

UNIVERZITET U BEOGRADU
BIOLOŠKI FAKULTET

Bojana R. Kožik

**Metilacioni status *p16INK4a* i *p14ARF* tumor-
supresor gena i prisustvo mutacija *KRAS*
onkogeni u korelaciji sa odgovorom na
preoperativnu hemioradioterapiju u lokalno
uznapredovalom karcinomu rektuma čoveka**

doktorska disertacija

Beograd, 2020

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF BIOLOGY

Bojana R. Kožik

**Methylation status of *p16INK4a* and *p14ARF*
tumor-suppressor genes and mutation status
of *KRAS* oncogene in correlation with
response to preoperative chemoradiotherapy
in human locally advanced rectal carcinoma**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2020

Mentori

dr Milena Krajnović, naučni saradnik Univerziteta u Beogradu - Institut za nuklearne nauke
„Vinča“ - Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju

dr Goran Brajušković, redovni profesor Univerziteta u Beogradu - Biološkog fakulteta

Članovi komisije

dr Slavica Knežević-Ušaj, redovni profesor u penziji, Univerziteta u Novom Sadu - Medicinskog
fakulteta

Datum odbrane: _____

Ova doktorska disertacija urađena je u Laboratoriji za radiobiologiju i molekularnu genetiku Univerziteta u Beogradu - Instituta za nuklearne nauke „Vinča“ - Instituta od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, kao deo projekta „Molekularne determinante za dizajn tumor markera“ (OI 173049) čiji je rukovodilac bila dr Vesna Mandušić, viši naučni saradnik, a pod neposrednim rukovodstvom dr Milene Krajnović, naučnog saradnika. Projekat je bio finasiran od strane Ministarstva za prosvetu, nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije do kraja 2019. godine, a od početka 2020. godine od Univerziteta u Beogradu - Institut za nuklearne nauke „Vinča“ - Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju (07035250). Doktorska disertacija rezultat je saradnje Laboratorije za radiobiologiju i molekularnu genetiku i Univerziteta u Novom Sadu - Medicinskog fakulteta odnosno, Instituta za onkologiju Vojvodine - Sremska Kamenica i Univerziteta u Beogradu - Medicinskog fakulteta - Instituta za mikrobiologiju i imunologiju.

Najveću zahvalnost dugujem svom mentoru dr Mileni Krajnović, na nesebičnoj pomoći koju mi je pružila još u prvim koracima mog eksperimentalnog i naučnog rada. Zahvaljujem joj se na neizmernom strpljenju, razumevanju i podršci, stručnim i prijateljskim savetima kako u svakodnevnom radu, tako i tokom izrade i pisanja doktorske disertacije.

Veliku zahvalnost dugujem i svom profesoru i komentoru, prof. dr Goranu Brajuškoviću, na razumevanju, podršci i korisnim savetima kako tokom studija, tako i prilikom izrade doktorske teze.

Zahvaljujem se i prof. dr Slavici Knežević-Ušaj, članu komisije, na profesionalnoj saradnji, korektnom odnosu i korisnim sugestijama prilikom izrade teze.

Iskreno se zahvaljujem svim kolegama iz Laboratorije za radiobiologiju i molekularnu genetiku Instituta za nuklearne nauke „Vinča“ na podršci i prijateljskoj atmosferi, a posebno dr Snežani Jovanović Čupić i dr Ani Božović, na svakodnevnoj podršci, nesebičnoj pomoći i višegodišnjem iskazanom prijateljstvu. Želela bih da se zahvalim i kolegi Nikoli Kokanov, master molekularni biolog, na praktičnoj pomoći prilikom izrade eksperimentalnog dela teze i prijateljskoj podršci, kao i kolegi dr Bobanu Stanojeviću za obezbeđivanje hemikalija za mutacione analize.

Zahvaljujem se i prof. dr Maji Stanojević i njenim saradnicama sa Instituta za mikrobiologiju i imunologiju, Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu, na saradnji prilikom sekvenciranja uzoraka i interpretacije rezultata, kao i prof. dr Ivanu Nikoliću sa Instituta za onkologiju Vojvodine, Sremska Kamenica, na pomoći i ažurnosti prilikom prikupljanja podataka o ispitanicima.

I iznad svega, zahvaljujem se svojoj porodici na beskrajnoj podršci, ljubavi i razumevanju.

Ovu doktorsku disertaciju posvećujem dedi Andriji, znam da bi bio ponosan.

Metilacioni status p16INK4a i p14ARF tumor-supresor gena i prisustvo mutacija KRAS onkogeni u korelaciji sa odgovorom na preoperativnu hemioradioterapiju u lokalno uznapredovalom karcinomu rektuma čoveka

Sažetak

Karcinom rektuma (KR) čini oko 30% svih slučajeva kolorektalnih karcinoma (KRC), koji se u zadnje vreme proučava kao zaseban klinički entitet. Aktuelan terapijski pristup u lečenju lokalno uznapredovalih stadijuma KR podrazumeva primenu preoperativne hemioradioterapije (HRT), nakon koje sledi hirurško uklanjanje tumora. Iako se ovim tretmanom postiže bolja lokalna kontrola bolesti, individualni odgovor na primenjenu terapiju je varijabilan i ukazuje na značajnu biološku heterogenost tumora u okviru istog kliničkog stadijuma. Stoga je u cilju kreiranja i primene personalizovane terapije neophodno definisati prediktivne i prognostičke molekularne parametre. Primenom PCR metode specifične za metilaciju (MSP), ispitivan je metilacioni status gena *p16INK4a* i *p14ARF*, dok je automatskim sekvenciranjem analiziran mutacioni status gena *KRAS* u pre-tretmanskim biopsijama tumorskog tkiva obolelih od KR u lokalno uznapredovalom stadijumu, kao bi se utvrdio njihov potencijalni prediktivni i prognostički značaj. Rezultati ove studije su pokazali da ispitivane promene u genima *p16INK4a*, *p14ARF* i *KRAS* pojedinačno gledano, nisu značajni prediktivni i prognostički faktori kod obolelih od KR, mada je istovremeno prisustvo metilacije gena *p14ARF* i mutacije gena *KRAS* povezano sa agresivnijim ponašanjem tumora, dok je istovremeno prisustvo izmena u sva tri ispitivana gena povezano sa kraćim ukupnim preživljavanjem. Međutim, kombinovane analize genetičkih, epigenetičkih i imunohistohemijskih parametara (EGFR, VEGF, Bcl-2 i Ki-67), mogu imati klinički značaj u identifikaciji podgrupa obolelih, koje se međusobno razlikuju kako prema odgovoru na HRT, tako i prema toku i ishodu bolesti.

