat še ni znana [37].

Kaj pa etika?

Ko razmišljamo o etiki genske terapije, jo je najprej treba razdeliti na gensko terapijo somatskih celic in dedno gensko terapijo. Etičnost posega se ocenjuje z razmerjem med obsegom in verjetnostjo škode ter pričakovanimi koristmi. Pri somatski genski terapiji se to oceni s standardnim izračunom medicinskega tveganja in koristi, pri dednih posegih pa etičnost težje ocenimo, saj bo terapija vplivala na osebe, ki še ne obstajajo in ne morejo dati soglasja [38]. Ker v tem članku govorimo skoraj izključno o somatski genski terapiji, bo ta tudi v nadaljevanju v ospredju.

Ker je genska terapija zelo drag poseg, je pomembno vprašanje, ki ga moramo nasloviti, kako bo dostopna vsem slojem prebivalstva. Drugače bi dolgoživost postala realnost samo za peščico, s čimer bi se poglobila razlika v dostopnosti do zdravstva, ekonomskih priložnostih ter kvaliteti življenja nasploh [39]. Prav tako bi se lahko pojavilo izključevanje, nespoštovanje in zasmehovanje ljudi, ki se za terapijo ne bi odločili, ter vprašanje, kako bi take ljudi obravnavalo javno zdravstvo oz. zdravstveno zavarovanje [40]. Takšna vprašanja bi se lahko pojavljala tudi, če bi se terapija hitro razširila, obstajali pa bi posamezniki, ki bi še vedno živeli z boleznijo [41, 42]. Prav tako bi lahko daljše življenje povzročalo dodaten pritisk na pomanjkanje delovnih mest in prebivališč, socialno varstvo ter na nekatere življenjske potrebe. S tem bi lahko obremenili tudi okolje, saj bi bili potrošniški cikli daljši [43, 44].

Na globalni ravni terapija ne sme povečati že obstoječe razlike v zdravstvu med manj in bolj razvitimi državami. Glede na to, da bo vpeljevanje terapije v države, ki imajo že sedaj slabo razvito zdravstvo in pomanjkljivo infrastrukturo, zelo težko, bi to lahko povečalo razlike med državami. Tako bi prebivalci bolj razvitih držav živeli z manjšim bremenom bolezni, povezanim s staranjem, v slabše razvitih državah pa bi jih še vedno imeli, kar bi vplivalo na njihov nadaljnji razvoj in kompetenco [39]. Poleg tega je pomembno, kako bi različne družbe sprejele terapijo, saj bi družba, ki ceni mladost, terapijo odprto sprejela, družba, ki staranje dojema kot naraven proces, pa bi terapijo sprejela s skepticizmom ali pa celo z zavračanjem [39].

Zaključek

Raziskave v zadnjih desetletjih so pokazale, da staranje ni zgolj neizogiben biološki proces, temveč skupek zapletenih celičnih in molekularnih mehanizmov, na katere je mogoče do določene mere vplivati. Odkritje genov, povezanih z dolgoživostjo, ter razvoj sodobnih metod genskega inženirstva sta omogočila nove pristope pri upočasnjevanju procesov staranja. Poskusi na modelnih organizmih so že pokazali, da je mogoče podaljšati obdobje zdravega življenja.

Kljub obetavnim rezultatom ostaja uporaba teh metod pri ljudeh za zdaj omejena. Pred njihovo klinično uporabo bo treba dodatno ovrednotiti njihovo varnost, dolgoročne učinke in odgovoriti na številna etična vprašanja. Čeprav podaljšanje človeške življenjske dobe za zdaj ostaja predvsem cilj znanstvenih raziskav, se kaže, da bi lahko genetske modifikacije v prihodnosti pomembno prispevale k izboljšanju kakovosti življenja v starosti.

- [1] Tyshkovskiy A., Kholdina D., Davitadze M., Molière A. ... Gladyshev V. N. 2026. Universal transcriptomic hallmarks of mammalian ageing and mortality. *Nature*, 654: 173–188, <https://doi.org/10.1038/s41586-026-10542-3>
- [2] Ankrah P., Nyarko R. O., Botwe A. K., Amponsah S. K., Mensah K. B. 2024. Harnessing genetics to extend lifespan and healthspan: current progress and future directions. *Cureus*, 16, 3: e55495, <https://doi.org/10.7759/cureus.55495>
- [3] Jinek M., Chylinski K., Fonfara I., Hauer M. ... Charpentier E. 2012. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 337, 6096: 816–821, <https://doi.org/10.1126/science.1225829>
- [4] Kane A., Sinclair D. 2019. Epigenetic changes during aging and their reprogramming potential. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 54, 1: 61–83, <https://doi.org/10.1080/10409238.2019.1570075>
- [5] Gilbert S. F. 2000. Aging: The biology of senescence. V: *Developmental biology*. 6th ed. Sunderland (MA), Sinauer Associates, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK10041/>
- [6] Medawar P. B. 1952. An unsolved problem in biology. London, H. K. Lewis.
- [7] Kirkwood T. B. L. 1977. Evolution of aging. *Nature*, 270: 301–304, <https://doi.org/10.1038/270301a0>
- [8] Rose M. R., Flatt T., Graves J. L., Greer L. F. ... Shahrestani P. 2012. What is aging? *Frontiers in Genetics*, 3: 134, <https://doi.org/10.3389/fgene.2012.00134>
- [9] Flint B., Tadi P. 2023. Physiology, Aging. Treasure Island (FL), StatPearls Publishing, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK556106/>
- [10] Christensen K., Johnson T. E., Vaupel J. W. 2006. The quest for genetic determinants of human longevity: challenges and insights. *Nature Reviews Genetics*, 7, 6: 436–448, <https://doi.org/10.1038/nrg1871>
- [11] Ruby J. G., Wright K. M., Rand K. A., Kermany A. ... Ball C. 2018. Estimates of the heritability of human longevity are substantially inflated by assortative mating. *Genetics*, 210, 3: 1109–1124, <https://doi.org/10.1534/genetics.118.301613>
- [12] Hjelmborg J. v. B., Iachine I., Skytthe A., Vaupel J. W. ... Christensen K. 2006. Genetic influence on human lifespan and longevity. *Human Genetics*, 119, 3: 312–321, <https://doi.org/10.1007/s00439-006-0144-y>
- [13] Goldman N., Sterner K. N. 2023. Environment, epigenetics, and the pace of human aging. *Annual Review of Anthropology*, 52: 127–145, <https://doi.org/10.1146/annurev-anthro-052721-090516>
- [14] Kim H. J., Cho H. S., Park J. H. 2025. Genetic architecture of human aging and longevity: insights from genome-wide association studies. *BMB Reports*, 58, 1: 12–21, <https://doi.org/10.5483/BMBRep.2025-0226>
- [15] López-Otin C., Blasco M. A., Partridge L., Serrano M., Kroemer G. 2023. Hallmarks of aging: an expanding universe. *Cell*, 186, 2: 243–278, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2022.11.001>
- [16] Kurosu H., Yamamoto M., Clark J. D., Pastor J. V., Kuro-o M. 2005. Suppression of aging in mice by the hormone Klotho. *Science*, 309, 5742: 1829–1833, <https://doi.org/10.1126/science.1112766>
- [17] Yamamoto M., Clark J. D., Pastor J. V., Gurnani P., Kuro-o M. 2005. Regulation of oxidative stress by the anti-aging hormone Klotho. *The Journal of Biological Chemistry*, 280, 45: 38029–38034, <https://doi.org/10.1074/jbc.M509039200>
- [18] Kuro-o M. 2009. Klotho and aging. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1790, 10: 1049–1058, <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2009.02.005>
- [19] Grabowska W., Sikora E., Bielak-Zmijewska A. 2017. Sirtuins, a promising target in slowing down the ageing process. *Biogerontology*, 18, 4: 447–476, <https://doi.org/10.1007/s10522-017-9685-9>
- [20] Mbah D., Tawah C. L., Guewo-Fokeng M. 2020. Genetic modification of animals: potential benefits and concerns. *Journal of the Cameroon Academy of Sciences*, 15, 3: 163–174, <https://doi.org/10.4314/jcas.v15i3.2>
- [21] Doudna J. A., Charpentier E. 2014. Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*, 346, 6213: 1258096, <https://doi.org/10.1126/science.1258096>
- [22] Caobi A., Dutta R. K., Garbinski L. D., Esteban-Lopez M., Andre M. 2020. The impact of CRISPR-Cas9 on age-related disorders: From pathology to therapy. *Aging and Disease*, 11, 4: 895–915, <https://doi.org/10.14336/AD.2019.0927>
- [23] He Q.-C., Wang Y., Tan Z., Zhang X., Jiang X. 2025. Mapping the therapeutic landscape of CRISPR-Cas9 for combating age-related diseases. *Frontiers in Genome Editing*, 7: 1558432, <https://doi.org/10.3389/fged.2025.1558432>
- [24] Latorre Barragán M. F., García Cárdenas F. R., Sánchez M. V. C. 2024. Stimulation of cellular longevity using CRISPR-Cas9 in aging-associated genes. *Interamerican Journal of Health Sciences*, 4: 98, <https://doi.org/10.59471/ijhsc202498>
- [25] Kantor A., McClements M., MacLaren R. 2020. CRISPR-Cas9 DNA base-editing and prime-editing. *International Journal of Molecular Sciences*, 21, 17: 6240, <https://doi.org/10.3390/ijms21176240>
- [26] Chen P. J., Liu D. R. 2022. Prime editing for precise and highly versatile genome manipulation. *Nature Reviews Genetics*, 24, 3: 161–177, <https://doi.org/10.1038/s41576-022-00541-1>
- [27] Borges G., Benslimane Y., Harrington L. 2024. A CRISPR base editing approach for the functional assessment of telomere biology disorder-related genes in human health and aging. *Biogerontology*, 25, 3: 361–378, <https://doi.org/10.1007/s10522-024-10094-x>
- [28] Kitaeva K., Solovyeva V., Blatt N., Rizvanov A. 2024. Eternal youth: A comprehensive exploration of gene, cellular, and pharmacological anti-aging strategies. *International Journal of Molecular Sciences*, 25, 1: 643, <https://doi.org/10.3390/ijms25010643>
- [29] De Jesus B. B., Vera E., Schneeberger K., Tejera Á., Blasco M. A. 2012. Telomerase gene therapy in adult and old mice delays aging and increases longevity without increasing cancer. *EMBO Molecular Medicine*, 4, 7: 691–704, <https://doi.org/10.1002/emmm.201200245>
- [30] Davidsohn N., Pezone M. J., Vernet A., Graveline A., Church G. 2019. A single combination gene therapy treats multiple age-related diseases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116, 47: 23505–23511, <https://doi.org/10.1073/pnas.1910073116>
- [31] Li R.-L., Kang S. 2024. Rewriting cellular fate: Epigenetic interventions in obesity and cellular programming. *Molecular Medicine*, 30, 1: 94, <https://doi.org/10.1186/s10020-024-00944-2>
- [32] Simpson D. J., Olova N. N., Chandra T. 2021. Cellular reprogramming and epigenetic rejuvenation. *Clinical Epigenetics*, 13, 1: 158, <https://doi.org/10.1186/s13148-021-01158-7>
- [33] Khalyavkin A. V., Yashin A. I. 2003. How the analysis of genetic mutations can help us to solve basic problems in gerontology? II. Life extending genetic modifications in budding yeast *S. cerevisiae*, fruit fly *D. melanogaster* and laboratory mice *M. musculus*. *Advances in Gerontology*, 12: 46–56.
- [34] Kaeberlein M. 2007. Longevity genomics across species. *Current Genomics*, 8, 1: 55–61, <https://doi.org/10.2174/138920207780368196>
- [35] Jazwinski S. M. 1998. Genetics of longevity. *Experimental Gerontology*, 33, 7–8: 773–783, [https://doi.org/10.1016/S0531-5565\(98\)00027-8](https://doi.org/10.1016/S0531-5565(98)00027-8)
- [36] Ogienko A. A., Omelina E. S., Bylino O. V., Batin M. A., Pindyurin A. V. 2022. Drosophila as a model organism to study basic mechanisms of longevity. *International Journal of Molecular Sciences*, 23, 19: 11244, <https://doi.org/10.3390/ijms231911244>
- [37] Pandey K. B. 2025. From bench to bedside: translational insights into aging research. *Frontiers in Aging*, 6: 1492099, <https://doi.org/10.3389/fragi.2025.1492099>
- [38] Baylis F. 2019. *Altered Inheritance: CRISPR and the ethics of human genome editing*. Cambridge, Harvard University Press.
- [39] Saliev T., Singh P. B. 2025. Age reprogramming: Innovations and ethical considerations for prolonged longevity (Review). *Biomedical Reports*, 22, 2: 96, <https://doi.org/10.3892/br.2025.1974>
- [40] Gacic J. M., Rascanin S. R., Jovanovic M. R., Nikolovski S. S. ... Rancic N. K. 2024. Comparison of knowledge about induced pluripotent stem cells in relation to gender among healthcare professionals and in the general population. *Cureus*, 16, 8: e66821, <https://doi.org/10.7759/cureus.66821>
- [41] Goering S. 2000. Gene therapies and the pursuit of a better human. *Cambridge Quarterly of Healthcare Ethics*, 9, 3: 330–341, <https://doi.org/10.1017/S0963180100903050>
- [42] Buchanan A. 1996. Choosing who will be disabled: Genetic intervention and the morality of inclusion. *Social Philosophy and Policy*, 13, 2: 18–46, <https://doi.org/10.1017/S0265052500003447>
- [43] Goya R. G., Lehmann M., Chiavellini P., Canatelli-Mallat M. ... Brown O. A. 2018. Rejuvenation by cell reprogramming: A new horizon in gerontology. *Stem Cell Research & Therapy*, 9, 1: 349, <https://doi.org/10.1186/s13287-018-1075-y>
- [44] Mkrtchyan G. V., Abdelmohsen K., Andreux P., Bagdonaite I. ... Scheibye-Knudsen M. 2020. ARDD 2020: from aging mechanisms to interventions. *Aging*, 12, 23: 24484–24503, <https://doi.org/10.18632/aging.202454>

Kako ADENOMIOZA posnema raka

Nadja Balažič¹

¹ Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije, Jamnikarjeva 101, 1000 Ljubljana

Ključne besede: adenomioza, rak, prehod epitelijske celice v mezenhim, proliferacija, apoptoza, angiogeneza

IZVLEČEK

Kontekst/Ozadje: Adenomioza je ginekološko obolenje, pri katerem se endometrij vrašča v miometrij oziroma v gladko mišično steno maternice. Tako nastali ektopičen endometrij, ki se nahaja zunaj svojega značilnega mesta, lahko povzroča močne menstrualne krvavitve, bolečine med menstruacijami, povečan volumen maternice in neplodnost. Čeprav je adenomioza benigna bolezen, kaže nekatere lastnosti, ki so značilne tudi za biologijo malignih tumorjev, vendar ta povezava do zdaj še ni bila sistematično preučena.

Namen članka: Namen prispevka je predstaviti molekularne in celične mehanizme, ki so skupni adenomiozi in malignim procesom, ter jih umestiti v kontekst značilnosti raka (*angl.* Hallmarks of Cancer). Izpostavljen je proces prehoda epitelijske celice v mezenhim (EMT), pri katerem pride do preureditve izražanja ključnih biooznačevalcev ter izgube apikalno-bazalne polarnosti, kar skupaj prispeva k povečani migraciji in invazivnosti endometrijskih celic. Poleg tega so ključni tudi povečana celična proliferacija, oslabljeni apoptotski mehanizmi, kronično vnetno mikrookolje, ki vzdržuje ugodne razmere za vse omenjene procese, in formacija novih krvnih žil (angiogeneza).

Zaključki: Adenomioza deli več ključnih celičnih in molekularnih mehanizmov z malignimi procesi, vendar gre kljub temu za benigno bolezen z ohranjenimi mehanizmi tkivne kontrole. Prepoznavanje teh podobnosti omogoča boljše razumevanje patogeneze adenomioze in odpira možnosti za prenos znanja iz onkologije v razvoj novih terapevtskih pristopov.

Uvod

Adenomioza je razmeroma slabo raziskana ginekološka bolezen, ki jo definira prisotnost ektopičnega endometrija, tj. endometrija, ki se nahaja na neustreznem mestu – v miometrij oziroma v gladkem mišičevju maternice. Endometrij, ki se nahaja na ustrezni lokaciji, pa se imenuje evtopičen endometrij. Značilni simptomi bolezni so dismenoreja ali bolečine ob menstruaciji, metroragija ali okrepljene menstrualne krvavitve, povečan volumen maternice, nemalokrat pa tudi neplodnost [1]. Bolezen je sorodna boljše poznani endometriozi, vendar se pri zadnji ektopično endometrijsko tkivo razvije zunaj maternice v trebušni votlini [2].

Zaradi slabe raziskanosti optimalnega načina zdravljenja adenomioze še ni poznanega. Najbolj se mu približa histerektomija oziroma kirurška odstranitev maternice, ki pa za veliko bolnic, ki želijo ohraniti zmožnost zanositve, ni primerna. Lajšanje simptomov in začasno nazadovanje sta mogoča tudi s pomočjo kombiniranih kontracepcijskih tablet, levonorgestrel-sproščajočimi intrauterinimi vsadki in agonisti gonadotropin-sproščujočega hormona [3].