Ključne reči: karcinom rektuma (KR), preoperativna hemioradioterapija (HRT), metilacija, mutacija, *p16INK4a*, *p14ARF*, *KRAS*

Naučna oblast: Biologija

Uža naučna oblast: Biohemija i molekularna biologija

Methylation status of p16INK4a and p14ARF tumor-suppressor genes and mutation status of KRAS oncogene in correlation with response to preoperative chemoradiotherapy in human locally advanced rectal carcinoma

Abstract

Rectal carcinoma (RC) represents approximately 30% cases of colorectal carcinomas (CRC), which is nowadays studied as a distinct clinical entity. The current management of locally advanced rectal carcinoma involves neoadjuvant chemoradiotherapy (CRT) prior to surgery. Despite improved local control rate, individual patient response to CRT is variable and may reflect heterogeneous biological properties among tumors of the same clinical stage. So, there is utility to define predictive and prognostic molecular parameters of response and to personalize therapeutic approach. Methylation-specific polymerase chain reaction (MSP) was used to examine *p16INK4a* and *p14ARF* methylation status, while *KRAS* mutation status was analyzed by direct sequencing in pretreatment tumor biopsies of patients with locally advanced RC, in order to evaluate its potential predictive and/or prognostic role. According to the results of this study, examined molecular changes of *p16INK4a*, *p14ARF* and *KRAS* genes, considering separately, were not proven to be significant predictive and prognostic factors in RC patients, although simultaneous presence of *p14ARF* methylation and *KRAS* mutation was associated with more aggressive tumor behavior, while concurrent presence of genetic/epigenetic alteration in all three examined genes was correlated with shorter overall survival. However, combined analyses of genetic, epigenetic and immunohistochemical parameters (EGFR, VEGF, Bcl-2 and Ki-67), could have important clinical relevance in identification of RC patients subgroups, with distinct pattern of response to CRT and disease outcome.

Keywords: Rectal Carcinoma (RC), Preoperative Chemoradiotherapy (CRT), Methylation, Mutation, *p16INK4a*, *p14ARF*, *KRAS*

Scientific field: Biology

Special topic: Biochemistry and Molecular Biology

SKRAĆENICE

AJCC, Američki združeni komitet za rak (eng. *American Joint Committee on Cancer, AJCC*)

ARF, alternativni okvir čitanja (eng. *Alternate Reading Frame, ARF*)

APC, tumor-supresorski protein (eng. *APC Regulator of WNT Signaling Pathway, APC*)

Bcl-2, B-ćelijski limfom 2 (eng. *B-Cell CLL/Lymphoma 2, BCL2*)

BMI indeks, indeks telesne mase (eng. *Body Mass Index, BMI*)

BSA, albumin govedeg seruma (eng. *Bovine Serum Albumin, BSA*)

CDK, ciklin-zavisna kinaza (eng. *Cyclin-Dependent Kinase, CDK*)

CIMP, CpG metilator fenotip (eng. *CpG Island Methylator Phenotype, CIMP*)

CIN, hromozomska nestabilnost (eng. *Chromosome Instability, CIN*)

CpG, citozin-pirofosfat-guanin (eng. *Cytosine-pyrophosphate-Guanine, CpG*)

ddH₂O, dejonizovana destilovana voda (eng. *Deionized Distilled Water, ddH₂O*)

DFS, vremenski period bez ikakvih znakova i simptoma bolesti (eng. *Disease-Free Survival, DFS*)

DMSO, dimetil sulfoksid (eng. *Dimethyl Sulfoxide, DMSO*)

DNK, dezoksiribonukleinska kiselina (eng. *Deoxyribonucleic Acid, DNA*)

DNMT, DNK-metiltransferaza (eng. *DNA-Methyltransferase, DNMT*)

EDTA, etilendiaminotetrasirćetna kiselina (eng. *Ethylenediaminetetraacetic Acid, EDTA*)

EGFR, receptor za epidermalni faktor rasta (eng. *Epidermal Growth Factor Receptor, EGFR*)

EMR, elektromagnetna-rezonanca (eng. *Magnetic Resonance Imaging, MRI*)

EMT, epitelno-mezenhimska tranzicija (eng. *Epithelial-Mesenchymal Transition, EMT*)

E2F, familija transkripcionih regulatora kod viših eukariota (eng. *Family of Transcription Factors in Higher Eukaryotes, E2F*)

EtOH, etanol (eng. *Ethyl alcohol, EtOH*)

FAP, familijarna adenomatозна polipoza (eng. *Familial Adenomatous Polyposis, FAP*)

GAP, aktivirajući protein GTP-azne aktivnosti (eng. *GTPase-Activating Proteins*)

GDP, guanin difosfat (eng. *Guanosine Diphosphate, GDP*)

GEF, faktor razmene guanin-nukleotida (eng. *Guanine Nucleotide Exchange Factors, GEF*)

GLOBOCAN, Globalna opservatorija za rak (eng. *Global Cancer Observatory, GLOBOCAN*)

GTP, guanin trifosfat (eng. *Guanosine Triphosphate, GDP*)

HDAC, histondeacetilaza (eng. *Hystone Deacetylase, HDAC*)

HDM2, E3 ubikvitin-protein ligaza (eng. *Human Double Minute 2, HDM2*)

HIF-1 α , hipoksija-inducibilni faktor 1 α (eng. *Hypoxia-Inducible Factor 1-Alpha, HIF-1 α*)

hMLH1, protein za reparaciju pogrešno sparenih nukleotida (eng. *Human MutL Homolog 1, hMLH1*)

HNPCC, nasledni nepolipozni kolorektalni karcinom (eng. *Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer, HNPCC*)

HRAS, podfamilija proteina RAS (eng. *Harvey Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog, HRAS*)

HRT, hemioradioterapija (eng. *Chemoradiotherapy, CRT*)

INK4, familija inhibitora ciklin-zavisne kinaze CDK4 (eng. *Inhibitors of Cyclin-Dependent Kinase, CDK4*)

JAK, tirozin kinaza (eng. *Janus Kinase, JAK*)

JPS, Juvenilna polipoza (eng. *Juvenile Polyposis Syndrome, JPS*)

KMP, konzesusni molekularni podtip (eng. *Consensus Molecular Subtype, CMS*)

KO, kompletan odgovor (eng. *Complete Response, CR*)

kPO, kompletan patološki odgovor (eng. *Pathological Complete Response, pCR*)

KR, karcinom rektuma (eng. *Rectal Carcinoma, RC*)

KRAS, podfamilija proteina RAS (eng. *Kirsten Rat Sarcoma 2 Viral Oncogene Homolog, KRAS*)

KRK, kolorektalni karcinom (eng. *Colorectal Carcinoma, CRC*)

LOH, gubitak heterozigotnosti (eng. *Loss of Heterozygosity, LOH*)

m, metilovan (eng. *methylated, m*)

MAP, polipoza asocirana sa genom *MUTYH* (eng. *MUTYH Associated Polyposis, MAP*)

MAPK, mitogenom-aktivirane proteinske kinaze (eng. *Mitogen-Activated Protein Kinase, MAPK*)

MBP, metil-vezujući protein (eng. *Methyl Binding Protein, MBP*)

MBD, protein MBD (eng. *Methyl-CpG-Binding Domain Protein, MBD*)

5mC, 5-metil citozin (eng. *5-methyl Cytosine, 5mC*)

MeCP, metil CpG vezujući proteini (eng. *Methyl CpG Binding Proteins MeCP*)