Adenomioza je benigna bolezen, vendar v njeni patologiji

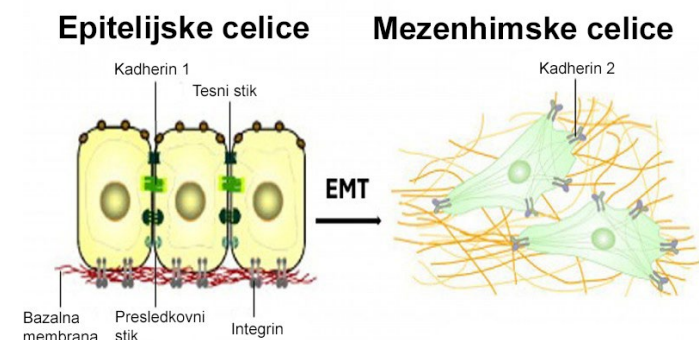
opazimo marsikatero lastnost in mehanizme, značilne za tumorsko obnašanje, ki jih je mogoče povezati s konceptom Hallmarks of Cancer, ki trenutno obsegajo 14 značilnosti [4]. V okviru te študije je bilo ugotovljeno, da je pri adenomiozi prisotnih 9 od 14 značilnosti: vzdrževanje proliferativnega signaliziranja, izogibanje zaviralcem rasti, spodbujanje angiogeneze ali dostop do žilja, izogibanje uničenju na strani imunskega sistema, pridobivanje fenotipske plastičnosti, epigenetsko reprogramiranje, ki ni povezano z mutacijami, upiranje celični smrti, aktivacija invazije in vnetje, ki spodbuja nastanek/napredovanje tumorjev.

Omenjene značilnosti raka v prispevku služijo kot okvir za primerjavo z adenomiozo. Nekatere skupne značilnosti so smiselno združene v sklope, vse pa so predstavljene na način, da izpostavljajo njihovo vlogo pri nastanku in napredovanju adenomioze. Tako so predstavljeni: epitelijsko-mezenhimski prehod, povečana proliferacija, izogibanje apoptozi, prekomerna angiogeneza in kronično vnetje.

Prehod epitelijskih celic v mezenhimske celice (proces EMT)

Prehod epitelijske celice v mezenhim (EMT; *angl.* epithelial-to-mesenchymal transition), prikazan na sliki 1, je proces, pri katerem epitelijske celice izgubijo svoje značilne lastnosti in prevzamejo mezenhimski fenotip. S tem pridobijo sposobnost migracije in invazije v okoliško tkivo [1]. V endometriju epitelijske celice obdajajo žleze in s tem tvorijo zaščitno plast, ki ohranja strukturo tkiva [5]. Med seboj so povezane s celičnimi stiki in so polarne, kar pomeni, da imajo apikalno in bazalno stran, kar je ključno za ohranjanje njihove normalne fiziološke funkcije. Mezenhimske celice so, nasprotno, gibljive in se prosto premikajo skozi zunajcelični matriks [1]. Enak proces sodeluje pri napredovanju številnih tipov raka [6], prisoten pa je tudi v vrsti fizioloških okoliščin: pri gastrulaciji, nastajanju nevralnega grebena in srčnih zaklopk ter pri celjenju ran [7].

Pri adenomiozi lahko EMT razdelimo na tri med seboj povezane mehanizme: spremembo izražanja značilnih biooznačevalcev, izgubo apikalno-bazalne polarnosti ter okrepljeno celično migracijo in invazijo. Pomemben spremljevalni proces je tudi povečana razgradnja ekstracelularnega matriksa, ki lezijam olajša pot.



Slika 1: Proces prehoda epitelijskih celic v mezenhimske celice. Povzeto po [8].

Menjava izražanja biooznačevalcev iz epitelijskih v mezenhimske

V evtopičnem endometriju adenomioze so prisotne nižane ravni izražanja kadherina 1 (CDH1), značilnega biooznačevalca epitelijskih celic, ki vzdržuje medcelične adhezije, s čimer preprečuje celično migracijo, ter povišano izražanje kadherina 2 (CDH2) in vimentina (VIM), biooznačevalca mezenhimskih celic. Kadherin 2 omogoča celične interakcije, ki spodbujajo kolektivno migracijo, vimentin pa povečuje migracijo in invazijo s pomočjo preoblikovanja citoskeleta in posledično spremembo oblike celice. Poleg tega se poviša tudi izražanje nekaterih transkripcijskih faktorjev, ki zavirajo izražanje kadherina 1 (SNAI1 (*angl.* snail family transcriptional repressor 1), SNAI2 (*angl.* snail family transcriptional repressor 2) ter

TWIST1 (*angl.* twist family bHLH transcription factor 1)) in PTK2 (*angl.* protein tyrosine kinase 2), za katero se domneva, da uravnava EMT. PTK2 omogoča prenos celičnih signalov iz integrinov in drugih površinskih receptorjev ter pomaga pri uravnavanju celične adhezije, migracije, preživetja in proliferacije [1]. V ektopičnem endometriju adenomioze v primerjavi z evtopičnim in zdravim endometrijem se povišano izraža še mezenhimski označevalec S100A4 (*angl.* S100 calcium binding protein A4) in znižano epitelijski označevalec, KRT7 (*angl.* keratin 7) [9].

Izguba celične apikalno-bazalne polarnosti

Značilna lastnost epitelijskih celic je njihova apikalno-bazalna polarnost, ki je tesno povezana z vzdrževanjem celičnih adhezijskih povezav. Pri procesu EMT pride do izgube polarnosti in s tem tudi razgradnje celičnih adhezij, kar celicam omogoča migracijo. Med ključnimi proteini, ki sodelujejo pri vzpostavljanju in vzdrževanju apikalno-bazalne polarnosti pri sesalcih, je tudi SCRIB (*angl.* scribble planar cell polarity protein). Pri adenomiozi je tako raven izražanja SCRIB znižana [10,11], povišano izražanje pa je prisotno pri HECW1 (*angl.* HECT, C2 and WW domain containing E3 ubiquitin protein ligase 1), ki pripomore pri razgradnji SCRIB, ter pri CYP19A1 (*angl.* cytochrome P450 family 19 subfamily A member 1), encimu, ki je ključen za sintezo estrogena [10].

Povečana celična migracija in invazivnost endometrija

Povečana migracijska in invazivna sposobnost endometrijskih celic omogoča prodiranje bazalnega endometrija v miometrij, kar je ena ključnih značilnosti adenomioze [12, 13]. K temu prispevajo spremembe v izražanju genov, povezanih s celično adhezijo in z organizacijo citoskeleta, kot sta povišano izražanje TLN1 (*angl.* talin 1) in znižano izražanje MIR145 (*angl.* microRNA 145), ki povečata migracijo in invazivnost endometrijskih epitelijskih celic [14], ter zvišano izražanje prepisa DDT (*angl.* D-dopachrome tautomerase), ki je povezan z regulacijo celične migracije [15].

K invazivnemu fenotipu adenomioznega endometrija prispeva povišano izražanje ANXA2 (*angl.* annexin A2), estrogensko odzivnega proteina, ki spodbuja epitelijsko-mezenhimski prehod in katerega raven pozitivno korelira z intenzivnostjo dismenoreje [16]. K povečani invazivnosti prispeva tudi povečano izražanje NOTCH1 (*angl.* notch receptor 1), ki uravnava transkripcijo genov, povezanih z epitelijsko-mezenhimskim prehodom, izražanje njegovega inhibitorja, NUMB (*angl.* NUMB endocytic adaptor protein), pa je znižano [17]. V stromi ektopičnega endometrija je znižano izražanje CAV1 (*angl.* caveolin 1), kar vodi v sproščanje kemokina CCL5 (*angl.* C-C motif chemokine ligand 5) in spodbuja invazivni potencial endometrijskih stromalnih celic [18].

Povečana razgradnja ekstracelularnega matriksa

Prehod epitelijskega v mezenhim spremljata razgradnja in preoblikovanje ekstracelularnega matriksa, ki endometrijskim celicam omogočata migracijo in invazijo v miometrijski stromi. Pri tem imajo pomembno vlogo matriks metalopeptidaze (MMP), encimi, odgovorni za razgradnjo komponent ekstracelularnega matriksa. Njihovo povišano izražanje je značilno za invazivne procese pri številnih tipih raka, fiziološko pa sodelujejo tudi pri implantaciji blastociste in invaziji trofoblasta [19]. Pri adenomiozi so bile ugotovljene povišane ravni proteinov MMP2 in MMP9 v endometriju [19] ter Mmp14 na modelu bolezni pri miših [20]. K preoblikovanju ekstracelularnega matriksa prispeva tudi povišano izražanje proteina CNN1 (*angl.* cellular communication network factor 1) v ektopičnem endometriju, ki sodeluje pri uravnavanju celične adhezije, migracije, proliferacije in angiogeneze [21].

Povečana proliferacija

Okrepljena proliferacija sodi med temeljne značilnosti adenomioze, saj omogoča rast in vzdrževanje ektopičnih endometrijskih lezij. V ektopičnem in ektopičnem endometriju je bila v primerjavi z zdravim tkivom ugotovljena izrazitejša proliferacija stromalnih celic, kar po izpostavitvi estradiolu potrjuje povišano izražanje proliferacijskih biopomerkov MKI67 (*angl.* marker of proliferation Ki-67) in PCNA (*angl.* proliferating cell nuclear antigen). Ob dodatku estradiola je ta rast lezij pospešil predvsem v soodvisnosti s povišanim izražanjem TLN1 [22]. Proliferacijsko aktivnost soustvarjajo tudi spremembe v signalni poti aktivina A. V ektopičnem endometriju je povečano izražanje *INHBA* (*angl.* inhibin subunit beta A), ki kodira podenoto aktivina A, ter *MSTN* (*angl.* myostatin). Povišano je izražanje *FST* (*angl.* follistatin), antagonist aktivina A in miostatina, ter receptorjev *ACVR2A* (*angl.* activin receptor type 2A) in *ACVR2B* (*angl.* activin receptor type 2B) [23]. Podobno v ektopičnem endometriju proliferativni fenotip potrjuje povišano izražanje *IGF1* (*angl.* insulin like growth factor 1), enega ključnih regulatorjev celične rasti. Odkrili so tudi značilno povezavo med izražanjem *IGF1* in *METTL3* (*angl.* methyltransferase 3, N6-adenosine-methyltransferase complex catalytic subunit). *METTL3* je regulator m6A-metilacije RNA, ki ima pomembno vlogo pri številnih fizioloških procesih, njegovo spremenjeno delovanje pa povezujejo tudi z invazivnimi boleznimi [15].

K proliferaciji endometrijskih epitelijskih celic prispeva še povečano izražanje lncRNA *LINC-ROR* (*angl.* long independently transcribed non-coding RNA, regulator of reprogramming), ki deluje prek signalne poti PI3K/AKT. Prekomerno izražanje *LINC-ROR* se zasleda tudi pri različnih vrstah raka [24].

Povečana proliferacija je povezana tudi z aktivacijo signalne poti TLR4. Ta spodbuja izražanje več mediatorjev, med drugim TGFB1 (*angl.* transforming growth factor beta 1), IL6 (*angl.* interleukin 6), VEGFA, EGF (*angl.* epidermal growth factor) in MMP2, ki poleg proliferacije sodelujejo tudi pri angiogenezi in invazivnosti adenomioznega endometrija [25].

Izogibanje apoptozi

Apoptoza ali programirana celična smrt vzdržuje celično ravnovesje in preprečuje kopičenje poškodovanih ali odvečnih celic. Kadar je ta proces oslabiljen, se podaljša preživetje ektopičnih endometrijskih celic, kar omogoča obstoj in vzdrževanje adenomioznih lezij. Zato oslabiljena apoptoza velja za enega izmed pomembnih mehanizmov v patogenezi adenomioze [26]. V stromalnih celicah ektopičnega endometrija je bila apoptoza v primerjavi z zdravim tkivom znižana tudi po izpostavitvi vodikovemu peroksidu, snovi, ki sicer apoptozo spodbuja s poškodbo celičnih struktur. Tak odziv bi lahko pomenil, da so celice pri adenomiozi do neke mere odporne na tovrstne apoptotske spodbude [26]. K tej odpornosti prispeva BCL2 (*angl.* apoptosis regulator Bcl-2), protein, ki zavira apoptotsko signalizacijo in pripomore k preživetju celic s pridobljeno rezistenco na apoptozo; njegovo izražanje je v ektopičnem endometriju povišano, utišanje gena pa apoptozo poveča in oslabi preživetje ter migracijsko sposobnost celic [27]. V ektopičnem tkivu je bilo izražanje BCL2 v primerjavi z ektopičnim endometrijem značilno znižano, pri čemer je pri zdravih vzorcih izraženost nihala skozi cikel in dosegla vrh v pozni sekretorni fazi, a v adenomioznem tkivu takšnih cikličnih sprememb niso zaznali, kar kaže na spremenjeno ciklično uravnavanje izražanja BCL2 [28].

Podobno vlogo ima os *miR-17/PTEN*; znižano izražanje tumor-zavirajočega PTEN (*angl.* phosphatase and tensin homolog) ob hkrati zvišanem *MIR17* (microRNA 17) v ektopičnem endometriju kaže, da bi miR-17 lahko zavirala apoptozo tako, da se veže na 3'UTR (*angl.* untranslated region) *PTEN* in tako zniža njegovo izražanje, s čimer posredno podpira preživetje celic in spremeni izražanje regulatorjev celičnega cikla [29]. Nižja apoptotska aktivnost je povezana tudi z znižanim izražanjem NDUFA13 (*angl.* NADH:ubiquinone oxidoreductase subunit A13), ki poleg svoje vloge v angiogenezi sodeluje tudi pri uravnavanju apoptoze; njegovo izražanje je znižano v ektopičnem in ektopičnem endometriju, kar bi lahko olajšalo infiltracijo žlezni struktur v miometrijski stromi [30]. K zmanjšani apoptotski aktivnosti lahko prispeva tudi povišano izražanje NTRK2 (*angl.* neurotrophic receptor tyrosine kinase 2), receptorja nevrotrofičnih dejavnikov, ki sodeluje pri razvoju odpornosti proti apoptozi [31].

Prekomerna angiogeneza

Angiogeneza oziroma nastanek novih krvnih žil je pomemben proces, ki zagotavlja oskrbo tkiv s kisikom in hranili ter omogoča rast in vzdrževanje tumorskega tkiva pa tudi ektopičnih endometrijskih lezij. Podobno kot pri številnih vrstah raka je tudi za adenomiozo značilna povečana angiogeneza, ki omogoča preživetje in napredovanje ektopičnega endometrija. V primerjavi z ektopičnim endometrijem sta za ektopični endometrijski značilni povečana vaskularizacija in mikrovaskularna gostota ter višje izražanje VEGFA (*angl.* vascular endothelial growth factor A), enega ključnih regulatorjev angiogeneze [32]. Povišane ravni še dveh angiogenih dejavnikov, VEGFB (*angl.* vascular endothelial growth factor B) in ANGPTL4 (*angl.* angiopoietin like 4), so bile odkrite v kultiviranih endometrijskih stromalnih celicah, tretiranih z estradiolom [22]. NDUFA13 (*angl.* NADH: ubiquinone oxidoreductase subunit A13) je zaviralec celične rasti, katerega izražanje je pri številnih vrstah raka znižano ali popolnoma odsotno. Njegovo izražanje je spremenjeno tudi pri adenomiozi, pri kateri z znižanim izražanjem v ektopičnem in še nižjem, ektopičnem endometriju vpliva na uravnavanje angiogeneze prek inhibicije transkripcije STAT3 (*angl.* signal transducer and activator of transcription 3) [30]. K povečani angiogenezi prispeva še zvišano izražanje glikoproteina F3 (*angl.* coagulation factor III, tissue factor), ugotovljena pa je bila tudi pozitivna korelacija med njegovim izražanjem in količino menstrualne krvi ter stopnjo bolečin med menstruacijami [33].

Konstantne vnetne razmere

Kronično vnetje pomembno prispeva k razvoju in napredovanju številnih bolezni. Pri raku je vztrajajoče vnetno mikrookolje eden ključnih dejavnikov tumorske rasti, angiogeneze in invazivnosti [34]. Podobne spremembe spremljajo tudi adenomiozo, pri kateri se po začetni poškodbi tkiva razvije dolgotrajen lokalni vnetni odziv, ki se ne razreši, ampak vztraja kot kronično vnetno mikrookolje [35]. Vnetje ne predstavlja le odziva na bolezen, ampak sodeluje pri vzdrževanju ektopičnih lezij in spodbuja procese, značilne tudi za maligne tumorje. V prizadetem adenomioznem tkivu se kopičijo različni podtipi limfocitov T: celice CD3+, CD4+, CD8+ in gamma-delta ($\gamma\delta$) celice T, zadnje z vlogo pri prepoznavanju antigenov in aktivaciji makrofagov. Ob tem naraste izražanje HLA-antigenov (HLA-ABC in HLA-DR), ki se vežejo na celice T, ter adhezijske molekule ICAM1 (*angl.* intercellular adhesion molecule 1); skupaj kažejo na lokalni imunski odziv, ki ostaja ves čas dejaven [36]. Podobno sliko potrjuje povečano število intraepitelijskih limfocitov T v proliferacijski fazi ektopičnega in ektopičnega endometrija, pri čemer je ektopično tkivo dodatno zaznamovano s

povečanim številom levkocitov CD43+ glede na ektopično [37]. Vnetno okolje ohranjajo tudi lezije, pri katerih sta poleg *IL1B* (*angl.* interleukin 1 beta) povišana še *CRH* (*angl.* corticotropin-releasing hormone) in *UCN* (*angl.* urocortin) – dejavnika, ki ju sicer poznamo predvsem po vlogi pri stresnem odzivu, tu pa najverjetneje delujeta lokalno, znotraj samega tkiva, in prispevata tudi k nevrogeni komponenti bolezni [38].

V adenomioznem endometriju je makrofagov več kot pri zdravih ženskah, k njihovem kopičenju pa pripomore kemokin CCL2 (*angl.* C-C motif chemokine ligand 2), ki jih privablja in aktivira. Večina jih v adenomioznem tkivu preide v reparativni fenotip M2, ob stiku z endometrijskimi celicami pa lahko sprožijo EMT [9].

Podobno vlogo igra encim PTGS2 (*angl.* prostaglandin-endoperoxide synthase 2), osrednji katalizator sinteze prostaglandinov. Medtem ko njegovo izražanje v zdravem endometriju niha skozi cikel in je najnižje v zgodnji proliferacijski fazi, v ektopičnem endometriju žensk z adenomiozo tovrstno nihanje izgine, izražanje pa ostane trajno povišano. Nastali prostaglandini povzročajo bolečino, spodbujajo angiogenezo in celično delitev, s čimer lezijam pripravijo tla za rast [39].

Zaključek

Adenomioza sodi med benigne ginekološke bolezni, vendar nekateri mehanizmi, ki sodelujejo pri njenem nastanku in napredovanju, v marsičem sovpadajo s procesi, dobro opisanimi pri malignih tumorjih. Endometrijske celice pridobijo sposobnost vraščanja v miometrijski stromi, se tam ohranijo in oblikujejo ektopične lezije, pri čemer sodelujejo: prehod epitelijskih celic v mezenhimske, povečana migracija in invazivnost, preoblikovanje zunajceličnega matriksa, okrepljena proliferacija, zavrtja apoptoza, povečana angiogeneza in kronično vnetje. Kljub podobnostim so pri adenomiozi ti procesi še vedno pod nadzorom tkivne kontrole; lezije se širijo lokalno, do širjenja v oddaljena tkiva ne pride, bolezen pa ne ogroža življenja bolnice. Primerjava adenomioze z rakom zato ni namenjena enačenju obeh bolezni. Pokaže predvsem to, da lahko benigna bolezen za svojo rast in obstoj uporablja presenetljivo podobne molekularne mehanizme kot maligni tumorji. Razumevanje teh skupnih mehanizmov predstavlja priložnost za prenos znanja za razvoj novih diagnostičnih in terapevtskih pristopov za zdravljenje adenomioze.

Diferencialno izražanje

TRANSPOZICIJSKIH ELEMENTOV

pri otrocih s covid-19 povezanimi vnetnimi boleznimi

Mojca Rob¹, Ana Markež¹, Barbara Jenko Bizjan¹, Tadej Avčin²

¹ Klinični inštitut za specialno laboratorijsko diagnostiko, Pediatrična klinika, Univerzitetni klinični center Ljubljana, 1000 Ljubljana

² Klinični oddelek za alergologijo, revmatologijo in klinično imunologijo, Pediatrična klinika, Univerzitetni klinični center Ljubljana, 1000 Ljubljana

Ključne besede: genetika, bioinformatika, transpozicijski elementi, sekvenciranje RNK, referenčni genom

IZVLEČEK

Transpozicijski elementi (TE) predstavljajo približno polovico človeškega genoma in lahko pomembno vplivajo na celične procese in vnetni odziv. Njihovo preučevanje s klasičnimi laboratorijskimi metodami je oteženo zaradi velike raznolikosti v številu kopij v genomu, lokusih in v zaporedjih samih. V raziskavi smo analizirali diferencialno izražanje pri otrocih s covid-19 povezanimi vnetnimi boleznimi v času aktivne bolezni in v remisiji (kontrola). Z orodjem TETranscripts smo izvedli analizo diferencialnega izražanja TE ob prileganju na 2 različna referenčna genoma – GRCh38 in T2T-CHM13. Zaznali smo 681 (GRCh38) oziroma 738 (T2T-CHM13) statistično značilno diferencialno izraženih TE. Ob upoštevanju strožjega kriterija ($|\log_2FC| \geq 2$) so bili v času aktivne bolezni izrazito povišani le 3 (GRCh38) oziroma 2 (T2T-CHM13) elementa. Povišano izražanje TE v času bolezni nakazuje na možno povezanost z vnetnimi procesi. Sklepamo, da so rezultati pri prvem popolnem človeškem genomu, T2T-CHM13, natančnejši, vzroke za razlike pa je potrebno še natančneje proučiti.

Uvod

Transpozicijski elementi (TE) so bili odkriti pred 70 leti in predstavljajo slabih 50 % človeškega genoma, njihova vloga pa nam je v veliki meri še vedno nepoznana. Vemo, da so pomembni pri imunskem odzivu na stresne dejavnike [1], vplivajo na dostopnost kromatina, izražanje genov, protivirusne aktivnosti, staranje, aktivirajo lahko tudi celičnega signaliziranja, sprožijo odzive preko RNK interference [2]. Določanje TE otežuje raznoliko število kopij posameznih TE v genomu ter variabilnost zaporedij in lokusov. Določanje je postalo bistveno lažje z razvojem bioinformatijskih orodij. Ključno prelomnico predstavlja referenčni genom od telomere do telomere T2T-CHM13 (*angl.* Telomere-to-Telomere CHM13), ki kot prvi zajema celotno sekvenco človeškega genoma [3]. Druga najbolj natančna sekvenca človeškega genoma je genom GRCh38, človeški genom pripravljen v okviru Konzorcija za referenčni genom 38 (*angl.* Genome Reference Consortium Human Build 38) [4]. V članku smo se osredotočili na izražanje TE pri bolnikih s covid-19 povezanimi inflamatornimi boleznimi. Za-

nimalo nas je, ali se TE pri bolnikih z boleznimi povezanimi s covid-19 v aktivnem času bolezni izražajo pogostejše kot v remisiji. Zanimalo nas je tudi, ali se zaznani izraženi TE med referenčnima genomoma T2T-CHM13 in GRCh38 razlikujejo. Pričakovali smo povečano izražanje TE v aktivnem času bolezni in razlike v izražanju med obema referenčnima genomoma, pri čemer smo pri genomu T2T-CHM13 pričakovali kakovostnejše rezultate. V nadaljevanju bomo prikazali analizo podatkov otrok in mladostnikov s covid-19 povezanimi inflamatornimi boleznimi prileganih na referenčna genoma T2T-CHM13 in GRCh38.

Pregled objav

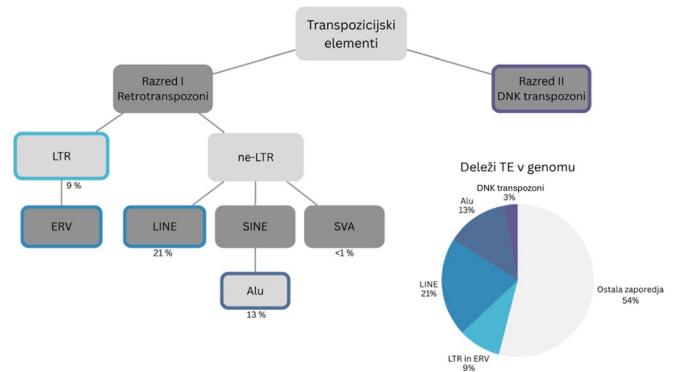
Transpozicijski elementi

TE uvrščamo med insercijske mutagene. Glede na njihov mehanizem transpozicije jih razdelimo na 2 osnovna razreda: razred I (retrotranspozoni) in razred II (DNK-transpozoni). Za TE razreda I je značilno, da se morajo pred ponovno vključitvijo najprej prepisati iz genomske DNK v RNK-intermediat, nato pa se s povratnim prepisovanjem v ob-

- [1] Zheng D., Duan H., Wang S., Xu Q. ... Dong Q. 2018. FAK regulates epithelial-mesenchymal transition in adenomyosis. *Molecular Medicine Reports*, 18, 6: 5461, <https://doi.org/10.3892/MMR.2018.9600>
- [2] Sadlocha M., Toczek J., Major K., Staniczek J., Stojko R. 2024. Endometriosis: molecular pathophysiology and recent treatment strategies—Comprehensive literature review. *Pharmaceuticals*, 17, 7: 827, <https://doi.org/10.3390/PH17070827>
- [3] Sharara F. I., Kheil M. H., Feki A., Rahman S. ... Moawad G. N. 2021. Current and prospective treatment of adenomyosis. *Journal of Clinical Medicine* 2021, Vol. 10, Page 3410, 10, 15: 3410, <https://doi.org/10.3390/JCM10153410>
- [4] Hanahan D. 2022. Hallmarks of cancer: New dimensions. *Cancer Discovery*, 12: 31–46, <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1059>
- [5] Critchley H. O. D., Maybin J. A., Armstrong G. M., Williams A. R. W. 2020. Physiology of the endometrium and regulation of menstruation. *Physiological reviews*, 100, 3: 1149–1179, <https://doi.org/10.1152/PHYSREV.00031.2019>
- [6] Brabletz S., Schuhwerk H., Brabletz T., Stemmler M. P. 2021. Dynamic EMT: a multi-tool for tumor progression. *The EMBO journal*, 40, 18, <https://doi.org/10.15252/EMBJ.2021108647>
- [7] Nieto M. A., Huang R. Y. Y. J., Jackson R. A. A., Thiery J. P. P. 2016. EMT: 2016. *Cell*, 166, 1: 21–45, <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2016.06.028>
- [8] Ghafoor S., Garcia E., Jay D. J., Persad S. 2025. Molecular mechanisms regulating epithelial mesenchymal transition (EMT) to promote cancer progression. *International Journal of Molecular Sciences* 2025, Vol. 26, Page 4364, 26, 9: 4364, <https://doi.org/10.3390/IJMS26094364>
- [9] An M., Li D., Yuan M., Li Q., Zhang L., Wang G. 2017. Interaction of macrophages and endometrial cells induces epithelial–mesenchymal transition-like processes in adenomyosis. *Biology of Reproduction*, 96, 1: 46–57, <https://doi.org/10.1095/BIOLREPROD.116.144071>
- [10] Wu X., Zuo W., Liu H., Wang Z., Xu C. 2019. Decreased expression of cell polarity protein Scribble correlated with altered subcellular localization of the Crumbs homologue 3 protein in human adenomyotic endometrial cells. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*, 45, 6: 1148–1159, <https://doi.org/10.1111/JOG.13952>
- [11] Jin Z., Liu H., Xu C. 2020. Estrogen degrades Scribble in endometrial epithelial cells through E3 ubiquitin ligase HECW1 in the development of diffuse adenomyosis. *Biology of Reproduction*, 102, 2: 376–387, <https://doi.org/10.1093/BIOLRE/IOZ194>
- [12] Zhou W., Peng Z., Zhang C., Liu S., Zhang Y. 2018. ILK-induced epithelial-mesenchymal transition promotes the invasive phenotype in adenomyosis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 497, 4: 950–956, <https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2018.01.184>
- [13] Ibrahim M. G., Chiantera V., Frangini S., Younes S. ... Mechsner S. 2015. Ultramicro-trauma in the endometrial-myometrial junctional zone and pale cell migration in adenomyosis. *Fertility and Sterility*, 104, 6: 1475-1483.e3, <https://doi.org/10.1016/J.FERTNSTERT.2015.09.002>
- [14] Wang Y., Duan H., Wang S., Quan Y. ... Guo Z. 2021. Talin1 induces epithelial-mesenchymal transition to facilitate endometrial cell migration and invasion in adenomyosis under the regulation of microRNA-145-5p. *Reproductive Sciences*, 28, 5: 1523–1539, <https://doi.org/10.1007/s43032-020-00444-8>
- [15] Zhai J., Li S., Sen S., Opoku-Anane J. ... Giudice L. C. 2020. m6A RNA methylation regulators contribute to eutopic endometrium and myometrium dysfunction in adenomyosis. *Frontiers in Genetics*, 11: 716, <https://doi.org/10.3389/FGENE.2020.00716/FULL>
- [16] Zhou S., Yi T., Liu R., Bian C. ... Wei Y. 2012. Proteomics identification of annexin A2 as a key mediator in the metastasis and proangiogenesis of endometrial cells in human adenomyosis. *Molecular & Cellular Proteomics* : MCP, 11, 7: M112.017988-M112.017988, <https://doi.org/10.1074/MCP.M112.017988>
- [17] Qi S., Zhao X., Li M., Zhang X. ... Zhang N. 2015. Aberrant expression of Notch1/numb/snail signaling, an epithelial mesenchymal transition related pathway, in adenomyosis. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 13, 1: 1–10, <https://doi.org/10.1186/S12958-015-0084-2/FIGURES/7>
- [18] Zhao L., Zhou S., Zou L., Zhao X. 2013. The expression and functionality of stromal caveolin 1 in human adenomyosis. *Human Reproduction*, 28, 5: 1324–1338, <https://doi.org/10.1093/HUMREP/DET042>
- [19] Li T., Li Y. G., Pu D. M. 2006. Matrix metalloproteinase-2 and -9 expression correlated with angiogenesis in human adenomyosis. *Gynecologic and obstetric investigation*, 62, 4: 229–235, <https://doi.org/10.1159/000094426>
- [20] Matsuda M., Sasabe H., Adachi Y., Suzuki T., Mori T. 2001. Increased invasion activity of endometrial stromal cells and elevated expression of matrix metalloproteinase messenger RNA in the uterine tissues of mice with experimentally induced adenomyosis. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 185, 6: 1374–1380, <https://doi.org/10.1067/MOB.2001.117967>
- [21] Zhang D., Xia W., Tong T., Li C. ... Zhang J. 2016. Correlation between Cyr61 expression and clinicopathologic parameters in adenomyosis. *Journal of Reproductive Immunology*, 118: 42–49, <https://doi.org/10.1016/J.JRI.2016.08.004>
- [22] Wang Y., Duan H., Wang S., Quan Y. ... Guo Z. 2021b. Upregulated Talin1 synergistically boosts β -estradiol-induced proliferation and pro-angiogenesis of eutopic and ectopic endometrial stromal cells in adenomyosis. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 19, 1: 1–15, <https://doi.org/10.1186/S12958-021-00756-7/FIGURES/6>
- [23] Carrarelli P., Yen C. F., Arcuri F., Fungghi L. ... Petraglia F. 2015. Myostatin, follistatin and activin type II receptors are highly expressed in adenomyosis. *Fertility and Sterility*, 104, 3: 744-752.e1, <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2015.05.032>
- [24] Xu X. Y., Zhang J., Qi Y. H., Kong M. ... Hu J. J. 2018. Linc-ROR promotes endometrial cell proliferation by activating the PI3K-Akt pathway. *European review for medical and pharmacological sciences*, 22, 8: 2218–2225, https://doi.org/10.26355/EURREV_201804_14807
- [25] Guo J., Chen L., Luo N., Li C. ... Cheng Z. 2016. LPS/TLR4-mediated stromal cells acquire an invasive phenotype and are implicated in the pathogenesis of adenomyosis. *Scientific Reports* 2016 6:1, 6, 1: 1–10, <https://doi.org/10.1038/srep21416>
- [26] Yang J. H., Wu M. Y., Chen C. D., Chen M. J. ... Ho H. N. 2007. Altered apoptosis and proliferation in endometrial stromal cells of women with adenomyosis. *Human Reproduction*, 22, 4: 945–952, <https://doi.org/10.1093/HUMREP/DEL493>
- [27] Li J., Yanyan M., Mu L., Chen X., Zheng W. 2019b. The expression of Bcl-2 in adenomyosis and its effect on proliferation, migration, and apoptosis of endometrial stromal cells. *Pathology - Research and Practice*, 215, 8: 152477, <https://doi.org/10.1016/J.PRP.2019.152477>
- [28] Jones R. K., Searle R. F., Bulmer J. N. 1998. Apoptosis and bcl-2 expression in normal human endometrium, endometriosis and adenomyosis. *Human Reproduction*, 13, 12: 3496–3502, <https://doi.org/10.1093/HUMREP/13.12.3496>
- [29] Hu H., Li H., He Y. 2017. MicroRNA-17 downregulates expression of the PTEN gene to promote the occurrence and development of adenomyosis. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 14, 4: 3805, <https://doi.org/10.3892/ETM.2017.5013>
- [30] Wang J., Deng X., Yang Y., Yang X. ... Chao L. 2016. Expression of GRIM-19 in adenomyosis and its possible role in pathogenesis. *Fertility and Sterility*, 105, 4: 1093–1101, <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2015.12.019>
- [31] Huang Y., Zheng W., Mu L., Ren Y. ... Liu F. 2011. Expression of tyrosine kinase receptor B in eutopic endometrium of women with adenomyosis. *Archives of gynecology and obstetrics*, 283, 4: 775–780, <https://doi.org/10.1007/S00404-010-1718-4>
- [32] Huang T. S., Chen Y. J., Chou T. Y., Chen C. Y. ... Yang M. H. 2014. Oestrogen-induced angiogenesis promotes adenomyosis by activating the Slug-VEGF axis in endometrial epithelial cells. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 18, 7: 1358, <https://doi.org/10.1111/JCMM.12300>
- [33] Liu X., Nie J., Guo S. W. 2011. Elevated immunoreactivity to tissue factor and its association with dysmenorrhea severity and the amount of menses in adenomyosis. *Human Reproduction*, 26, 2: 337–345, <https://doi.org/10.1093/HUMREP/DEQ311>
- [34] Grivennikov S. I., Greten F. R., Karin M. 2010. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell*, 140, 6: 883, <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2010.01.025>
- [35] Li C., Chen R., Jiang C., Chen L., Cheng Z. 2019a. Correlation of LOX-5 and COX-2 expression with inflammatory pathology and clinical features of adenomyosis. *Molecular medicine reports*, 19, 1: 727–733, <https://doi.org/10.3892/MMR.2018.9618>
- [36] Ota H., Igarashi S., Tanaka T. 1996. Expression of γ delta T cells and adhesion molecules in endometriotic tissue in patients with endometriosis and adenomyosis. *American Journal of Reproductive Immunology*, 35, 5: 477–482, <https://doi.org/10.1111/J.1600-0897.1996.TB00128.X>
- [37] Bulmer J. N., Jones R. K., Searle R. F. 1998. Intraepithelial leukocytes in endometriosis and adenomyosis: comparison of eutopic and ectopic endometrium with normal endometrium. *Human reproduction (Oxford, England)*, 13, 10: 2910–2915, <https://doi.org/10.1093/HUMREP/13.10.2910>
- [38] Carrarelli P., Yen C. F., Fungghi L., Arcuri F. ... Petraglia F. 2017. Expression of inflammatory and neurogenic mediators in adenomyosis. *Reproductive Sciences*, 24, 3: 369–375, <https://doi.org/10.1177/1933719116657192/METRICS>
- [39] Ota H., Igarashi S., Sasaki M., Tanaka T. 2001. Distribution of cyclooxygenase-2 in eutopic and ectopic endometrium in endometriosis and adenomyosis. *Human reproduction (Oxford, England)*, 16, 3: 561–566, <https://doi.org/10.1093/HUMREP/16.3.561>

liki DNK vgradijo na novo mesto v genomu. Takšen način premikanja imenujemo mehanizem »kopiraj in prilepi«. Nasprotno pa se DNK-transpozoni premikajo po mehanizmu »izreži in prilepi«, saj se neposredno izrežejo iz prvotnega mesta na DNK ter vstavijo na drugo lokacijo v genomu [2].