MGMT, O⁶-metilguanin-DNK-metiltransferaza (eng. *O⁶-methylguanine-DNA Methyltransferase, MGMT*)

MMR, mehanizam reparacije pogrešno sparenih nukleotida (eng. *Mismatch Repair, MMR*)

MSI, mikrosatelitska nestabilnost (eng. *Microsatellite Instability, MSI*)

MSI-H, visok nivo mikrosatelitske nestabilnosti (eng. *Microsatellite Instability-High, MSI-H*)

MSP, reakcija lančane polimeraze specifična za metilaciju (eng. *Methylation Specific Polymerase Chain Reaction, MSP*)

MSS, mikrosatelitski stabilni (eng. *Microsatellite Stable, MSS*)

NCI, Nacionalni institut za rak (eng. *National Cancer Institute*)

ND, podatak nije dostupan (eng. *Not Determined, ND*)

NL, neizmenjeni limfociti (eng. *Normal Lymphocytes, NL*)

NRAS, podfamilija proteina RAS (eng. *Neuroblastoma RAS Viral Oncogene Homolog, NRAS*)

OD, optička gustina (eng. *Optical Density, OD*)

PAA, poliakrilamid (eng. *Polyacrylamide, PAA*)

PB, progresija bolesti (eng. *Progressive Disease, PD*)

PCR, reakcija lančane polimeraze (eng. *Polymerase Chain Reaction, PCR*)

PHTS, PTEN hamartoma tumorski sindrom (eng. *PTEN Hamartoma Tumor Syndrome, PHTS*)

PI3K, fosfatidilinozitol 3-kinaza (eng. *Phosphoinositide 3-Kinase, PI3K*)

PLC, fosfolipaza C (eng. *Phospholipase C, PLC*)

PJS, Pojc-Jegersov sindrom (eng. *Peutz-Jeghers, PJS*)

PK, pozitivna kontrola (eng. *Positive Control, PC*)

PKC, protein kinaza C (eng. *Protein Kinase C, PKC*)

PO, parcijalni odgovor (eng. *Partal Response, PR*)

Rb, retinoblastoma (eng. *Retinoblastoma, Rb*)

RNK, ribonukleinska kiselina (eng. *Ribonucleic Acid, RNA*)

SAM, S-adenozil-L-metionin (eng. *S-Adenosyl-L-Methionine, SAM*)

SS, stacionarno stanje (eng. *Stable Disease, SD*)

SCNA, somatske izmene varijacija u broju kopija (eng. *Somatic Copy Number Alteration, SCNA*)

St, standard (eng. *Molecular Weight Marker, Mw*)

STAT, transkripcioni regulatorni proteini (eng. *The Signal Transducer and Activator of Transcription, STAT*)

TGF-β, tkivni faktor rasta β (eng. *Tissue Growth Factor β, TGF-β*)

TEMED, tetrametiletilendiamin (eng. *Tetramethylethylenediamine, TEMED*)

TIMP3, tkivni inhibitor metaloproteinaza 3 (eng. *Tissue Inhibitor of Metalloproteinases-3, TIMP3*)

TNM, sistem klasifikacije za određivanje stadijuma kolorektalnih karcinoma (eng. *The Tumor, Node, Metastasis staging system, TNM*)

TRG, stepen regresije tumora (eng. *Tumor Regression Grade, TRG*)

TRIS, tris hidroksimetil aminometan (eng. *Tris Hydroxymethyl Aminomethane, TRIS*)

TS, timidilat sintaza (eng. *Thymidylate Synthase, TS*)

TSS, mesto početka transkripcije (eng. *Trancription Start Site, TSS*)

VEGF, vaskularni endotelni faktor rasta (eng. *Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF*)

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Kolorektalni karcinom.....	1
1.1.1. Etiologija kolorektalnog karcinoma	1
1.1.2. Epidemiologija kolorektalnog karcinoma	2
1.1.3. Faktori rizika za nastanak kolorektalnog karcinoma.....	2
1.2. Molekularna patogeneza kolorektalnog karcinoma	3
1.2.1. Supresorski ili tradicionalni put kancerogeneze.....	4
1.2.2. Mutatorski put kolorektalne kancerogeneze.....	4
1.2.3. Metilatorski put kolorektalne kancerogeneze.....	5
1.2.4. Klasifikacija kolorektalnih karcinoma prema molekularnim karakteristikama	6
1.3. Metilacija molekula DNK	7
1.3.1. Mehanizam metilacije molekula DNK i njena uloga u regulaciji transkripcije	7
1.3.2. Uloga metilacije molekula DNK u kancerogenezi.....	9
1.4. Karcinom rektuma.....	9
1.4.1. Gen <i>p16INK4a</i>	10
1.4.2. Gen <i>p14ARF</i>	12
1.4.3. Gen <i>KRAS</i>	13
1.5. Terapijski pristup u lečenju karcinoma rektuma	14
1.6. Prediktivni faktori tumorskog odgovora na preoperativnu HRT	15
1.6.1 EGFR kao prognostički i prediktivni marker kod obolelih od karcinoma rektuma.....	16
1.6.2.VEGF kao prognostički i prediktivni marker kod obolelih od karcinoma rektuma.....	16
1.6.3. Bcl-2 kao prognostički i prediktivni marker kod obolelih od karcinoma rektuma	16
1.6.4. Ki-67 kao prognostički i prediktivni marker kod obolelih od karcinoma rektuma.....	17
1.7. Potencijalni klinički značaj gena <i>p16INK4a</i> , <i>p14ARF</i> i <i>KRAS</i> u karcinomu rektuma	17
2. CILJ RADA	19
3. MATERIJAL I METODE	20

3.1. Materijal	20
3.1.1. Pacijenti i uzorci tkiva	20
3.1.3. Kontrolni uzorci	23
3.2. Metode	23
3.2.1. Izolacija genomske DNK	24
3.2.1.1. Izolacija genomske DNK iz parafinskih isečaka tkiva	24
3.2.1.2. Izolacija genomske DNK iz limfocita periferne krvi	25
3.2.1.3. Određivanje koncentracije izolovane genomske DNK	25
3.2.2. <i>In vitro</i> metilacija molekula DNK izolovane iz limfocita periferne krvi	25
3.2.3. Bisulfitna modifikacija izolovane DNK	25
3.2.4. Amplifikacija molekula DNK MSP tehnikom	26
3.2.5. Amplifikacija regiona egzona 2 gena <i>KRAS</i>	27
3.2.6. Utvrđivanje mutacionog statusa gena <i>KRAS</i> automatskim sekvenciranjem Sangerovom metodom	28
3.2.7. Analiza uspešnosti i specifičnosti PCR reakcija metodom gel-elektroforeze	28
3.2.7.1. Elektroforeza na agaroznom gelu	28
3.2.7.2. Elektroforeza na poliakrilamidnom gelu	29
3.2.8. Statistička obrada rezultata	30
4. REZULTATI	31
4.1. Analiza kliničko-patoloških karakteristika bolesnika sa karcinomom rektuma	31
4.2. Ispitivanje metilacionog statusa gena <i>p16INK4a</i> i <i>p14ARF</i> u uzorcima tkiva karcinoma rektuma	31
4.2.1. Ispitivanje povezanosti metilacionog statusa gena <i>p16INK4a</i> i <i>p14ARF</i> sa kliničko-patološkim i imunohistohemijskim karakteristikama obolelih	33
4.2.2. Ispitivanje povezanosti metilacionog statusa gena <i>p16INK4a</i> i <i>p14ARF</i> sa odgovorom na preoperativnu hemioradioterapiju, tokom i ishodom bolesti	34
4.3. Ispitivanje mutacionog statusa gena <i>KRAS</i> u uzorcima tkiva karcinoma rektuma	37
4.3.1. Ispitivanje povezanosti mutacionog statusa gena <i>KRAS</i> sa kliničko-patološkim i imunohistohemijskim karakteristikama obolelih od KR	39