TE razreda I delimo na dve skupini: transpozoni z dolgimi končnimi ponovitvami (LTR, *angl.* long terminal repeat) ter ne-LTR retrotranspozoni. LTR-transpozoni predstavljajo ostanke starodavnih integracij zaporedij v genom in vključujejo tudi endogene retrovire (ERV). K ne-LTR retrotranspozonom pa prištevamo dolge razpršene elemente (LINE, *angl.* long interspersed element), kratke razpršene jedrne elemente (SINE, *angl.* short interspersed nuclear element) ter elemente SVA. Med SINE uvrščamo elemente Alu, ki so specifični za človeka. SVA so elementi, ki vsebujejo variabilno število tandemskih ponovitev (VNTR, *angl.* variable number tandem repeat) in izkazujejo strukturno podobnost z elementi Alu [5].



Slika 1: Delitev transpozicijskih elementov in njihov delež v genomu (Povzeto po [5]). Retrotranspozone delimo na transpozone z dolgimi končnimi ponovitvami (LTR, *angl.* long terminal repeat), med katere sodijo tudi endogeni retrovirusi (ERV). Med ne-LTR transpozone sodijo dolgi razpršeni elementi (LINE, *angl.* long interspersed element), kratki razpršeni jedrni elementi (SINE, *angl.* short interspersed nuclear element) in elementi SVA. Pod SINE sodijo tudi elementi Alu. Največji del v človeškem genomu predstavljajo LINE elementi (21 % celotnega genoma), sledijo Alu elementi, LTR in ERV transpozoni ter DNK transpozoni.

Bioinformacijska analiza TE

Za preučevanje izražanja TE se pogosto uporablja analiza diferencialnega izražanja (DEA – *angl.* differential expression analysis), ki kvantificira in primerja razlike v izražanju dveh ali več različnih stanj. Podatke pridobljene z DEA opišemo z dvojiškim logaritmom faktorja spremembe ($\log_2FC$, *angl.* $\log_2$ fold change) in p-vrednostjo, ki ponazarja statistično značilnost. $\log_2FC$ opisuje kolikokrat in v katero smer se je izražanje elementa spremenilo. Pozitivna vrednost pomeni, da je izražanje v primerjavi s kontrolnim višje v testnem stanju. Pri negativni vrednosti velja obratno [6].

Prisotnost več enakih kopij posameznega TE v genomu močno otežuje natančno določitev njihovega mesta izvora. Poleg tega je pri analizi ključna raven natančnosti določevanja: nekatera bioinformacijska orodja namreč opredeljujejo TE le do ravni družine, medtem ko druga omogočajo identifikacijo do posameznega lokusa. Določanje na ravni družine zajame širše, globalne spremembe, medtem ko lokusno specifična analiza ponuja natančnejši vpogled v TE na točno določenih lokusih, kar pa je tehnično zahtevnejše [2].

Referenčna genoma T2T-CHM13 in GRCh38

Vsi človeški referenčni genomi do vključno genoma GRCh38 so bili sekvencirani s tehniko klon po klon, ki vključuje bakterijske umetne kromosome (BAC, *angl.* bacterial artificial chromosome) dolge največ 150 kb. Kratke odčitke so nato v pravo zaporedje razvrstili ročno glede na genetski ali fizični načrt genoma [7]. Genom GRCh38 je sekvenciral konzorcij Genome Reference Consortium [3]. Na drugačen način je konzorcij T2T v projektu CHM13 ustvaril referenčni genom T2T-CHM13. Uporabil je kombinacijo sekvenciranja HiFi (sekvenciranje visoke natančnosti, *angl.* high fidelity) in tehnologijo ultra dolgih odčitkov Oxford Nanopore. Sekvenciranje HiFi je razvilo podjetje Pacific Biosciences oz. PacBio, z njim pa lahko iste molekule odčitamo večkrat. Odčitki so lahko dolgi 10-20 kb, sekvencirani pa so z več kot 99,5 % natančnostjo. Tehnologija Oxford Nanopore omogoča sekvenciranje molekul, ki so dolge tudi več milijonov baznih parov, natančnost odčitkov pa znaša 95 %. S kombinacijo obeh tehnik in drugih naprednih tehnologij je močan računalniški algoritem sestavil celoten človeški genom brez vrzeli [7]. Za razliko od GRCh38, ki je nastal iz DNK molekul več heterozigotnih posameznikov, je bilo zaporedje genoma T2T-CHM13 sekvencirano iz homozigotne celične linije 1 posameznika, kar dodatno pripomore k njegovi visoki natančnosti [4]. Razlike v zaporedjih obeh genomov izhajajo predvsem iz manjkajočih predelov na genomu GRCh38. Gre za 200 megabaznih parov oz. 8 %, ki predstavljajo dele genoma bogate s ponovitvami, zaradi česar je njihovo sekvenciranje oteženo [4].

Materiali in metode

Analizirali smo podatke 26 bolnikov iz 52 vzorcev polne venske krvi otrok in mladostnikov do 18. leta starosti s covid-19 povezanimi inflamatornimi boleznimi. Vzorci so bili pridobljeni na Pediatrični kliniki Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana (PEK, UKC) in sekvencirani s sekvenciranjem RNK. Vsak pacient je sam sebi služil kot kontrolni vzorec, saj smo vzorce odvzeli pred zdravljenjem, v aktivnem času bolezni in 6 mesecev po prvi predstavitvi bolezni torej v remisiji. Sekvenciranje je bilo izvedeno s se-

kvenatorjem NovaSeq6000 (Illumina) s kartušo S2. Podatke sekvenciranja RNK smo na referenčna genoma GRCh38 in T2T-CHM13 poravnali z orodjem STAR [8]. Ta zaporedja so predstavljala izhodiščne datoteke za analizo v okviru raziskave.

DEA smo izvedli z orodjem TETranscripts [9], ki uporablja R paket DeSeq2 [10]. Orodje analizo izvaja na ravni družine TE, upošteva pa tudi parnost vzorcev bolnikov istega bolnika v aktivni bolezni in remisiji. Zaradi večkratnega testiranja smo p-vrednosti popravili po metodi Benjamini-Hochberg. Izražanje TE je bilo opredeljeno kot statistično značilno, kadar je njegova p-vrednost znašala manj kot 0,05. Iz rezultatov analize smo izločili zaporedja genov in satelitov, saj smo se osredotočali zgolj na TE. DEA in njene rezultate smo analizirali v programskem jeziku R [11].

Rezultati

Analiza je na referenčnem genomu GRCh38 pokazala 681, na T2T-CHM13 pa 738 statistično značilno diferencialno izraženih TE. Vsi elementi z $|\log_2FC| \geq 1$ so imeli pozitivne predznake, kar pomeni, da so se v primerjavi z remisijo močneje izražali v bolezenskem stanju. Število statistično značilno izraženih TE na posameznem genomu in obeh genomih hkrati je prikazano v preglednici 1, rezultati so prikazani pri različnih $\log_2FC$.

Preglednica 1: Število statistično značilno izraženih transpozicijskih elementov na referenčnih genomih GRCh38, človeški genom pripravljenem v okviru Konzorcija za referenčni genom 38 (*angl.* Genome Reference Consortium Human Build 38), in referenčnem genomu od telomere do telomere, T2T-CHM13 (*angl.* Telomere-to-Telomere CHM13) ter obeh genomih skupaj pri različnih $\log_2FC$ (dvojiških logaritmih faktorja spremembe, *angl.* $\log_2$ Fold Change).

	GRCh38	T2T-CHM13	SKUPNO
$\log_2FC \geq 1$	15	18	8
$\log_2FC \geq 1,5$	5	4	1
$\log_2FC \geq 2$	3	2	2

Vrednosti $\log_2FC \geq 2$ sta na obeh referenčnih genomih hkrati dosegla le 2 elementa: LTR108e_Mam:ERV1:LTR in LTR61:ERV1:LTR. Element MamRTE1:RTE-BovB:LINE je to mero izražanja dosegel izključno ob uporabi genoma GRCh38, medtem ko ga na T2T-CHM13 nismo zaznali.

Preglednica 2 navaja TE, ki so se v aktivnem času bolezni statistično značilno izražali več kot 2,83-krat bolj ($\log_2FC \geq 1,5$). Temu merilu na obeh genomih hkrati ustrežajo 3 elementi: že omenjeni najbolj izraženi skupni TE ter UCON61:UCON61:Neznan. Poleg teh smo na GRCh38 določili še 5, na T2T-CHM13 pa 3 dodatne TE.

Preglednica 2: Statistično značilno izraženi transpozicijski elementi z vrednostjo $\log_2FC \geq 1,5$ ($\log_2FC$ – dvojiški logaritem faktorja spremembe, *angl.* $\log_2$ Fold Change). Uporabljena referenčna genoma sta bila: GRCh38, človeški genom pripravljen v okviru Konzorcija za referenčni genom 38 (*angl.* Genome Reference Consortium Human Build 38), in referenčni genom od telomere do telomere, T2T-CHM13 (*angl.* Telomere-to-Telomere CHM13). Razredi oz. podrazredi odkritih transpozicijskih elementov so bili: LTR transpozoni (dolga končna ponovitve, *angl.* Long Terminal Repeat), DNK transpozoni in LINE (dolgi razpršeni element, *angl.* Long Interspersed Element). Zraven enega elementa je napisan vprašaj, saj o njem nimamo zadosti informacij, da bi ga z gotovostjo klasificirali v dani razred.

Razred/ Podrazred	Družina	Transkript	Referenca	$\log_2FC$
Neznan	UCON61	UCON61	Skupni TE	1,5
LTR	ERV1	LTR61	Skupni TE	2
LTR	ERVL	LTR108eMam	Skupni TE	2
DNK	hAT	UCON80	GRCh38	1,5
DNK?	DNK	UCON21	GRCh38	1,5
LTR	ERV1	MER66-int	GRCh38	1,5
LTR	ERVK	LTR5	GRCh38	1,5
LINE	RTE-BovB	MamRTE1	GRCh38	2
DNK	DNK	UCON21	T2T-CHM13	1,5
DNK	hAT-Blackjack	UCON80	T2T-CHM13	1,5
LTR	ERV1	LTR27D	T2T-CHM13	1,5

Grafični prikaz rezultatov po posameznem genomu je prikazan na vulkanskih diagramih (Slika 2 in Slika 3), ki potrjujeta, da je imela večina TE pozitiven predznak oziroma višje izražanje v vnetnem stanju. Imena TE sledijo standardnemu zapisu uporabljenega orodja – ime transkripta, družina ter razred oziroma podrazred so ločeni z dvopičji. Pri nekaterih imenih se pojavi tudi vprašaj, ki ponazarja, da o določenih TE ni dovolj podatkov, da bi jih z gotovostjo klasificirali v dani razred oz. podrazred [12, 13].

Občasno se pri transkripciji DNK prepiseta obe verigi, kar vodi do nastanka dvoverižne RNK (dsRNK). Ta lahko povzroči utišanje genov preko mehanizma RNK-interference ali pa sproži imunski odziv – predvsem interferonskega – saj jo celica prepozna kot potencialni znak virusne okužbe. Za njeno določanje in kvantifikacijo se uporablja specifična metoda, znana kot dvoverižno sekvenciranje RNK, pri kateri se enoverižna RNK predhodno odstrani, preostala dsRNK pa se sekvencira in bioinformacijsko analizira [2]. Pomembno vlogo pri regulaciji TE imajo tudi majhne RNK (sRNK), kamor uvrščamo mikro RNK (miRNK), majhne interferenčne RNK (siRNK) in RNK, ki interagirajo s proteini PIWI (piRNK). Te molekule nadzorujejo prepise TE zlasti v zarodnih celicah ter ob izpostavljenosti stresnim dejavnikom. Ker njihovo vrednotenje z orodjem Tetranscripts in sorodnimi programi ni izvedljivo, je za ta namen potrebna uporaba prilagojene metode sekvenciranja RNK [2].

Pri preučevanju izražanja TE z metodo sekvenciranja RNK le majhen delež odčitkov izvira neposredno iz samostojnih transkriptov TE. Znatno pogosteje so ti rezultat kotranskripcije z geni (kjer se TE prepíše kot del gena), so locirani znotraj intronov ali pa nastanejo v okviru splošne transkripcije, pri kateri se sočasno prepíšejo obsežnejši kosi genoma. Če se želimo osredotočiti izključno na avtonomno izražanje TE, je treba genske transkripte iz podatkov sekvenciranja ustrezno odstraniti. To predstavlja precejšen izziv zaradi kratkih odčitkov in ponavljajoče se narave TE. Za uspešno čiščenje podatkov je zato nujna uporaba namensko razvitih orodij [2] ali prilagoditev obstoječih; Chung in sodelavci so na primer modificirali orodje Tetranscripts ter s tem uspešno zmanjšali delež intronskih prepisov v končnih rezultatih [22].

Čeprav orodje Tetranscripts omogoča določitev ravni izražanja TE, ne ponuja neposredne biološke interpretacije rezultatov. Za poglobitev ugotovitev in nadaljevanje raziskave bi bilo smiselno izvesti dopolnilne analize. Zgled za to predstavlja študija, ki so jo izvedli Macchietto in sodelavci; ti so po primarni analizi s Tetranscripts proučili prekrivanje lokacij TE z geni ter z uporabo paketa rGREAT v programu R ovrednotili njihovo povezanost s specifičnimi biološkimi funkcijami [14].

Natančnost rezultatov bi lahko izboljšali tudi s prilagoditvijo parametrov orodja STAR. Pri njegovi uporabi je namreč mogoče določiti največje dovoljeno število lokacij za večkratno mapiranje odčitka, pri čemer privzeta vrednost parametra --outFilterMultimapMax znaša 10. Če se posamezen odčitek poravna na več kot 10 lokusov, ga orodje avtomatsko zavrže [8]. Z zvišanjem te meje bi zajeli tudi TE z višjo stopnjo ponovljivosti, kar bi vplivalo na končne rezultate, pri čemer bi bil učinek izrazitejši ob uporabi referenčnega genoma GRCh38.

Za doseganje večje biološke relevantnosti bi lahko analizo dodatno zožili – na primer z vključitvijo zgolj tistih bolnikov, ki imajo eno specifično vnetno obolenje, povezano s covid-19. Vendar pa so za cilje naše raziskave, ki temelji na vrednotenju delovanja orodja in splošni analizi TE, zadoščali širše zastavljeni kriteriji. Za vzorec smo tako izbrali omejeno skupino pacientov s skupnim vzrokom in podobnim potekom bolezni. Da je bila ta skupina kljub vsemu dovolj homogena sestavljena, potrjujejo tudi naši rezultati, saj smo odkrili statistično značilne razlike v izražanju TE. Ker klasično sekvenciranje RNK poda zgolj povprečne vrednosti izražanja genov, z njim ne moremo zaznati specifičnih razlik v izražanju med posameznimi celičnimi tipi znotraj tkiva. Posledično se v raziskavah vse pogosteje uveljavljajo tehnike sekvenciranja posameznih celic (*angl.* single-cell sequencing) [23].