4.3.2. Ispitivanje povezanosti mutacionog statusa gena <i>KRAS</i> sa odgovorom na preoperativnu hemioradioterapiju, tokom i ishodom bolesti.....	41
4.4. Povezanost metilacije gena <i>p16INK4a</i> i <i>p14ARF</i> sa mutacijama u genu <i>KRAS</i>	43
4.4.1. Povezanost istovremenog prisustva metilacije gena <i>p16INK4a</i> i mutacije gena <i>KRAS</i> sa kliničko-patološkim i imunohistohemijskim parametrima obolelih od KR.....	44
4.4.2. Povezanost istovremenog prisustva metilacije gena <i>p14ARF</i> i mutacije gena <i>KRAS</i> sa kliničko-patološkim i imunohistohemijskim parametrima obolelih od KR.....	46
4.4.3. Povezanost istovremenog prisustva epigenetičkih i genetičkih promena sa kliničko-patološkim i imunohistohemijskim parametrima obolelih od KR.....	48
4.5. Analiza preživljavanja bolesnika sa KR.....	48
5. DISKUSIJA	52
6. ZAKLJUČCI	63
7. LITERATURA	65
8. PRILOZI	87
Prilog 1.	87
Prilog 2.	89
Prilog 3.	91
Prilog 4.	93
STRUČNA BIOGRAFIJA	95

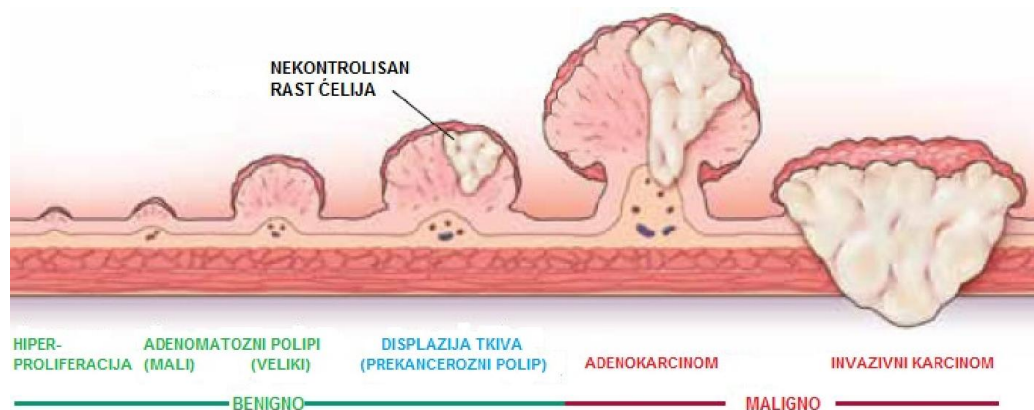
1. UVOD

1.1. Kolorektalni karcinom

Intezivna istraživanja molekularne patogeneze tumora čoveka u poslednje tri decenije, nedvosmisleno pokazuju da u osnovi etiologije malignih oboljenja leže kako genetičke, tako i epigenetičke promene (Esteller i Herman, 2002, Colussi i sar., 2013). Tipičan model sinergističkog delovanja navedenih molekularnih promena uočava se tokom kolorektalne kancerogeneze i to na svakom stupnju progresije tumora, od ranih benignih lezija ka uznapredovalim malignim stadijumima (Baylin i sar., 2001). Kolorektalni karcinom (KRK) je trenutno na drugom mestu kao uzročnik smrtnosti od malignih bolesti u svetu i njegova učestalost je u stalnom porastu, pogotovo u razvijenijim zemljama (Rawla i sar., 2019). Ovaj tip tumora zapravo predstavlja skup oboljenja sa različitim kliničkim manifestacijama, u čijoj osnovi leži izrazita heterogenost na molekularnom nivou (Sadanandam i sar., 2013, Zhang i sar., 2014, Guinney i sar., 2015). Uznapredovale stadijume KRK odlikuje značajna hemiorezistentnost i visok stepen pojave recidiva, tako da aktuelni terapijski pristupi nisu dovoljno efikasni (Colussi i sar., 2013, Kekelidze i sar., 2013). Do danas nije pronađen odgovarajući model koji bi predvideo odgovor obolelih na primenjenu terapiju. Karcinom kolona i karcinom rektuma se najčešće proučavaju kao jedan klinički entitet, iako je pokazano da se ovi tumori debelog creva značajno razlikuju, kako prema etiologiji i tretmanu bolesti, tako i prema tipu molekularnih događaja uključenih u sam proces kancerogeneze (Kapitejn i sar., 2001, Carethers, 2011, Schmoll i sar., 2012). Zbog toga je neophodno ispitati ulogu određenih molekularnih promena u patogenezi karcinoma rektuma (KR), sa ciljem definisanja pouzdanih prediktivnih i prognostičkih parametara.

1.1.1. Etiologija kolorektalnog karcinoma

U osnovi etiologije kolorektalnog karcinoma leži neoplastična transformacija epitelnih ćelija mukoze kolona i/ili rektuma, dve glavne anatomske strukture koje čine debelo crevo. U većini slučajeva KRK se sporo i postepeno razvija, tokom perioda od 10 - 15 godina (Stryker i sar., 1987, Stewart i sar., 2006). Prema modelu „adenom - karcinom sekvence” (Slika 1.1) koju su prvi put predložili Muto i saradnici 1975. godine, najpre se u zonama intezivne proliferacije epitelnih ćelija debelog creva formira adenomatozni polip, koji potiče od žlezdanih ćelija koje luče mukus (Stryker i sar., 1987). Vremenom tokom rasta polipa dolazi do displazije epitela na njegovoj površini. Displazija najvećeg stepena označava se kao karcinom *in situ*, i zapravo predstavlja prelazni stadijum od benignog adenoma ka invazivnom karcinomu (O'Brien i sar., 1990). Invazivnu fazu kancerogeneze odlikuje prodiranje ćelija kancera u dublje slojeve zida debelog creva, a zatim širenje malignih ćelija u regionalne limfne čvorove i udaljene organe putem krvnih i limfnih sudova, pri čemu nastaju metastaze (Vogelstein i sar., 1988). Kolorektalni karcinom koji nastaje od adenomatoznog polipa se naziva adenokarcinom i procentualno je najzastupljeniji (96%) među svim histološkim tipovima KRK (Stewart i sar., 2006).



Slika 1.1. Progresija KRK od adenomatoznih polipa do karcinoma (Modifikovano iz Davis i Lahiri, 2015)

1.1.2. Epidemiologija kolorektalnog karcinoma

Prema podacima iz GLOBOCAN 2018 baze podataka (eng. *Global Cancer Observatory*), kolorektalni karcinom je treći najčešći tip tumora, a gledano pojedinačno, karcinom kolona se nalazi na četvrtom, dok je karcinom rektuma na osmom mestu po učestalosti u svetu (Bray i sar., 2018). Kolorektalni karcinom se češće javlja kod muškaraca nego kod žena, a naročito visoka učestalost primećena je u ekonomski razvijenim zemljama. Karcinom kolona se najčešće javlja u severnim i južnim delovima Evrope, u Australiji sa Novim Zelandom i SAD, dok je visoka incidenca karcinoma rektuma pored SAD i Australije sa Novim Zelandom, karakteristična i za istočne regione Evrope i Azije. Što se tiče mortaliteta, KRK se nalazi na drugom mestu kao uzročnik smrtnosti od malignih bolesti u svetu, sa oko 881 000 smrtnih slučajeva tokom 2018-te godine (Rawla i sar., 2019). Zasebno posmatrano, karcinom kololona je na petom mestu kao uzročnik smrtnosti, a karcinom rektuma deseti najčešći uzročnik smrti od malignih oboljenja (Rawla i sar., 2019).

1.1.3. Faktori rizika za nastanak kolorektalnog karcinoma

U najvećem broju slučajeva (oko 80%) kolorektalni karcinom nastaje sporadično, pri čemu se dijagnoza najčešće uspostavlja kod simptomatskih bolesnika preko 50 godina starosti (Nikolić, 2011). Starost i pol obolelih, kao i interakcija genetičkih i sredinskih faktora u najvećoj meri utiču na pojavu i razvoj kolorektalnog karcinoma. Utvrđene su asocijacije kolorektalnog karcinoma sa određenim etničkim grupacijama (afro-američka populacija), kao i sa određenim životnim navikama i tipom ishrane (Thanikachalam i Khan, 2019). Pojedina oboljenja, kao što su inflamatorne bolesti creva (ulcerozni kolitis i Kronova bolest), akromegalija, transplatacija bubrega uz upotrebu imunosupresivne terapije, šećerna bolest i insulinska rezistencija, predstavljaju dodatne faktore rizika za razvoj karcinoma debelog creva (Amersi i sar., 2005). Detaljnije epidemiološke studije su pokazale da pojedini faktori rizika različito utiču na nastanak karcinoma kolona, odnosno rektuma (Fazeli i Keramati, 2015). Značajno povišen rizik za nastanak karcinoma kolona uočen je u populaciji sa izraženom visinom, dok se visoke vrednosti BMI indeksa (eng. *Body Mass Index*) kod žena povezuju sa povišenim rizikom za nastanak karcinoma rektuma (Wei i sar., 2004). Nedostatak fizičke aktivnosti, povećan unos crvenog mesa i mesnih prerađevina u ishrani, kao i konzumacija alkohola u većoj meri utiče na pojavu karcinoma kolona nego rektuma, dok upotreba duvana ima neznatno veći uticaj na nastanak karcinoma rektuma (Terry i sar., 2002, Wei i sar., 2004).

Svega 7-10% slučajeva kolorektalnih karcinoma ima naslednu osnovu, odnosno postoji familijarna predispozicija za nastanak KRK (De Rosa i sar., 2015). Najčešći nasledni sindrom je nepolipozni kolorektalni karcinom - HNPCC (eng. *Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer*) ili Linčov (eng. *Lynch*) sindrom, koji predstavlja 2-4% svih slučajeva KRK i nastaje usled mutacije u nekom od gena iz MMR sistema (eng. *Mismatch Repair*) za reparaciju oštećenja u molekulu DNK (Kerber i sar., 2005, Bonadona i sar., 2011). Ovaj sindrom odlikuje dominantan obrazac nasleđivanja, a kod osoba sa naslednom mutacijom uočen je za 20% povišen rizik za nastanak KRK do 50-te godine života. Drugi najčešći nasledni oblik (manje od 1% svih slučajeva) kolorektalnog karcinoma predstavlja familijarna adenomatozna polipoza - FAP (eng. *Familial Adenomatous Polyposis*), koji nastaje usled nasledne mutacije u genu *APC* (eng. *APC Regulator of WNT Signaling Pathway*, *APC*) sa tumor-supresorskom funkcijom. Ovo stanje odlikuje intezivna proliferativnost ćelija mukoze crevnog epitela i nastanak mnogobrojnih polipa što uvećava šansu do 100% za razvoj kolorektalnog karcinoma do 40-te godine života (Ricciardiello i sar., 2016). MAP sindrom je takođe nasledna adenomatozna polipoza, koja je asocirana sa mutacijama u genu *MUTYH* (eng. *MutY DNA Glycosylase*, *MUTYH*), koji kodira enzim endonukleazu za reparaciju oštećenja u molekulu DNK. Ovaj oblik nasledne polipoze nije u potpunosti klinički definisan i ne podrazumeva obavezno i nastanak velikog broja polipa kao kod FAP (Poulsen i Bisgaard, 2008). Postoje i retka nasledna stanja sa takozvanim hamartomatoznim polipima, kao što su Pojc-Jegersov sindrom PJS (eng. *Peutz-Jeghers*), Juvenilna polipoza (JPS) i PTEN hamartoma tumorski sindrom (PHTS), koje odlikuje autozomno dominantno nasleđivanje, dok polipi prvobitno nastaju u dubljem sloju *laminae propriae* i dalje se šire ka gornjim slojevima epitela debelog creva (Calva i Howe, 2008).

Bez obzira da li je utvrđena familijarna nasledna predispozicija, studije su pokazale da je za 20% uvećan rizik za pojavu KRK kod osoba čiji je jedan ili više članova porodice u prvom stepenu srodstva oboleo od kolorektalnog karcinoma (Thanikachalam i Khan, 2019). Međutim, ukoliko postoji pozitivna porodična istorija KRK, veća je verovatnoća za nastanak karcinoma kolona, nego karcinoma rektuma (Wei i sar., 2004).