Zaključek

Stresne okoliščine opazno vplivajo na izražanje TE. Na primeru otrok s covid-19 povezanimi vnetnimi boleznimi smo potrdili, da so te spremembe v aktivnem času obolenja statistično značilne. Ob uporabi referenčnega genoma T2T-CHM13 sta se 2 elementa izražala več kot 4-krat močneje, medtem ko so bili na GRCh38 taki elementi 3. Referenca T2T-CHM13 je razkrila večje število diferencialno izraženih TE. Vsi TE, ki so dosegli vsaj 2-kratno spremembo izražanja, so imeli povišane ravni v aktivnem času bolezni, kar nakazuje na oslABLjeno utišanje izražanja TE med aktivno boleznijo. S tem smo potrdili, da se TE v aktivnem času bolezni v primerjavi z remisijo izražajo močneje. Primerjalna analiza referenčnih genomov je potrdila, da se rezultati med obema referenčnima genomoma razlikujejo. Sklepamo, da razlike izvirajo predvsem iz doslej manjkajočih sekvenc na GRCh38 ter prisotnosti neuvrščenih zaporedij, popravkov, alternativnih kontigov in nevtralizacijskih sekvenc na tem genomu. Za dokončno potrditev teh ugotovitev bi bile potrebne dodatne raziskave.

Razlike v izražanju TE smo določili z orodjem Tetranscripts, ki je podalo vpogled v splošne transkripcijske trende pri preiskovancih s covid-19 povezanimi boleznimi. V prihodnje bi natančnost rezultatov lahko izboljšali z zožitvijo raziskovalnega vzorca na bolj homogeno skupino pacientov ali z uporabo naprednejših metodologij, kot sta sekvenciranje RNK posameznih celic in analiza sRNK. Pri nadaljnji obdelavi obstoječih podatkov bi bilo ključno optimizirati nastavitve parametrov orodja STAR ter uporabiti orodja, ki TE določajo na ravni lokusov.

Naši izsledki tako potrjujejo obetaven napredek metod za določanje TE in dokazujejo, da se v teh kompleksnih genomskih regijah skriva še veliko neizkoriščenega potenciala za razumevanje patogeneze vnetnih bolezni.

- [1] Colonna Romano N., Fanti L. 2022. Transposable elements: Major players in shaping genomic and evolutionary patterns. *Cells*, 11, 6: 1048, <https://doi.org/10.3390/cells11061048>
- [2] Lanciano S., Cristofari G. 2020. Measuring and interpreting transposable element expression. *Nature Reviews Genetics*, 21, 12: 721–736, <https://doi.org/10.1038/s41576-020-0251-y>
- [3] Nurk S., Koren S., Rhie A., Rautiainen M. ..., Phillippy A. M. 2022. The complete sequence of a human genome. *Science*, 376, 6588: 44–53, <https://doi.org/10.1126/science.abj6987>
- [4] Lovell J. T., Grimwood J. 2022. The first complete human genome. *Nature*, 606, 7914: 468–469, <https://doi.org/10.1038/d41586-022-01368-w>
- [5] Prokopov D., Tunbak H., Leddy E., Drylie B. ..., Deniz Ö. 2025. Transposable elements as genome regulators in normal and malignant haematopoiesis. *Blood Cancer Journal*, 15, 1: 87, <https://doi.org/10.1038/s41408-025-01295-9>
- [6] Anders S., Huber W. 2010. Differential expression analysis for sequence count data. *Genome Biology*, 11, 10: R106, <https://doi.org/10.1186/gb-2010-11-10-r106>
- [7] Li H., Durbin R. 2024. Genome assembly in the telomere-to-telomere era. *Nature Reviews Genetics*, 25, 9: 658–670, <https://doi.org/10.1038/s41576-024-00718-w>
- [8] Dobin A., Davis C. A., Schlesinger F., Drenkow J. ..., Gingeras T. R. 2013. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 29, 1: 15–21, <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts635>
- [9] Jin Y., Tam O. H., Paniagua E., Hammell M. 2015. Tetranscripts: a package for including transposable elements in differential expression analysis of RNA-seq datasets. *Bioinformatics*, 31, 22: 3593–3599, <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv422>
- [10] Love M. I., Huber W., Anders S. 2014. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology*, 15, 12: 550, <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8>
- [11] R Core Team. 2024. R: A language and environment for statistical computing, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/> (16. feb. 2025)
- [12] Finn R. D., Hubley R., Jones T., Jurka J. ... Wheeler T. 2015a. DF000001097.4 [UCON21]. Dfam, <https://www.dfam.org/family/DF000001097/summary> (3. jul. 2025)
- [13] Finn R. D., Hubley R., Jones T., Jurka J. ... Wheeler T. 2015b. DF000000136.5 [Eulor6E]. Dfam, <https://www.dfam.org/family/DF000000136/summary> (3. jul. 2025)
- [14] Macchietto M. G., Langlois R. A., Shen S. S. 2020. Virus-induced transposable element expression up-regulation in human and mouse host cells. *Life Science Alliance*, 3, 2, <https://doi.org/10.26508/lsa.201900536>
- [15] Payer L. M., Burns K. H. 2019. Transposable elements in human genetic disease. *Nature Reviews Genetics*, 20, 12: 760–772, <https://doi.org/10.1038/s41576-019-0165-8>
- [16] Fernandez-Luna L., Aguilar-Perez C., Grochowski C. M., Mehaffey M. ... Gonzaga-Jauregui C. 2025. Genome-wide maps of highly similar intrachromosomal repeats that mediate ectopic recombination in three human genome assemblies. *Human Genetics and Genomics Advances*, 6, 2: 100396, <https://doi.org/10.1016/j.xhgg.2024.100396>
- [17] Hoyt S. J., Storer J. M., Hartley G. A., Grady P. G. S. ... O'Neill R. J. 2022. From telomere to telomere: The transcriptional and epigenetic state of human repeat elements. *Science*, 376, 6588: eabk3112, <https://doi.org/10.1126/science.abk3112>
- [18] Klein S. J., O'Neill R. J. 2018. Transposable elements: genome innovation, chromosome diversity, and centromere conflict. *Chromosome Research*, 26, 1: 5–23, <https://doi.org/10.1007/s10577-017-9569-5>
- [19] Schneider V. A., Graves-Lindsay T., Howe K., Bouk N. ... Church D. M. 2017. Evaluation of GRCh38 and de novo haploid genome assemblies demonstrates the enduring quality of the reference assembly. *Genome Research*, 27, 5: 849–864, <https://doi.org/10.1101/gr.213611.116>
- [20] Aganevov S., Yan S. M., Soto D. C., Kirsche M. ... Schatz M. C. 2022. A complete reference genome improves analysis of human genetic variation. *Science*, 376, 6588: eabl3533, <https://doi.org/10.1126/science.abl3533>
- [21] Schwarz R., Koch P., Wilbrandt J., Hoffmann S. 2022. Locus-specific expression analysis of transposable elements. *Briefings in Bioinformatics*, 23, 1: bbab417, <https://doi.org/10.1093/bib/bbab417>
- [22] Chung N., Jonaid G. M., Quinton S., Ross A. ... Han M. V. 2019. Transcriptome analyses of tumor-adjacent somatic tissues reveal genes co-expressed with transposable elements. *Mobile DNA*, 10, 1: 39, <https://doi.org/10.1186/s13100-019-0180-5>
- [23] Breznik N., Črepinšek K., Debeljak M. 2024. Sekvenciranje RNA in primer uporabe v diagnostiki. *Laboratorijska medicina*, 6: 41–50, <https://www.laboratorijska.medicina.si/si/prispevki/clanek/sekvenciranje-rna-in-primer-uporabe-v-diagnostiki> (10. jul. 2026)

BIOSINTEZA KANABINOIDOV

v kvasovkah s pomočjo metabolnega inženirstva

Matej Novak¹, Filip A. Pogačar¹, Luka Škabar¹

¹ Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za mikrobiologijo, Večna pot 111, 1000 Ljubljana

Ključne besede: biosinteza, kanabinoidi, metabolno inženirstvo, kvasovke

IZVLEČEK

Povpraševanje po kanabinoidih se je v zadnjih letih bistveno povečalo, predvsem zaradi večje uporabe v medicini, farmaciji, kozmetiki in v rekreativni uporabi. Kanabinoidi pomagajo zlasti pri lajšanju simptomov nevroloških bolezni, kot sta Parkinsonova in Huntingtonova bolezen, prav tako pomagajo pri paliativni oskrbi in motnjah razpoloženja. Ta trend je opazen predvsem v državah zahodnega sveta, v katerih sta legalizacija in regulacija kanabinoidnih proizvodov vse pogostejši. Posledica tega je večje investiranje v raziskovanje trajnostnih metod pridobivanja kanabinoidnih proizvodov. Tradicionalno kanabinoide pridobivamo iz rastline *Cannabis sativa*, vendar ima gojenje rastlin številne omejitve, kot so: dolgi rastni cikli, visoke zahteve po vodi in energiji, pridelek pa se lahko spreminja iz letine v letino. Gojenje zahteva tudi veliko hranil in prostora glede na količino pridelka. Zaradi teh omejitev pridobivanje kanabinoidov še ne poteka na industrijski ravni in je sorazmerno drago. Potencialno rešitev predstavlja metabolno inženirstvo mikroorganizmov, specifično kvasovk, v katerih lahko s pomočjo biosinteze proizvodimo kanabinoide. Raziskovalci so v kvasovke vstavili heterologne biosintetske poti in s tem konstruirali biosintezne kanabinoidne poti, kar omogoča proizvodnjo ključnih spojin, kot so: kanabigerolna kislina (CBGA), tetrahidrokanabinolna kislina (THCA) in kanabidiolna kislina (CBDA). Kljub velikim napredkom na področju biosinteze pa ostajajo veliki izzivi pri prehodu na industrijsko proizvodnjo. Trenutne raziskave se osredinjajo predvsem na optimizacijo metabolnih poti, povečanje encimske aktivnosti in na izboljšanje fermentacije v bioreaktorjih. S premostitvijo teh težav bodo mikrobnno sintetizirani kanabinoidi predstavljali trajnostno in industrijsko izvedljivo rešitev za zadostitev globalni potrebi po kanabinoidih, s čimer se bo zanašanje na klasične metode gojenja rastlin zmanjšalo.

Uvod

Kanabinoidi so naravno prisotne spojine, ki izhajajo iz cvetov rastline *Cannabis sativa*. Produkti te rastline se anekdotično uporabljajo za medicinske namene že 5000 let, vendar pa so kanabinoidne receptorje in njihov pomen odkrili šele v devetdesetih letih prejšnjega stoletja. Glavna predstavnik kanabinoidov sta Δ^9 -tetrahidrokanabinol (THC) in kanabidiol (CBD), ki sta bila karakterizirana v 60. letih prejšnjega stoletja [1]. Omenjene spojine vplivajo predvsem na endokanabionidni sistem, ki igra ključno vlogo pri razvoju živčnega sistema, pri odraslih pa modulira nevronske aktivnosti in delovanje nevronskega omrežja [2]. Kanabinoidi se vežejo na kanabinoidne receptorje CB1 in CB2 ter tako sprožijo širok razpon fizioloških odgovorov, kot so: sprememba percepcije, razpoloženja ter kognitivnih in gibalnih sposobnosti. Zaradi tega se kanabinoidi potencialno uporabljajo za zdravljenje nevroloških bolezni, kot so Parkinsonova bolezen, Alzheimerjeva bolezen in duševne motnje [3]. Poleg farmacevtske uporabe se kanabinoidi uporabljajo v kozmetični in velnes industriji [4]. Potreba po kanabinoidih in njihovih produk-

tih narašča predvsem v zahodnih državah, v katerih se v zadnjih letih javno mnenje bistveno spreminja. Zaradi tega kanabis in njegovi derivati postajajo vedno manj tabu tema [5]. To je vidno v porastu rekreativne uporabe in predvsem v številu medicinskih raziskav, ki se je v zadnjih 20 letih povečalo za 5-krat. Ravno zaradi tega se je potreba po kanabinoidih v zadnjih letih bistveno povečala, kar pa je bistveno spodbudilo zakonito in tudi nezakonito pridelovanje kanabisa [6, 7]. Industrijska rast rastlin pa je na žalost za okolje zelo škodljiva. Sadike konoplje za rast porabijo bistveno več vode kot druge industrijske rastline (npr. dvakrat več vode na dan (23 L) kot pa vinska trta (13 L)). Poleg tega se večina konoplje goji v notranjih rastlinjakih, kar še dodatno poveča potrebo po energiji, zemlji, pesticidih in po gnojilih ter prav tako poviša emisije [8]. Rešitev za te težave predstavlja biosinteza kanabinoidov v mikroorganizmih, specifično v kvasovkah. S pomočjo metabolnega inženirstva lahko modificiramo metabolne poti organizma, da pridobimo večjo produkcijo zelenega metabolita ali z genskim inženirstvom vstavimo nove biosin-

tetske poti. Znanstvenikom je uspelo v kvasovke vstaviti gene, izpeljane iz rastlin, in jih optimizirati do te mere, da lahko proizvajajo kanabinoide v kontroliranih fermentacijah, kar bi lahko predstavljalo potencialno alternativo rastlinskim kanabinoidom. Kljub napredkom pa je za industrijsko pridelavo mikrobnih kanabinoidov potrebna nadaljnja optimizacija sevov in bioprocesa, da bi dosegli komercialno uspešen produkt [9]. V tem članku bomo povzeli napredke v biosintezi kanabinoidov v kvasovkah. Še posebej se bomo osredinili na pomembnost metabolnega inženirstva, strategij optimizacije procesov in omejitev pri prehodu na industrijsko skalo. Prav tako bomo omenili nove strategije in njihovo potencialno uporabo.

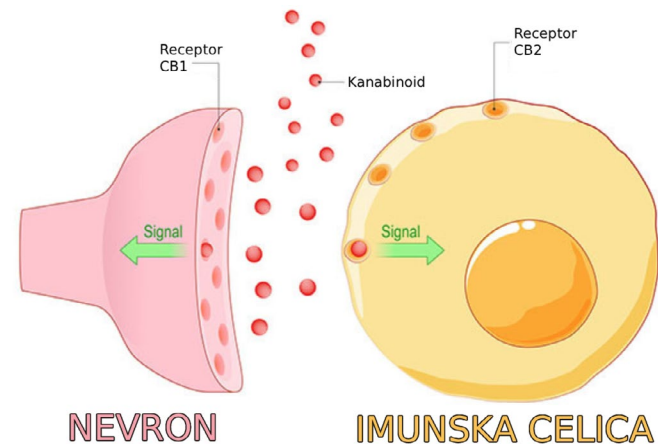
Medicinska uporaba kanabinoidov

Medicinska uporaba kanabisa je definirana kot uporaba rastline kanabisa ali njenih derivatov v medicinske namene [10]. Da bi razumeli medicinsko uporabo kanabinoidov, njene prednosti in tveganja, moramo najprej poznati delovanje in vlogo endokanabinoidnega sistema. To je sistem medceličnega signaliziranja, ki v človeškem telesu uravnava homeostatske funkcije in kognitivne procese, med drugim čustva, spanec, tek in občutek bolečine. Je tesno povezan s centralnim pa tudi perifernim živčnim sistemom ter med odraščanjem skrbi za njun razvoj. Sestavljajo ga tri komponente: endogeni kanabinoidi (signalne molekule, npr. anandamid – AEA in 2-arahidonoilglicerol – 2-AG), kanabinoidni receptorji (na nevronih in drugih celicah, najbolj pomembna sta CB1 in CB2) in encimi, ki sintetizirajo, prenašajo in degradirajo endokanabinoide [11]. Kanabinoidni receptorji CB1 in CB2 v živčnem sistemu predstavljajo glavne, najpodrobneje raziskane tarče za endo- in fitokanabinoide. Receptorji CB1 so prisotni v centralnem in perifernem živčnem sistemu. V prvem so najbolj izraženi v možganskih regijah, ki so povezane s spominom, z gibanjem, s tekom in čustvi. V perifernem pa so močno izraženi v primarnih senzoričnih nevronih in gastrointestinalnem traktu. Receptorji CB2 pa so v veliki meri prisotni v celicah imunskega sistema in tako sodelujejo pri protivnetnem učinku kanabinoidov [11]. Kanabinoide delimo na tri glavne vrste. Prva so endokanabinoidi, ki so naravno prisotni v telesu in skrbijo za pravilno delovanje endokanabinoidnega sistema. Druga so fitokanabinoidi (npr. Δ^9 -tetrahidrokanabinol (THC) in kanabidiol (CBD)), ki nastajajo v cvetovih in listih rastline *Cannabis sativa*, povzročajo drugačno delovanje receptorjev in so posledično lahko psihoaktivni, od tu pa prihajajo tudi njihove potencialne medicinske koristi. Zadnja so sintetični kanabinoidi, ki so bili ustvarjeni v laboratorijih za potrebe učinkovitejših raziskav lokacij, izražanja in delovanja receptorjev (npr. CP55940, ki je omogočil raziskave lokacij receptorjev CB1) [12]. Glavni terapevtski potencial fitokanabinoidov temelji na njihovem agonističnem in alosteričnem delovanju na receptorje CB1 in CB2. Najbolj raziskana in prepoznana fito-

kanabinoida sta Δ^9 -tetrahidrokanabinol (THC) in kanabidiol (CBD) [12]. THC velja za primarnega povzročitelja psihoaktivnih učinkov kanabisa. Nastane po dekarboksilaciji (ki jo najpogostejše povzročimo ljudje sami tik pred zaužitjem, s segrevanjem) predhodnika tetrahidrokanabinolske kisline (THCA), ki sama ni psihoaktivna. THC deluje kot agonist številnih receptorjev (ne le CB1 in CB2), zaradi česar lahko doseže tako močen psihoaktivni učinek. Uporablja se kot protibolečinsko zdravilo za lajšanje slabosti, bruhanja in vnetja, pogosto ob kemoterapiji [12]. Pri zadnjem se najpogostejše uporablja pri rakah glave in vratu, pri čemer je ob zdravljenju prisotnih ogromno neprijetnih stranskih učinkov. Med najhujšimi so kronične bolečine, prisotne zaradi metastaze na kosti ali živčevje. Tradicionalni analgetiki in opiodi so velikokrat nezmožni lajšati tovrstne bolečine ali pa s seboj prinesejo še več stranskih učinkov (zadnje velja predvsem za opioide, ki lahko povzročajo hudo zasvojenost) [10]. Več raziskav kaže, da ima lahko THC pri manjših odmerkih (med 10 in 20 mg) večji analgetični učinek kot npr. kodein in drugi opiat [13]. Po drugi strani pa je največ negativnih stranskih učinkov in posledic prekomerne uporabe kanabisa povezanih prav s THC. Tu govorimo predvsem o večji verjetnosti za razvitje psihičnih motenj v poznejšem življenju, če je uporaba v najstništvu in mladi odraslosti prekomerna [12]. Dolgoročna izpostavljenost in uporaba pa lahko vodita celo v razvoj t. i. motnje uživanja konoplje (angl. cannabis use disorders oz. CUDs). To je stanje odvisnosti, ki lahko vodi v vedenjske motnje (npr. bipolarna motnja), spremembo kognitivnih procesov ter v poslabšanje oz. izgubo kratko- in dolgoročnega spomina. Omenjeni negativni učinki se nanašajo predvsem na strukturo in delovanje možganov ter so bili opaženi zlasti pri mladostnikih, ki so prekomerno rekreativno uživali kanabis [14].