1.2. Molekularna patogeneza kolorektalnog karcinoma

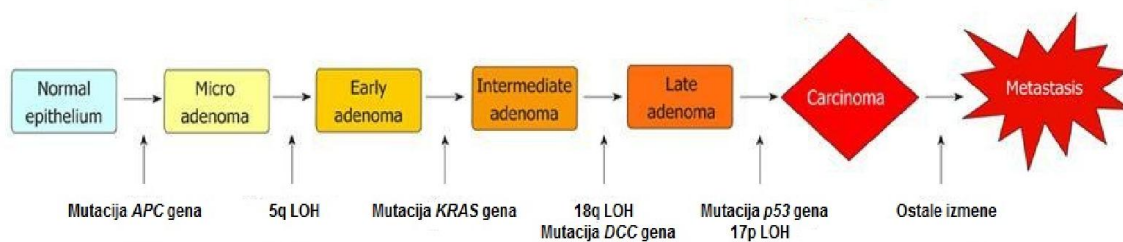
Kolorektalna kancerogeneza je višestepeni proces tokom kojeg dolazi do progresivne akumulacije brojnih genetičkih i epigenetičkih promena (Ng i Yu, 2015). Ne postoji univerzalni model patogeneze za sve karcinome debelog creva, već ovi tumori mogu da se razviju preko nekoliko predloženih puteva, od kojih svaki uključuje različitu kombinaciju molekularnih promena (Yashiro i sar., 2001).

Najčešće detektovane genetičke alteracije kod karcinoma debelog creva su tačkaste mutacije, delecije, amplifikacije i rearanžmani specifičnih gena (Grizzle i sar., 1999). Podjednako važnu ulogu u nastanku i progresiji KRK imaju i epigenetičke promene, koje se definišu kao nasledne promene u ekspresiji gena, koje nisu posledica izmene u primarnoj sekvenci DNK (Sharma i sar., 2010). Epigenetičke promene kod tumora nastaju različitim mehanizmima koji uključuju metilaciju molekula DNK i postranslacione kovalentne modifikacije N-krajeva histonskih proteina. Značajnu ulogu u epigenetičkim mehanizmima regulacije ekspresije gena imaju duge nekodirajuće RNK, kao i promene u mehanizmima pozicioniranja nukleozoma od strane kompleksa za remodelovanje nukleozoma (Sharma i sar., 2010). Najbitniji događaji koji vode ka razvoju malignog fenotipa su aktivacija proto-onkogena i inaktivacija tumor-supresornih gena koji kontrolišu rast i proliferaciju ćelija epitela kolona i rektuma. Akumulacijom različitih molekularnih alteracija u navedenim genima nastaje genomska nestabilnost (Goel i sar., 2003). U zavisnosti od

toga koji tip genomske nestabilnosti je prisutan u tumorskim ćelijama, hromozomska nestabilnost - CIN (eng. *Chromosome Instability*, CIN), mikrosatelitska nestabilnost - MSI (eng. *Microsatellite Instability*, MSI) ili epigenetička nestabilnost, definisani su različiti molekularni putevi kancerogeneze KRK, na osnovu kojih su tumori debelog creva klasifikovani u različite molekularne podtipove (Inamura, 2018).

1.2.1. Supresorski ili tradicionalni put kancerogeneze

Prema modelu koji su predložili Vogelstein i saradnici 1988. godine, kolorektalna neoplazija se javlja nakon serije molekularnih alteracija koje podrazumevaju gubljenje ili amplifikaciju hromozoma, aneuploidiju, translokacije i gubitak heterozigotnosti - LOH (eng. *Loss of Heterozygosity*, LOH). Navedene promene opisuju nastanak hromozomski-nestabilnih tumora preko „adenom-karcinom” sekvence, najčešće usled rearnžmana u okviru hromozomskih regiona 5q, 8p, 17p i 18q. Hromozomska nestabilnost je prisutna u najvećem broju slučajeva KRK (75-85%) (Ciszyk i sar., 2015), najčešće kod tumora lokalizovanih u distalnom delu kolona (Grady i Carethers, 2014). Mehanizam njenog nastanka nije u potpunosti objašnjen, ali se pretpostavlja da bitnu ulogu imaju procesi kao što su nepravilna segregacija hromozoma, disfunkcija telomera ili izmene u mehanizmima za reparaciju molekula DNK (Grady i Carethers, 2014). Konvencionalni „adenom-karcinom” put (Slika 1.2) započinje inaktivacijom gena *APC* kojom se inicira nastanak adenoma. (Fearon i Vogelstein, 1990). Mutacije u proto-onkogenu *KRAS* (eng. *KRAS Proto-oncogene, GTPase*; *KRAS*) takođe se smatraju ranim događajem u „adenom-karcinom” putu, dok se u kasnijim fazama kancerogeneze kod 50% uznapredovalih tumora detektuje inaktivacija gena *TP53* (eng. *Tumor Protein p53*, *TP53*), koji se označava kao „glavni čuvar genoma” s obzirom da ima važnu ulogu u pokretanju ćelijskog odgovora na stres koji ćelija registruje akumulacijom oštećenja u molekulu DNK (Lane, 1992).



Slika 1.2. Supresorski put kancerogeneze (Modifikovano iz Morán i sar., 2010)

1.2.2. Mutatorski put kolorektalne kancerogeneze

Kolorektalni karcinom može da se razvije i iz posebnog tipa hiperplastičnih polipa za koje se dugo smatralo da predstavljaju benigne promene mukoze debelog creva (Aust i Baretton, 2010). Ove lezije imaju maligni potencijal, a ukoliko dođe do odgovarajućih genetičkih i/ili epigenetičkih promena, karcinom se razvija mnogo brže nego konvencionalnim „adenom-karcinom” putem. Ovim putem sporadično nastaju kolorektalni karcinomi sa proksimalnom lokalizacijom, koje odlikuju posebne molekularne karakteristike, pre svega prisustvo mikrosatelitske nestabilnosti (MSI), CIMP fenotipa (eng. *CpG Island Methylator Phenotype*) i mutacije V600E u genu *BRAF* (eng. *B-RAF Protooncogene, Serine/Threonine Kinase*, *BRAF*), dok su mutacije u genima *APC* i *TP53* ređe zabeleženi događaji (Dahlin i sar., 2010, Inamura, 2018). Mikrosatelitska nestabilnost genoma nastaje usled mutacije i inaktivacije nekog od seta gena čiji su proteinski produkti odgovorni za postreplikativnu ispravku pogrešno sparenih nukleotida, tj. gena MMR sistema (eng. *DNA*

Mismatch Repair, MMR) (Jascur i Boland, 2006), što za posledicu ima akumulaciju mutacija u mikrosatelitskim repetitivnim sekvencama, u okviru kojih dolazi do delecije ili insercija nukleotida (Iino i sar., 2000). Prema statusu mikrosatelitskih markera iz panela od pet markera: marker BAT26 u genu *MLH1* (eng. *DNA Mismatch Repair Protein*, *MLH1*); marker BAT25 u genu *MSH2* (eng. *MutS, E. Coli, Homolog of 2*, *MSH2*); marker D5S346 u genu *REEP5* (eng. *Receptor Expression-Enhancing Protein 5*, *REEP5*); marker D2S123 u genu *MSH2* i marker D17S250 u genu *BRCA1* (eng. *Breast Cancer 1 Gene*, *BRCA1*) predloženog od strane NCI (eng. *National Cancer Institute*), nestabilnost detektovana u dva ili više markera označava se kao MSI-H (eng. *Microsatellite Instability-High*), dok se tumori kod kojih je prisutna nestabilnost u samo jednom od markera, označavaju kao mikrosatelitski stabilni - MSS (eng. *Microsatellite Stable*) (Boland i sar., 1998). Približno 10-15% sporadičnih oblika kolorektalnog karcinoma poseduje defekte u nekom od MMR gena, uključujući gene *hMLH1*, *hMSH2*, *hMSH6* (eng. *MutS, E. Coli, Homolog of 6*, *MSH6*), i *PMS2* (eng. *PMS1 Homolog 2*, *PMS2*) (Peltomari, 2001). Kod sporadičnih tumora kod kojih postoje ovakvi poremećaji, najčešće je u pitanju inaktivacija gena *hMLH1* usled metilacije promotorskog regiona, dok su ostali uzroci izmenjene ekspresije gena MMR uglavnom rezultat drugih somatskih ili germinativnih mutacija (Cunningham i sar., 1998). Kod naslednog nepolipoznog kolorektalnog karcinoma (HNPCC), jedan mutirani alel gena *hMLH1* ili *hMSH2* se nasleđuje, a sledeći događaj se javlja na neizmenjenom (divljem soju - *wild-type*) alelu tokom života, i to može biti somatska mutacija ili metilacija promotora ovih gena (Imai i Yamamoto, 2010). Visok nivo mikrosatelitske nestabilnosti (MSI-H) ima učestalost od 83% u naslednom nepolipoznom kolorektalnom karcinomu i 15-20% u sporadičnom obliku kolorektalnog karcinoma (Imai i Yamamoto, 2008).

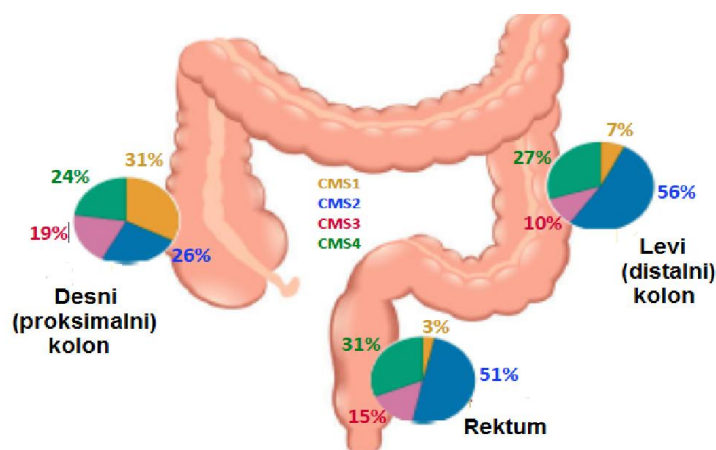
1.2.3. Metilatorski put kolorektalne kancerogeneze

Istovremena metilacija većeg broja specifičnih genskih lokusa, označena kao CIMP, predstavlja zaseban put nastanka kolorektalnih karcinoma (Toyota i sar., 1999). Tumore sa CIMP fenotipom odlikuje epigenetička nestabilnost, koja nastaje usled *de novo* metilacije CpG ostrvaca promotorskih regiona mnogih gena. Za utvrđivanje CIMP statusa kod KRK predložen je klasični panel od pet gena čiji se metilacioni status ispituje: *hMLH1*, *CDKN2A* (eng. *Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2A*, *CDKN2A*, poznat i pod nazivom *p16INK4a*); *APBA1* (eng. *Amyloid Beta Precursor Protein Binding Family A Member 1*, *APBA1*, poznat po prethodnom simbolu gena *MINT1*); *APBA2* (eng. *Amyloid Beta Precursor Protein Binding Family A Member 2*, *APBA2*, poznat po prethodnom simbolu gena *MINT2*); i *APBA3* (eng. *Amyloid Beta Precursor Protein Binding Family A Member 3*, *APBA3*, poznat po prethodnom simbolu gena *MINT3*) (Hawkins i sar., 2002, Ward i sar., 2003, Shen i sar., 2007^a, Barault i sar., 2008). Brojne studije koristile su različite markere metilacije, kao i različite kriterijume za definisanje CIMP-pozitivnog i CIMP-negativnog fenotipa (Jia i sar., 2016). Razvoj KRK preko metilatorskog puta uočen je kod premalignih lezija mukoze označenih kao „sesilni reckasti adenomi/polipi” (eng. *Sessil Serrated Adenoma/Polyp*), koji se svrstavaju u posebnu grupu hiperplastičnih polipa (East i sar., 2017). Sa kliničkog aspekta, postoji dosta sličnosti između CIMP-pozitivnih tumora i tumora debelog creva sa MSI, kao što su lokalizacija tumora u proksimalnom kolonu, veća učestalost tumora kod žena starijeg životnog doba, kao i slaba diferentovanost tumorskih ćelija (Issa, 2004). Molekularni profil tumora sa CIMP fenotipom je kompleksan i postoji generalna podela na: CIMP1 tumore, koje odlikuje visok nivo metilacije, V600E mutacija u genu *BRAF* i mikrosatelitska nestabilnost; CIMP2 tumore, sa manje učestalom metilacijom nego u prethodnoj grupi i prisustvom mutacija u genu *KRAS*; i CIMP-negativne tumore, kod kojih je metilacija redak događaj, dok su tumori mikrosatelitski stabilni sa neizmenjenim genom *TP53* (Shen i sar., 2007^b).

1.2.4. Klasifikacija kolorektalnih karcinoma prema molekularnim karakteristikama

Raznovrsnost molekularnih promena koje se javljaju u različitim stupnjevima kolorektalne kancerogeneze, stvorila je potrebu za univerzalnom klasifikacijom KRK na molekularnom nivou. Upotrebom savremenih metoda za analizu ekspresije genoma, cilj je bio da se definišu molekularni podtipovi KRK koji se međusobno razlikuju kako po mehanizmu nastanka, tako i po kliničkim karakteristikama (Inamura, 2018).