Drugi glavni medicinski fitokanabinoid je kanabidiol oz. CBD, ki prav tako kot THC nastane z dekarboksilacijo, in sicer iz predhodnika kanabidiolne kisline (CBDA). CBD ne povzroči psihoaktivnih učinkov, ima pa veliko potencialnih protivnetnih in antioksidativnih učinkov. Deluje lahko kot agonist, antagonist ali alosterični modulator številnih membranskih receptorjev in signalnih proteinov, z veliko mehanizmi, ki v veliki meri še niso popolnoma raziskani. To med drugim vključuje receptorje za serotonin, adenoziinske receptorje in receptorje GABAA, NF- κ B in druge vnetne signalne poti itn. [15]. Poleg tega ščiti pred oksidativnim stresom, inhibira produkcijo reaktivnih kisikovih spojin in sproščanje vnetnih signalnih molekul [16]. Trenutne raziskave kažejo, da bi se lahko uporabljal kot zdravilo ali vsaj za lajšanje simptomov diabetesa, srčno-žilnih bolezni, raka, artritisa, epilepsije, Alzheimerjeve in Parkinsonove bolezni itn. CBD ima potencial predvsem pri lajšanju simptomov zadnje. Glavna mehanizma napredovanja bolezni sta namreč oksidativni stres, ki nastane zaradi deregulacije mitohondrijev v živčnih celicah, in vnetje,

ki vodi v apoptozo dopaminergičnih celic. Ravno CBD lahko s svojimi protivnetnimi in z antioksidativnimi lastnostmi pomembno pomaga bolnikom, ki imajo težave s hujšimi manifestacijami te bolezni. Najpomembnejši simptomi, pri katerih ima CBD potencialno terapevtski učinek, so: diskinezija (nenormalni, nehoteni gibi oz. tresenje, značilno za Parkinsonovo bolezen), tesnoba, bolečina in motnje spanca [17].



Slika 1: Poenostavljen prikaz delovanja kanabinoidov prek kanabinoidnih receptorjev CB1 in CB2. Kanabinoidi se vežejo na receptorje CB1 in CB2 na celični membrani ter s tem sprožijo znotrajcelično signalizacijo. Receptorji CB1 so značilno močno izraženi v živčnem sistemu, medtem ko so receptorji CB2 pogosteje povezani s celicami imunskega sistema. Aktivacija teh receptorjev vpliva na različne fiziološke procese, vključno z uravnavanjem živčnega prenosa in imunskega odziva. Prirejeno po [18].

Biosintetska pot kanabinoidov v kvasovkah

Metabolno inženirstvo kvasovk se uveljavlja kot ena razvitejših mikrobnih platform za proizvodnjo fitokanabinoidov in njihovih kislih prekurzorjev, vključno s THCA in CBDA, iz katerih z dekarboksilacijo nastane THC oziroma CBD. Kvasovke namreč združujejo hitro, nadzorljivo rast in skalabilnost mikroorganizmov z evkariontsko sposobnostjo procesiranja proteinov, ki je potrebna za funkcionalno izražanje več rastlinskih kanabinoidnih encimov; zadnje je v bakterijskih gostiteljih težje učinkovito vzpostaviti [19, 20]. *Saccharomyces cerevisiae* trenutno predstavlja glavno kvasno platformo: je genetsko dobro obvladljiva, zanje so na voljo obsežna orodja genomskega inženirstva, na splošno velja za varno (GRAS), prenaša industrijske fermentacijske pogoje in nativno vsebuje mevalonatno (MVA) pot, ki zagotavlja izoprenoidne prekurzorje [21, 22]. Njene organele, predvsem endoplazemski retikulum (ER), vakuolo in peroksisom, se lahko izkoristi za lokalizacijo heterolognih encimov in metabolnih intermediatov [19, 21, 23]. Luo in sod. (2019) so prvič opisali rekonstrukcijo de novo kanabinoidne sinteze v *S. cerevisiae*. Po obsežnem preusmerjanju metabolizma prekurzorjev so pokazali proizvodnjo glavnih kanabinoidov iz preprostega sladkorja galaktoze [9]. V inženirani poti je ogljik usmerjen v dve biosintezni veji, ki se združita pri kanabigerolni kislini (CBGA). V terpenoidni/izoprenoidni veji acetyl-CoA vstopi

v endogeno pot MVA, v kateri se med reakcijo pretvori v izopentenil pirofosfat ter dimetilalil pirofosfat, ki ju nato encim farnezil pirofosfat sintaza (ERG20) kondenzira v geranil pirofosfat (GPP) in končno v farnezil pirofosfat (FPP), ki pa za biosintezo kanabinoidov ni uporaben. Zato se uporablja inženiran encim (ERG20*), ki preferenčno proizvaja GPP namesto FPP [9, 21, 24]. V vzporedni poliketidni veji se lahko heksanojska kislina aktivira v heksanoil-CoA z acil-aktivirajočim encimom rastline *Cannabis sativa* (CsAAE1). Naprednejši sevi pa heksanoil-CoA tvorijo endogeno iz sladkorja prek inženiranih poti, kot je reverzna β -oksidacija. Heksanoil-CoA se nato podaljša s tremi enotami malonil-CoA s pomočjo tetraketid/olivetol sintaze (CsTKS/CsOLS), nastali tetraketidni intermediat pa ciklizira ciklaza olivetolne kisline (CsOAC), pri čemer nastane olivetolna kislina (OA) [9, 22]. OA se prenilira z GPP prek membranske povezane aromatske preniltransferaze (CsPT4) ali alternativno prek topne aromatske preniltransferaze iz bakterije *Streptomyces sp.* CL190 (NphB), pri čemer nastane CBGA [9, 19]. CBGA se nato lahko oksidativno ciklizira s THCA-sintazo (THCAS) ali CBDA-sintazo (CBDAS), pri čemer nastane Δ^9 -tetrahidrokanabinolna kislina (THCA) oziroma kanabidiolna kislina (CBDA). Biosintezni produkti so tako primarno kisli kanabinoidi, medtem ko nevtralna THC in CBD nastane z neencimsko dekarboksilacijo THCA in CBDA, običajno s segrevanjem med nadaljnjo obdelavo [19, 22].

Uporabljeni substrati so lahko različni: prva *de novo* pot je kot glavni vir ogljika uporabljala galaktozo [9], poznejši sevi pa so bili preoblikovani za ekonomsko ugodnejšo uporabo glukoze, pogosto v kombinaciji z nadzorovanim dodajanjem heksanojske kisline [18, 21, 23]. OA je mogoče dodajati tudi neposredno, kadar je optimizacija usmerjena posebej v prenilacijo [9, 19, 25]. Novejše inženirstvo si prizadeva odpraviti odvisnost od zunanje dodane heksanoata. Schäfer in sod. (2025) so na primer vzpostavili endogeno tvorbo heksanoil-CoA v kvasovki *S. cerevisiae* z uporabo reverzne β -oksidacije. Tako so povečali razpoložljivost CoA in malonil-CoA, pri čemer so dosegli približno 180 mg/L OA iz gojišča z glukozo brez dodanega heksanoata, kar predstavlja pomemben korak k popolnoma iz sladkorja izpeljani biosintezi kanabinoidov [22]. Optimizacija biosinteze kanabinoidov zato zahteva usklajeno uravnoteženje obeh prekurzorskih vej in zmanjšanje konkurenčnih endogenih reakcij. Uspešne strategije vključujejo povečanje pretoka skozi pot MVA in zadrževanje GPP z inženirstvom ERG20, povečanje oskrbe z malonil-CoA z inženirstvom acetyl-CoA karboksilaze, več kopij genov CsTKS in CsOAC ali konstrukcijo encimskih fuzij za izboljšanje tvorbe OA, med drugim tudi delekcijo ali znižanje izražanja reakcij β -oksidacije in sinteze maščobnih kislin, ki porabljajo heksanoat ali heksanoil-CoA ter povečanje količin acetyl-CoA, CoA, NADPH in drugih kofaktorjev v celici, potrebnih za vzdrževanje kanabinoidne sintezne poti [21–23]. Zhang in sod. (2023) so na primer združili

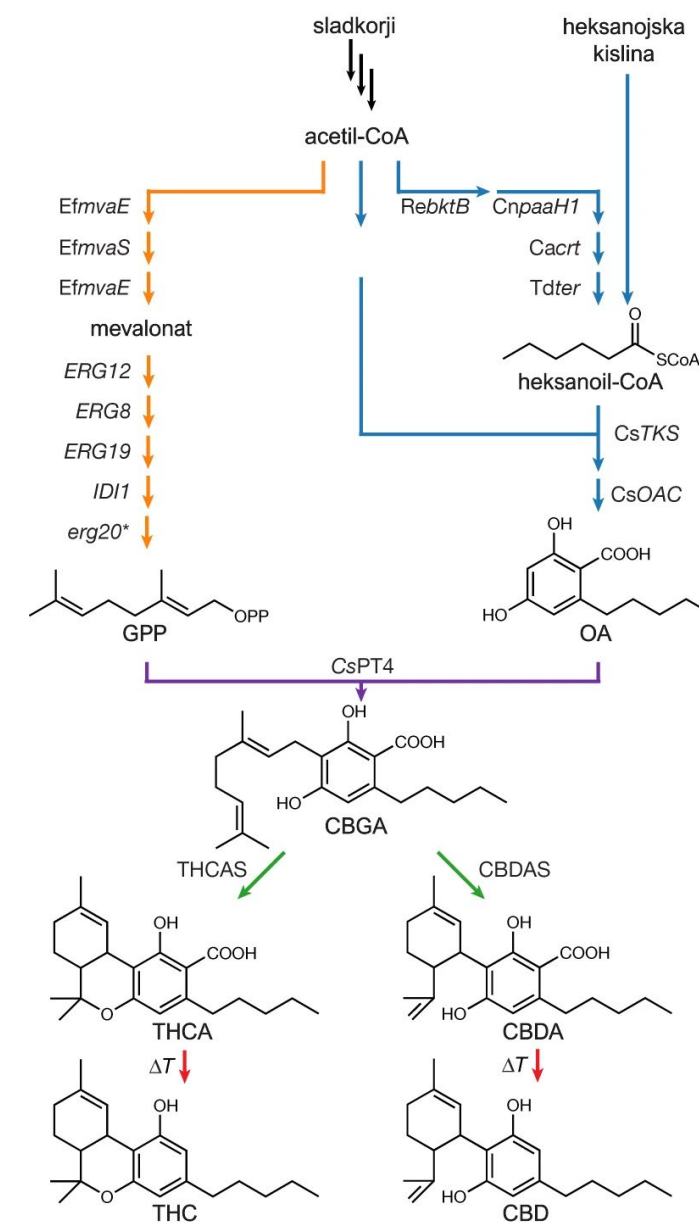
modulacijo metabolizma maščobnih kislin, razširitev ER, stabilizacijo CsPT4 s proteinsko fuzijo in preoblikovanje galaktoznega regulacijskega sistema za izražanje ob prisotnosti glukoze, s čimer so nazadnje dosegli 510,32 mg/L CBGA iz glukoze in heksanoata [23]. To ponazarja obseg izboljšav, ki jih je mogoče doseči s hkratnim inženirstvom poti, proteinov in organelov.

Dodaten mehanizem za izboljšanje predstavlja kompartmentalizacija. Ding in sod. (2024) so biosintezo prekurzorjev porazdelili med citoplazmo in peroksisomi ter to združili z inženirstvom acetyl-CoA in NADPH, kar je po šaržni kultivaciji z dovajanjem substrata in dekarboksilaciji (z mikrovalovi) pripeljalo do 138 mg/L kanabigerola (CBG) [21].

Bioproceno inženirstvo je tako neločljivo od metabolnega: nadzorovano šaržno dovajanje glukoze in heksanojske kisline lahko prepreči probleme z omejenim ogljikom, hkrati pa se izogne inhibitornim koncentracijam heksanoata. Nizka preostala koncentracija glukoze lahko ugodno vpliva na proizvodne faze, vrednost pH pa vpliva na privzem maščobnih kislin, rast kvasovk ter na aktivnost kompartmentaliziranih THCAS in CBDAS [19, 21]. Za CBD so Qiu in sod. (2022) pokazali, da znotrajcelični transport predstavlja še eno pomembno ozko grlo. Prekomerno izražanje vakuolarnega transporterja BPT1 je namreč okrepilo prenos CBGA iz citoplazme v vakuolo, kjer je bila lokalizirana CBDAS, in skupaj z inženirstvom prekurzorske poti ter fuzijskih proteinov povečalo proizvodnjo CBD na slabih 7 mg/L [24].

Čeprav kvasovka *S. cerevisiae* ostaja najrazvitejši kvasni model, oljna kvasovka *Yarrowia lipolytica* predstavlja obetavno alternativo. Njena citosolna ATP-citrat liaza namreč podpira visok pretok acetyl-CoA, naravno omogoča znaten pretok skozi mevalonatno pot, ima obsežno membransko kapaciteto, povezano z lipidi, razmeroma dobro prenaša organske kisline in lahko uporablja raznolike poceni substrate [25]. Hong in sod. (2025) so vzpostavili biosintezo CBGA v kvasovki *Y. lipolytica* in izboljšali stopnjo prenilacije z izražanjem dvojne preniltransferaze [25]. Na splošno metabolno inženirstvo ponuja pomembne prednosti pred proizvodnjo kanabinoidov z gojenjem in ekstrakcijo rastline *Cannabis sativa*. Fermentacija je neodvisna od sezonskih in podnebnih nihanj, zahteva manj kmetijskih zemljišč ter omogoča nadzorovano in skalabilno proizvodnjo [21, 23, 25]. Metabolne poti je mogoče usmeriti v selektivno proizvodnjo ciljnih spojin, dovajanje alternativnih substratov in encimska promiskuiteta pa omogočata tudi dostop do redkih in nenaravnih kanabinoidnih analogov [9, 19, 24]. Inženirstvo genoma, proteinov, transportnih poti in organelov se lahko sistematično uporabljajo za odpravljanje posameznih biosinteznih ozkih grl [21, 23–25]. Glavne preostale omejitve vključujejo: nezadostno aktivnost ali stabilnost heterolognih encimov, toksičnost substratov oziroma produktov, konkurenco z endogenimi metabolnimi potmi ter neučinkovit trans-

port intermediatov med celičnimi kompartmenti [19, 21, 23–25]. Kljub temu izboljšave v proizvodnji CBGA, THCA in CBD kažejo, da metabolno inženirstvo kvasovk napreduje od začetne rekonstrukcije celotne poti proti vse učinkovitejšim in bolj prilagodljivim proizvodnim platformam [9, 19, 23, 24].



Slika 2: Gensko in metabolno inženirana biosintetska pot za sintezo kanabinoidov v kvasovki *S. cerevisiae*. Geranil pirofosfat (GPP) nastane prek mevalonata, in sicer s predhodnim vnosom genov *EfmvaE* in *EfmvaS* iz bakterije *Enterococcus faecalis* ter s povečanim izražanjem nativnih genov mevalonatne poti (*ERG12*, *ERG8*, *ERG19* in *IDI1*) in mutiranega gena *ERG20**. Heksanoil-CoA nastane prek heterologne biosintezne poti z uporabo genov iz raznih bakterij (*RebktB*, *CnpaaH1*, *Cacrt*, *Tdter*) ali pa iz dodane heksanojske kisline kot substrata za encim AAE, ki ga kodira gen *CsAAE1* iz konoplje. Z izražanjem genov, ki kodirata *CsTKS* in *CsOAC*, iz heksanoil-CoA nastane olivetolna kislina (OA), ki jo prenilira encim *CsPT4*. Tako nastala kanabigerolna kislina (CBGA) je lahko s pomočjo kanabinoidnih sintaz *THCAS* in *CBDAS* pretvorjena v Δ^9 -tetrahidrokanabinolno kislino (THCA) oziroma kanabidiolno kislino (CBDA). Po segrevanju (ΔT) pa se THCA in CBDA dekarboksilirata v Δ^9 -tetrahidrokanabinol (THC) oziroma kanabidiol (CBD). Legenda: Ef – *Enterococcus faecalis*; Re – *Ralstonia eutropha*; Cn – *Cu-*

priavidus necator; Ca – Clostridium acetobutylicum; Td – Treponema denticola; Cs – Cannabis sativa; MvaE – acetil-CoA tiolaza in hidroksimetilglutaril-CoA reduktaza; MvaS – hidroksimetilglutaril-CoA sintaza; ERG12 – mevalonat kinaza; ERG8 – fosfomevalonat kinaza; ERG19 – mevalonat pirofosfat dekarboksilaza; IDI1 – izopentenil difosfat:dimetilalil difosfat izomeraza; ERG20* – inženirana farnezil pirofosfat sintetaza, ki preferenčno producira geranil pirofosfat namesto farnezil pirofosfat; BktB – betaketotiolaza; PaaH1 – 3-hidroksiacil-CoA dehidrogenaza; Crt – kratkoverižen-enoil-CoA hidrataza; Ter – trans-2-enoil-CoA reduktaza; AAE1 – heksanoil-CoA sintaza; TKS – 3,5,7-trioksododekanoil-CoA sintaza; OAC – ciklaza olivetolne kisline; PT4 – preniltransferaza 4; THCAS – sintaza tetrahidrokanabinolne kisline; CBDAS – sintaza kanabidiolne kisline. Prirejeno po [9].

Problemi pri prehodu v industrijo

Pri prehodu na industrijsko raven se kanabinoidi srečajo z enakimi problemi kot veliko drugih biosintetskih snovi. Osnovni problemi so majhen titer (kar je posledica majhnega metabolnega fluksa), dostopnost ključnih prekurzorjev in toksičnost produkta [25]. Poleg tega je še več ozkih grl pri prehodu na industrijsko raven zaradi uporabe kvasovk kot proizvodnih organizmov. Problem predstavljajo predvsem dostopnost raztopljenega kisika, kontrola pH, ohranjanje toplote med fermentacijo, zagotavljanje kakovosti produkta in produktivnost pri fermentacijah v večjih bioreaktorjih [26].

Kljub velikim napredkom v biosintezi kanabinoidov v kvasovkah proces še ni optimiziran za komercialno uporabo. Največji problem predstavlja sorazmerno majhen donos v primerjavi z drugimi industrijskimi procesi. Razlogi za majhen donos so trije: neoptimizirane metabolne poti, nezadostna katalitična aktivnost in toksičnost produkta. Heterologno izražanje genov za biosintetske poti sinteze kanabinoidov predstavlja veliko metabolno breme za celico, kar zelo upočasni rast celice in posledično tudi metabolno aktivnost. Veliko genov za biosintetske poti izhaja iz rastline *Cannabis sativa*, zaradi česar niso najučinkovitejši, ko so izraženi v kvasovkah [9]. Ker biosinteza kanabinoidov poteka v več korakih, sta koordinacija in pravilno izražanje genov ključnega pomena. Že pri majhnih odstopanjih pride do neučinkovite produkcije prekurzorjev in povečanega nastanka neželenih stranskih produktov [23]. Proces se lahko optimizira npr. s sosintezo različnih preniltransferaz (PTaz) iz bakterijskega rodu *Streptomyces*. Te PTaze imajo komplementarno preniltransferazno aktivnost, kar poveča katalitično aktivnost endogenih encimov. Dodatek teh PTaz je povečal produkcijo za 100 %. Prav tako se lahko doda več kopij določenih genov, kot so na primer CsPT4, ki kodira ključno preniltransferazo v procesu nastanka CBGA. Z dodatkom več kopij ključnih encimov se lahko titer poveča za 300 % [25]. Koncentracija prekurzorjev, kot so heksanoil-CoA in geranil pirofosfat, je ključna za pravilno biosintezo kanabinoidov. Ti prekurzorji se uporabljajo tudi v endogenih sintetičnih poteh kvasovk, zaradi česar pride do kompeticije s heterolognimi potmi. Če je koncentracija premajhna, lahko nastane ozko grlo v

biosintezi in se donos zaradi tega bistveno zniža. Raziskovalci so to v veliki meri rešili tako, da so v gojišče dodali povišano koncentracijo prekurzorjev (npr. 1 M heksanojsko kislino) [9]. Prav tako se veliko raziskav osredinja na usmeritev toka metabolitov iz endogenih poti v biosintezo kanabinoidov s pomočjo blokiranja degradacije prekurzorjev, optimizacije encimov ter kompartmentalizacije procesov v celici. Tako so dosegli titer 510 mg/L CBGA iz enostavnega sladkorja glukoze in heksanoata. Za komercialno smiselno industrijsko proizvodnjo bi bilo treba titer povečati vsaj na 10 g/L [23, 27]

Preglednica 1: Povzetek pomembnejših tehnik metabolnega inženirstva in njihovega vpliva na končni titer kanabinoidov v kvasovkah. Prikazan titer pri posamezni tehniki predstavlja titer po uvedbi te tehnike in vseh predhodnih tehnik skupaj. Prikazani titri so končni produkt določenega seva v posamezni študiji. Poleg omenjenih strategij so prisotne tudi druge genetske in metabolne spremembe. Povzeto po [9, 23, 25].

Tehnika metabolnega inženirstva	Končni titer kanabinoidov
izražanje endogene biosintetske poti	0,2 mg/L
dodajanje limitnega prekurzorja (1 M heksanojska kislina)	1,3 mg/L
optimizacija konverzije heksanojske kisline	3,0 mg/L
sprememba metabolnega fluksa v sintezo olivetolne kisline	7,2 mg/L
blokiranje degradacije heksanoata	20,1 mg/L
dodajanje kopij genov za ključne encime	107,8 mg/L
zamenjava nativnih promotorjev FAS1p z RPS25Ap	132,5 mg/L
povečanje endoplazemskega retikuluma z ekspresijo faktorja Ino2	194,5 mg/L
optimizacija preniltransferazne aktivnosti	510,3 mg/L

Legenda:

- FAS1p – promotor za gen FAS1, ki za sintezo maščobnih kislin uporablja heksanoil-CoA
- RPS25Ap – promotor za gen FAS1 z manjšo transkripcijsko aktivnostjo
- Ino2 – transkripcijski faktor, ki pozitivno vpliva na sintezo fosfolipidov in maščobnih kislin

Drugi velik problem predstavlja citotoksičnost kanabinoidov za kvasne celice. Kanabinoidi so topni v lipidih in se zato lahko vgradijo v celične membrane ter motijo celično signaliziranje, kar lahko vodi v zmanjšano rast in akumulacijo nezaželenih lipidov. Povečana koncentracija prekurzorjev kanabinoidov (npr. heksanojske kisline) lahko tudi moti pravilno delovanje celice. Heksanojska kislina je šibka organska kislina, ki lahko v svoji protonirani obliki prosto prehaja prek celične membrane, kar povzroči spremembe v vrednosti pH, protonski gonilni sili in homeostazi. Raziskovalci so predlagali, da se eksogeno dohranjevanje s heksanojsko kislino nadomesti z endogeno pridobljeno sintezo ali pa vstavitvijo večjega števila genov za konverzijo prekurzorjev, saj se tako ti hitreje porabijo in ne povzročajo problemov [25].

Povpraševanje po kanabinoidih

Povpraševanja po CBD- in THC-ekstraktih je veliko, predvsem v raziskovalnih in medicinskih laboratorijih. Cena visokokakovostnega CBD-izvlečka lahko presega 5.000 ameriških dolarjev na kilogram. Pilotna podjetja na področju biosinteze kanabinoidov pa ocenjujejo, da bi cena biosintetičnega CBD lahko znašala samo 1.000 ameriških dolarjev na kilogram, kar je petkrat cenejše od rastlinskega. Prehod v industrijo se je že začel, saj podjetja, kot so: Willow Biosciences, Hyasynth Biologics in Demetrix, že producirajo biosintetične kanabinoide, sintetizirane na industrijski skali. Kljub velikim napredkom in ogromnim vlaganjem v ta podjetja pa biosintetsko producirani kanabinoidi predstavljajo le majhen delež kanabinoidnega trga [28]. Metabolno inženirstvo nam prav tako daje možnost sinteze analogov kanabinoidov in redkejših kanabinoidov. *Cannabis sativa* producira več kot 120 kanabinoidov, veliko od njih v zelo majhnih koncentracijah. Kanabinoidi, kot so: kanabigerol, tetrahidrokanabivarin, kanabidivarin in kanabikromen, so pokazali potencial v medicinski uporabi zaradi protivnetnih in nevroprotektivnih učinkov. S pomočjo tarčne biosinteze lahko te še neraziskane kanabinoide preučimo in jih potencialno uporabimo v medicinske namene. V medicinske namene se raziskujejo tudi analoge bolj znanih kanabinoidov, kot je THC. S spreminjanjem verige C3 lahko spremenimo afiniteto in selektivnost vezave ter moč delovanja [9].

Zaključek

Povečano povpraševanje po kanabinoidih in njihovi potencialni uporabi v medicini, farmaciji in v drugih industrijah spodbujajo razvoj alternativnih načinov njihove proizvodnje. Tradicionalno pridobivanje iz rastline *Cannabis sativa* je povezano z visoko porabo prostora, vode in energije ter z nepredvidljivostjo končnega produkta, zato biosinteza kanabinoidov v mikroorganizmih predstavlja trajnostno alternativo. S pomočjo metabolnega inženirstva lahko v kvasovkah sintetiziramo pomembne kanabinoide, kot sta THC in CBD, ter njihove prekurzorje. Kljub pomembnemu napredku mikrobná proizvodnja kanabinoidov še ni dovolj optimizirana za široko industrijsko uporabo. Glavne omejitve predstavljajo nizki titri, omejena dostopnost prekurzorjev, nizka aktivnost heterolognih encimov, toksičnost produktov in težave pri prenosu procesa na industrijsko skalo. Nadaljnji razvoj bo zato zahteval usklajeno optimizacijo metabolnih poti, kvasnih celic in fermentacijskih pogojev. Biosinteza v kvasovkah kljub trenutnim omejitvam predstavlja pomemben korak proti bolj nadzorovani, ponovljivi in trajnostni proizvodnji kanabinoidov. Z nadaljnjim razvojem metabolnega inženirstva in izboljšanjem donosov bi lahko v prihodnosti postala komercialno konkurenčna alternativa pridobivanju kanabinoidov iz rastlin.

- [1] Bridgeman M. B., Abazia D. T. 2017. Medicinal cannabis: History, pharmacology, and implications for the acute care setting. P & T : A Peer-Reviewed Journal for Formulary Management, 42, 3: 180–188.
- [2] Lu H.-C., Mackie K. 2021. Review of the endocannabinoid system. Biological Psychiatry: Cognitive Neuroscience and Neuroimaging, 6, 6: 607–615, <https://doi.org/10.1016/j.bpsc.2020.07.016X>
- [3] Cristino L., Bisogno T., Di Marzo V. 2020. Cannabinoids and the expanded endocannabinoid system in neurological disorders. Nature Reviews Neurology, 16, 1: 9–29, <https://doi.org/10.1038/s41582-019-0284-z>
- [4] Kuzumi A., Yoshizaki-Ogawa A., Fukasawa T., Sato S., Yoshizaki A. 2024. The potential role of cannabidiol in cosmetic dermatology: A literature review. American Journal of Clinical Dermatology, 25, 6: 951–966, <https://doi.org/10.1007/s40257-024-00891-y>
- [5] Reid M. 2020. A qualitative review of cannabis stigmas at the twilight of prohibition. Journal of Cannabis Research, 2, 1: 46, <https://doi.org/10.1186/s42238-020-00056-8>
- [6] Ng J. Y., Chang N. 2022. A bibliometric analysis of the cannabis and cannabinoid research literature. Journal of Cannabis Research, 4, 1: 25, <https://doi.org/10.1186/s42238-022-00133-0>
- [7] Manthey J. 2019. Cannabis use in Europe: Current trends and public health concerns. International Journal of Drug Policy, 68: 93–96, <https://doi.org/10.1016/j.drugpo.2019.03.006>
- [8] Wartenberg A. C., Bodwitch H., Parker-Shames P. ... Butsic V. 2021. Cannabis and the environment: What Science tells us and what we still need to know. Environmental Science & Technology Letters, 8, 2: 98–107, <https://doi.org/10.1021/acs.estlett.0c00844>
- [9] Luo X., Reiter M. A., d’Espaux L., Wong J. ... Keasling J. D. 2019. Complete biosynthesis of cannabinoids and their unnatural analogues in yeast. Nature, 567, 7746: 123–126, <https://doi.org/10.1038/s41586-019-0978-9>
- [10] Perri F., Marciano M. L., Zotta A., Pontone M. ... Maiolino P. 2026. Medical cannabis for best supportive care of patients affected by cancers of the head and neck: A narrative review. In Vivo, 40, 1: 50–63, <https://doi.org/10.21873/invivo.14172>
- [11] Rezende B., Alencar A. K. N., De Bem G. F., Fontes-Dantas F. L., Montes G. C. 2023. Endocannabinoid system: Chemical characteristics and biological activity. Pharmaceuticals, 16, 2: 148, <https://doi.org/10.3390/ph16020148>
- [12] Duczmal D., Bazan-Wozniak A., Niedzielska K., Pietrzak R. 2024. Cannabinoids—multifunctional compounds, applications and challenges—Mini review. Molecules, 29, 20: 4923, <https://doi.org/10.3390/molecules29204923>
- [13] Bimonte S., Nocerino D., Schiavo D., Crisci M. ... Cuomo A. 2024. Cannabinoids for cancer-related pain management: An update on therapeutic applications and future perspectives. Anticancer Research, 44, 3: 895–900, <https://doi.org/10.21873/anticancer.16883>
- [14] Leinen Z. J., Mohan R., Premadasa L. S., Acharya A. ... Byrareddy S. N. 2023. Therapeutic potential of cannabis: A comprehensive review of current and future applications. Biomedicines, 11, 10: 2630, <https://doi.org/10.3390/biomedicines11102630>
- [15] Martinez Naya N., Kelly J., Corna G., Golino M. ... Toldo S. 2023. Molecular and cellular mechanisms of action of cannabidiol. Molecules, 28, 16: 5980, <https://doi.org/10.3390/molecules28165980>
- [16] dos-Santos-Pereira M., Guimarães F. S., Del-Bel E., Raisman-Vozari R., Michel P. P. 2020. Cannabidiol prevents LPS-induced microglial inflammation by inhibiting ROS/NF-κB-dependent signaling and glucose consumption. Glia, 68, 3: 561–573, <https://doi.org/10.1002/glia.23738>
- [17] Vallée A., Vallée J.-N., Lecarpentier Y. 2021. Potential role of cannabidiol in Parkinson’s disease by targeting the WNT/β-catenin pathway, oxidative stress and inflammation. Aging, 13, 7: 10796–10813, <https://doi.org/10.18632/aging.202951>
- [18] Grinspoon P. 2021. The endocannabinoid system: Essential and mysterious. Harvard Health Publishing. Dostopno na <https://www.health.harvard.edu/blog/the-endocannabinoid-system-essential-and-mysterious-202108112569> (23. jul. 2026)
- [19] Schmidt C., Aras M., Kayser O. 2024. Engineering cannabinoid production in Saccharomyces cerevisiae. Biotechnology Journal, 19, 2: 2300507, <https://doi.org/10.1002/biot.202300507>
- [20] Hubert F. M., Love A. C., Lan T., Bone H. K., Moore B. S. 2025. Recent innovations in cannabinoid chemistry, biology, and biosynthesis. Current Opinion in Biotechnology, 96: 103378, <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2025.103378>
- [21] Ding Y., Ning Y., Xin D., Fu Y. 2024. Dual cytoplasmic-peroxisomal compartmentalization engineering and multiple metabolic engineering strategies for high yield non-psychoactive cannabinoid in Saccharomyces cerevisiae. Biotechnology Journal, 19, 2: 2300590, <https://doi.org/10.1002/biot.202300590>
- [22] Schäfer K. J., Chalwatzis L., Feka A. M., Aras M. ... Kayser O. 2025. Biochemical and metabolic engineering of Saccharomyces cerevisiae for the biosynthesis of olivetolic acid, a key cannabinoid precursor. Biotechnology Journal, 20, 6: e70042, <https://doi.org/10.1002/biot.70042>
- [23] Zhang Y., Guo J., Gao P., Yan W. ... Keasling J. D. 2023. Development of an efficient yeast platform for cannabigerolic acid biosynthesis. Metabolic Engineering, 80: 232–240, <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2023.10.004>
- [24] Qiu J., Hou K., Li Q., Chen J. ... Wang C. 2022. Boosting the cannabidiol production in engineered Saccharomyces cerevisiae by harnessing the vacuolar transporter BPT1. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 70, 38: 12055–12064, <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.2c05468>
- [25] Hong Y., Gu Y., Lin D., Wu Z. ... Xu P. 2025. De novo biosynthesis of cannabinoids and their analogs in Yarrowia lipolytica. BioDesign Research, 7, 2: 100021, <https://doi.org/10.1016/j.bidere.2025.100021>
- [26] De Brabander P., Uitterhaegen E., Delmulle T., De Winter K., Soetaert W. 2023. Challenges and progress towards industrial recombinant protein production in yeasts: A review. Biotechnology Advances, 64: 108121, <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2023.108121>
- [27] Valliere M. A., Korman T. P., Woodall N. B., Khitrov G. A. ... Bowie J. U. 2019. A cell-free platform for the prenylation of natural products and application to cannabinoid production. Nature Communications, 10, 1: 565, <https://doi.org/10.1038/s41467-019-08448-y>
- [28] Dolgin E. 2019. The Bioengineering of cannabis. Nature, <https://www.nature.com/articles/d41586-019-02525-4> (23. jul. 2026)

Mladi raziskovalec

BLAŽ JUG, mag. mikrobiol.

Do doktorata vodi več poti.

Ko ljudem povem, da raziskujem bakterijo *Campylobacter jejuni*, me pogosto pričaka privzdignjena obrv. Medtem ko salmonelo, listerijo in *E. coli* pozna skoraj vsak, ostaja bakterija *C. jejuni* precej manj poznana, čeprav sodi med najpogostejše bakterijske povzročitelje bolezni, ki se prenašajo s hrano. Prav vprašanje, kako tej razmeroma občutljivi bakteriji uspe preživeti zunaj gostitelja in se ohraniti skozi živilsko verigo, je v središču mojega doktorskega dela.

V njem raziskujem vpliv izbranih naravnih učinkovin in drugih bakterijskih vrst na pritrjevanje, preživetje in na proteinski profil bakterije *C. jejuni* v biofilmu. To je strukturirana skupnost bakterijskih celic, pritrjenih na površino in obdanih z zaščitnim matriksom, ki jim olajša prilagajanje neugodnim razmeram. Ugotovili smo, da lahko izbrana mlečnokislinska bakterija zmanjša preživetje in z virulenco povezane lastnosti bakterije *C. jejuni*, medtem ko ji lahko bakterija, povezana s kvarjenjem živil, v določenih razmerah pomaga preživeti. V mikrobiologiji zato le redko obstajajo preprosti odgovori.

Moja raziskovalna pot se je začela med pripravo magistrskega dela, ko sem sodeloval pri projektu Po kreativni poti do znanja ter se pod mentorstvom danes žal pokojne prof. dr. Polone Jamnik usmeril v proteomske analize. Prav to specifično znanje mi je pozneje odprlo vrata do projektne zaposlitve na Katedri za biotehnologijo, mikrobiologijo in varnost živil Biotehniške fakultete. To je bil čas začetka pandemije, ko je bilo delo težko najti. Na katedri raziskujemo mikroorganizme, pomembne za proizvodnjo in varnost živil, pri tem pa povezujemo klasično mikrobiologijo s sodobnimi molekularnimi in z analitskimi metodami.

Moja pot do doktorata ni bila klasična pot mladega raziskovalca. V doktorski študij Bioznanosti s področja agroživilske mikrobiologije sem se vključil kot izredni študent. Po prvem letu sem začel raziskovalno delo združevati z delom pedagoškega asistenta, ki danes predstavlja polovico moje zaposlitve. Pri poučevanju se srečujem z bruci, ki prvič spoznavajo mikrobiologijo živil, in z že bolj večšimi magistrskimi študenti. V teh letih se življenje zunaj fakultete seveda ni ustavilo.



Poročil sem se in postal oče. Doktorski študij sem tako usklajeval z raziskovalnim in s pedagoškim delom ter z družinskim življenjem.

Tipičen delovni dan zato pravzaprav ne obstaja. En dan pripravljam bakterijske kulture in izvajam poskuse, naslednji analiziram rezultate ali pišem članek. Vmes pripravljam in popravljam kolokvije, odgovarjam na vprašanja magistrandov ter usklajujem delo s sodelavci. Pogosto se tako v istem dnevu večkrat preselim iz laboratorija za računalnik in nazaj.

Posamezen eksperiment lahko traja tudi več dni, do smiselne razlage rezultatov pa včasih potrebujemo več mesecev. Velik del raziskovanja predstavljajo ponovitve, izboljševanje metod in precej iskrenega ugotavljanja, kaj vse bi lahko šlo narobe. Če rezultat ni tak, kot smo pričakovali, to ni nujno slabo. Včasih prav nepričakovan rezultat usmeri raziskavo v novo smer. Pri delu mi je najbolj všeč njegova raznolikost. Raziskovanje se začne v laboratoriju, vendar se nadaljuje v pogovorih s sodelavci, pri analizi podatkov in tudi pri delu s študenti.

Če bi moral študentom predati eno sporočilo, bi bilo to, da ni treba imeti celotne poti načrtovane vnaprej. Pomembneje je ostati radoveden, poiskati dobro okolje in vztrajati tudi takrat, ko bakterije ne sodelujejo.

Mlada raziskovalka

KATJA JAMNIK, mag. biotehnol.

Svojo študijsko pot sem začela na Biotehniški fakulteti, na kateri sem končala dodiplomski in magistrski študij biotehnologije. Pri študiju mi je bilo všeč predvsem to, da je biotehnologija zelo široko področje, ki povezuje različne organizme in pristope – od rastlin in mikroorganizmov do molekularnih metod. Skozi študij sem ugotovila, da me najbolj zanimajo rastline in predvsem procesi, ki potekajo na molekularni ravni.

Med magistrskim študijem so me posebej pritegnili viroidi. Gre za zelo majhne rastlinske patogene, ki lahko kljub svoji preprostosti povzročijo kompleksne bolezenske odzive in pomembno gospodarsko škodo. Prav njihova majhnost in zanimiv način delovanja sta bila razloga, da sem se odločila za magistrsko delo na Katedri za genetiko, biotehnologijo, statistiko in žlahtnjenje rastlin na Oddelku za agronomijo. Raziskovala sem interakcije med viroidom CBCVd in suspenzijskimi celicami hmelja. Pri tem so me poleg raziskovalnega vprašanja pritegnile tudi rastlinske tkivne kulture, saj sem tako lahko združila zanimanje za viroide z delom z rastlinskimi celicami.

Raziskovalno delo mi je bilo zelo zanimivo, zato sem se po koncu magistrskega študija odločila nadaljevati z doktorskim študijem kot mlada raziskovalka na isti katedri. Moje trenutno raziskovalno delo je usmerjeno predvsem v preučevanje vpliva virusnih okužb na male RNA v vinski trti. Zanimata me predvsem dva vidika: kako virusne okužbe vplivajo na izražanje rastlinskih mikroRNA (miRNA) in kakšna je vloga malih RNA, ki izhajajo iz virusov in jih imenujemo virusne male interferenčne RNA oziroma vsiRNA (virus-derived small interfering RNA).

Moje delo vključuje precej različne pristope. Del raziskav poteka z rastlinami, tudi z rastlinskimi tkivnimi kulturami, velik del pa predstavljajo molekularne tehnike, kot so: qPCR, priprava knjižnic in sekvenciranje malih RNA. Ker s sekvenciranjem pridobimo ogromne količine podatkov, je pomemben del raziskovanja tudi njihova analiza. Bioinformatika je bila zame ob začetku doktorskega študija precej novo področje, saj je moje predhodno delo temeljilo predvsem na laboratorijskih metodah. Sčasoma pa mi je tudi analiza podatkov postala eden zanimivejših delov raziskovanja. Danes tako del časa preživim v laboratoriju, del pa za računalnikom, kjer analiziram podatke, uporabljam različna bioinformatična orodja in pripravljam rezultate. Raziskovalno delo na naši katedri sicer ni omejeno le na moje področje. Velik del raziskav je usmerjen v



preučevanje interakcij med rastlinami in patogeni, pri čemer se ukvarjamo predvsem s hmeljem, med drugim z viroidi in glivami iz rodu *Verticillium*. Pomembni področji sta tudi žlahtnjenje rastlin in ohranjanje genskih virov. Prav ta raznolikost je ena izmed stvari, ki mi je pri delu na katedri všeč, saj se različna raziskovalna področja pogosto prepletajo. Seveda raziskovanje ni samo delo v laboratoriju. Veliko časa namenim tudi branju člankov, analizi in interpretaciji rezultatov, pisanju člankov in pripravi predstavitev. Zanimiv del so tudi konference – predvsem zato, ker lahko poleg predstavitve svojega dela spoznaš druge raziskovalce in dobiš vpogled v to, kaj se raziskuje drugje, hkrati pa obiščeš tudi kak nov kraj. Pri raziskovanju mi je všeč predvsem občutek, da se ves čas učiš nekaj novega. Ko sem začela doktorski študij, si nisem predstavljala, koliko časa bom na primer preživela z bioinformatičnimi analizami. Danes je to precej pomemben del mojega dela in nekaj, kar me tudi vedno bolj zanima. Po drugi strani pa mi je še vedno všeč laboratorijsko delo in delo z rastlinami. Prav to, da lahko pri raziskovanju združujem različna področja in pristope, je tisto, kar mi je pri njem najbolj všeč.

BŠD

Biotehnološko študentsko društvo

Biotehnologija je edinstven študij na Biotehniški fakulteti. Smo edini, ki nimamo »doma«, matičnega oddelka, na katerem bi se na enem mestu odvijala naša predavanja in vaje ter bi dobili priložnost za druženje in spoznavanje starejših in mlajših kolegov. Razpeti med Večno potjo, Jamnikarjevo ulico in Rodico smo študentje biotehnologije od nekdaj iskali način, da bi se bolje spoznali in lažje izmenjali izkušnje. Ta prizadevanja so se zlila v ustanovitev Biotehnološkega študentskega društva, na kratko BŠD, ki v svojem delovanju stremlji k dvema osnovnima ciljema.

Prvi je ustvarjanje skupnosti v najširšem pomenu besede. Verjamemo, da je za razvoj biotehnologije v Sloveniji nujno, da se študentje kot prihodnji strokovnjaki spoznajo med seboj in s trenutnimi vodilnimi raziskovalci na svojem področju. Hkrati to pripomore k razvoju profesionalnih karier študentov, še pomembneje pa je, da z grajenjem medsebojnih poznanstev ustvarjamo okolje, v katerem študentje radi prihajajo na fakulteto. S tem namenom organiziramo različne družabne dogodke, kot so pikniki in večeri družabnih iger. Njihova visoka obiskanost potrjuje, da si biotehnologi želimo medsebojnega druženja. Lotili smo se tudi izdelave biotehnoloških puloverjev, majic in »tote bagov«, ki jih pogosto opazimo na hodnikih.

Drugi cilj je ponuditi študentom možnost dodatnega izobraževanja na način, ki se razlikuje od navadnih predavanj. Ker je biotehnologija izjemno široka in interdisciplinarna, je področij, ki jih pri rednih predmetih profesorji ne uspejo obdelati, veliko. Naš namen je študentom predstaviti tudi ta področja in jim tako pomagati najti svojo »ekološko nišo« znotraj biotehnologije, torej področje, ki jih še posebej zanima.

To poslanstvo izpolnjevamo z organizacijo Dneva biotehnologije, vsakoletnega dogodka, ki se odvija v prvih tednih študijskega leta. Je največji dogodek, ki ga na Biotehniški fakulteti organizira kako študentsko društvo, ter je namenjen študentom biotehnologije in študentom mikrobiologije, živilstva in prehrane ter agronomije pa tudi drugim, ki jih zanima naše področje študija. Nanj povabimo vodilne slovenske raziskovalce iz raziskovalnih ustanov in podjetij, ki se predstavijo s 15-minutnimi predavanji. Spremlja jih bogat spremljevalni program s pogostitvijo, z glasbo in veliko priložnostmi za druženje.

Smo zagnana ekipa, ki jo sestavljajo različne generacije študentov. Najbolj smo ponosni, da se društvu priključujejo mlajše članice in mlajši člani s svežimi idejami o tem, kakšne projekte bi še lahko izvedli.

Veseli bomo tudi tvojih – pridruži se nam!

Martin Steblovnik, zastopnik društva
biotehnolosko.studentskodrustvo@gmail.com
@biotehnoloskosd (Instagram)

DŠMBS

Društvo študentov mikrobiologije Slovenije

Društvo študentov mikrobiologije Slovenije, krajše DŠMBS, je študentsko društvo, ki že od leta 1999 povezuje študente mikrobiologije na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Smo najaktivnejše študentsko oddelčno društvo na Biotehniški fakulteti. DŠMBS sestavljajo študenti člani, ki uživajo določene ugodnosti na društvenih dogodkih, ter aktivni člani, ki opravljajo upravne funkcije, skrbijo za delovanje društva in organizacijo dogodkov. V društvu je dobrodošel vsak študent mikrobiologije, ki želi sodelovati in se pridružiti čudoviti ekipi.

Cilj in namen DŠMBS je popestriti obširno življenje ter prispevati k medgeneracijskemu povezovanju študentov vseh letnikov obeh bolonjskih stopenj med seboj. Verjamemo, da je zadnje ena ključnih pozitivnih stvari, ki študentom olajšajo prvotni prehod na fakulteto in tudi celoten potek študija. Takšno mentaliteto so na nas prenesli naši starejši kolegi in verjamemo, da jo bomo tudi mi uspeli prenesti na prihodnje generacije. V okviru tega se gojita močen čut pripadnosti skupnosti in smisel za medsebojno pomoč, ki je v akademskih krogih pogosto na žalost premalo prisotna.

Svoje cilje že dolgo uspešno izpolnjevamo na več načinov. Prvi je vzdrževanje spletne baze zapiskov, ki je redno posodobljena za vse predmete z najbolj relevantno snovjo. To omogoča vsem študentom, da lažje dostopajo do uporabnih gradiv, ki so jih ustvarili starejši, ali pa naložijo svoja gradiva.

Na začetku vsakega študijskega leta organiziramo tudi tradicionalno brucevanje. Popoldansko druženje s hrano, pijačo in z glasbo, ob katerih se lahko študenti podružijo med seboj, povabljeni pa so tudi profesorji. Izveden je tudi tradicionalni krst brucev, ki obsega igre laboratorijske tematike (npr. hitrostno zlaganje nastavkov za pipete v škatle) in na koncu svečano zaprisego. Brucevanje prispeva h gojenju prej omenjene pripadnosti in k povezovanju.

Največji vsakoletni projekt DŠMBS pa je Mikrobiološka družina. Po koncu zimskega izpitnega obdobja organiziramo enodnevni mini kongres, na katerega povabimo raziskovalce iz mikrobiološke stroke. Predavatelji so z Biotehniške fakultete pa tudi iz drugih raziskovalnih ustanov, npr. Nacionalni inštitut za biologijo (NIB), Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano (NLZOH), pogosto pa se predstavljajo tudi podjetja, ki zaposlujejo mikrobiologe, npr. Novartis in Jafra. Na Mikrobiološki družini so dobrodošli vsi študentje, profesorji in drugi, ki jih zanimajo svet mikrobiologije in trenutne aktualne teme v stroki. V zadnjih letih smo dodali tudi določene zabavne elemente, npr. nagradni kviz in srečelov. Dogodek je na splošno zelo znan in ustaljen projekt, za katerega je DŠMBS v študijskem letu 2025/26 prejel tudi uradno pohvalo fakultete. V društvu menimo, da je zelo pomembno biti na tekočem z napredki in aktualnimi temami v stroki, še posebej za študente – k temu želimo prispevati z organiziranjem Mikrobiološke družine.

Vsako pomlad, preden se študentje usedemo za knjige in računalnike za potrebe poletnega izpitnega obdobja, pa organiziramo še spomladanski piknik. To je ponovna priložnost, da se med seboj podružimo in svetujemo drug drugemu.

V imenu pripadnosti vsako leto naredimo tudi svoje puloverje, katerih mikrobiološki motiv naredi nekdo izmed nas, izberemo pa ga z natečajem. Tako imamo nekaj, kar lahko obleče vsak izmed nas in kar nas še dodatno povezuje.

Tesno sodelujemo tudi z našimi starejšimi kolegi iz Slovenskega mikrobiološkega društva. Vsako leto pomagamo na njihovi stojnici na Znanstivalu Hiše eksperimentov, kjer za obiskovalce pripravimo zanimive delavnice. To vključuje: mikroskopiranje, demonstracije preprostejših kemijskih reakcij, pipetiranje, razlage o agarskih ploščah in gojenju itn.

Vsak študent mikrobiologije je več kot dobrodošel, da se pridruži aktivni ekipi in pomaga soustvarjati ustaljene projekte ali pa začne popolnoma nove. Ne nazadnje aktivno sodelovanje v študentskem društvu in nekaj projektov, ki služijo kot pokazatelj dela, lahko izgleda privlačno na življenjepisu. Vsakdo, ki ga zanimata svet mikrobiologije in dobra družba, pa je dobrodošel na naših dogodkih. V DŠMBS želimo širiti ljubezen in voljo do mikrobiologije ter znanosti na splošno. Počlašeni smo, da smo del takšne zgodbe in da lahko prispevamo k študentski izkušnji čim več ljudi.

Filip A. Pogačar, predsednik društva
mikro.info@gmail.com
@bf_dsmb (Instagram)



**Biotehnološko
Študentsko
Društvo**



**UNIVERZA
V LJUBLJANI**

BF

**Biotehniška
fakulteta**