Analizom profila genske ekspresije na velikom broju uzoraka (4151 uzorak), metodom klasterovanja „bez nadzora” (eng. *unsupervised clustering*) definisano je četiri konsenzusna molekularna podtipa (KMP) kolorektalnih tumora (Slika 1.3) (Guinney i sar., 2015). KMP1 podtip (14%, imuni MSI podtip) odlikuje prisustvo mikrosatelitske nestabilnosti, aktivacija imunog sistema, CIMP fenotip, mutacije gena *BRAF*, niži stepen somatskih promena varijacija u broju kopija - SCNA (eng. *Somatic Copy Number Alteration*), a najčešće se javlja kod žena starijeg životnog doba u proksimalnom kolonu. Za KMP2 podtip (37%, konvencionalni podtip) karakteristična je mikrosatelitska stabilnost tumora sa jedne strane i hromozomska nestabilnost sa druge strane, kao i aktivacija signalnog puta *Wnt/Myc* (eng. *Wingless-Type MMTV Integration Site Family Member/MYC Protooncogene, bHLH Transcription Factor*). Pored toga, ovaj podtip odlikuje visok stepen SCNA, odsustvo CIMP fenotipa i prisustvo mutacija tipičnih za konvencionalni put kancerogeneze, odnosno mutacije u genima *APC* i *TP53*, sa najčešćom pojavom u distalnim delovima kolona, kao i u rektumu, pri čemu je uočeno duže ukupno preživljavanje obolelih nakon relapsa bolesti. U podtip KMP3 (13%, metabolički podtip) ubrajaju se tumori sa MSS i CIMP fenotipom sa nižim stepenom metilacije i umerenim stepenom SCNA alteracija, kod kojih su detektovane mutacije gena *APC* i *KRAS*. Posebna odlika tumora ovog molekularnog podtipa jeste specifičnost epitelnih promena mukoze, kao i učestalost metaboličkih poremećaja. Molekularni podtip KMP4 (23%, mezenhimalni podtip) odlikuje MSS, odsustvo CIMP fenotipa, kao i visok nivo SCNA alteracija, koji se najčešće povezuje sa naprednim stadijumima bolesti i sa kraćim ukupnim preživljavanjem. Takođe, kod ovog podtipa KRK detektovana je povećana aktivnost transformišućeg faktora rasta beta - TGF- β (eng. *Transforming Growth Factor beta, TGF- β*), kao i aktivacija procesa stromalne infiltracije tkiva, epitelno-mezenhimske tranzicije - EMT i angiogeneze, koji su karakteristični za invazivnu fazu bolesti. Ovakva klasifikacija kolorektalnih karcinoma prema molekularnim karakteristikama nema prediktivni značaj u smislu primene odgovarajućeg tipa terapije na osnovu KMP podtipa, ali svakako doprinosi boljem razumevanju širokog spektra različitih molekularnih događaja u patogenezi KRK (Inamura, 2018).



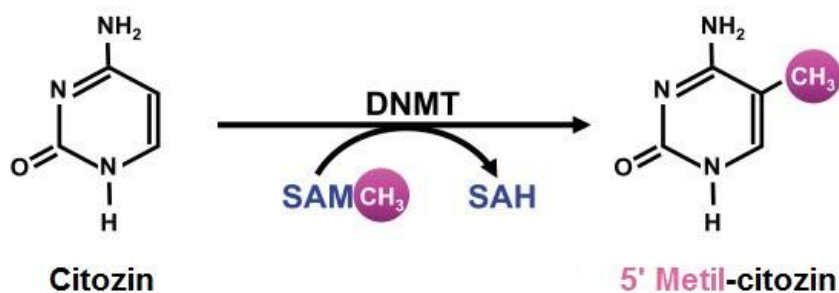
Slika 1.3. Zastupljenost konsenzusnih molekularnih podtipova KRC u zavisnosti od lokacije tumora (Modifikovano iz Guinney i sar., 2015)

1.3. Metilacija molekula DNK

Najbolje proučen mehanizam epigenetičke regulacije genske ekspresije uključen u proces kancerogeneze, jeste metilacija molekula DNK (Tsai i Baylin, 2011). Ova postreplikaciona modifikacija dešava se skoro isključivo na C5 poziciji pirimidinskog prstena citozina u okviru CpG dinukleotidne sekvence i ređe citozina u okviru sekvence CpNpG (gde je N bilo koji nukleotid) (Bird, 2002). U genomu sisara, CpG dinukleotidi su slabo zastupljeni zbog česte deaminacije metilovanog citozina i pogrešne ispravke deaminovanih produkata u timin tokom evolucije (Coulondre i sar., 1978, Bird, 1980). Većina preostalih CpG dinukleotida (oko 75%) je metilovana i raspoređena u okviru nekodirajućih repetitivnih elemenata (Tsai i Baylin, 2011), dok je ostatak raspoređen u okviru tzv. „CpG ostrvaca” (eng. *CpG Islands*). Dužina CpG ostrvaca kreće se od 0,5 do 4kb. Analiza genoma čoveka pokazala je da preko polovina gena za proteine sadrži CpG ostrvca, i to na svojim 5' krajevima. Procena je da u genomu čoveka postoji preko 20 000 CpG ostrvaca i da je u genomima neizmenjenih ćelija čoveka oko 4% citozina metilovano. CpG ostrvca najčešće se nalaze u promotorskim regionima ili prvim egzonima gena. (Illingworth i Bird, 2009). Ovi regioni DNK obično su nemetilovani u fiziološkim, neizmenjenim uslovima, što je povezano sa održavanjem otvorene strukture hromatina i aktivnom transkripcijom (Gardiner-Garden i Frommer, 1987, Takai i Jones, 2002) Oko 75% sekvenci koje predstavljaju mesto početka transkripcije - TSS (eng. *Transcription Start Site*) i 88% aktivnih promotorskih regiona poseduje sekvence bogate CpG-sadržajem, što ih čini podložnim regulaciji putem metilacije (Tost, 2010).

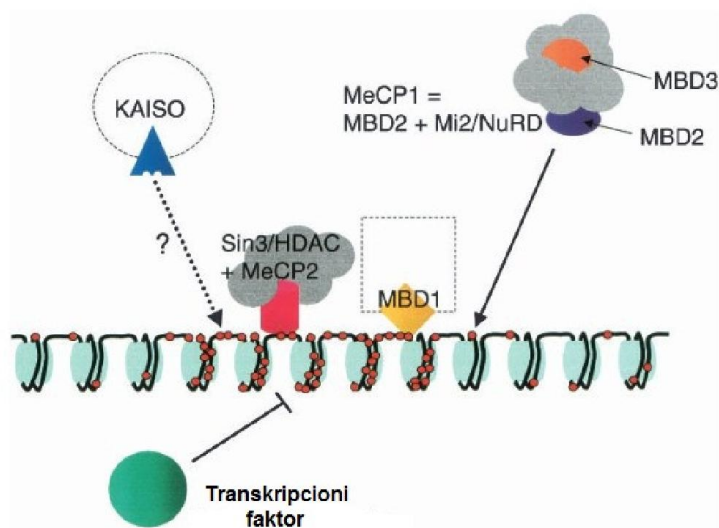
1.3.1. Mehanizam metilacije molekula DNK i njena uloga u regulaciji transkripcije

Reakcija kovalentnog dodavanja metil grupe na C5 poziciju citozina u okviru CpG dinukleotida (Slika 1.4) odvija se uz katalitičku aktivnost enzima iz familije DNK metiltransferaza (DNMT) i uz prisustvo S-adenozil-L-metionina (SAM) kao donora metil grupe (Okano i sar., 1998). Do sada je identifikovano nekoliko tipova DNK metiltransferaza (DNMT1, DNMT2, DNMT3A i DNMT3B), kao i protein povezan sa DNK metiltransferazom (DNMTL3) (Feinberg i Tycko, 2004, Kacem i Feil, 2009). DNMT1 prevashodno ima ulogu u održavanju postojećih obrazaca metilacije tokom replikacije DNK, dok DNMT3A i DNMT3B samostalno ili u kooperaciji vrše *de novo* metilaciju (Tost, 2010).



Slika 1.4. Mehanizam metilacije citozina u okviru CpG dinukleotida (Modifikovano iz Zakhari 2013)

Proces metilacije molekula DNK je pre svega važan za pravilan embrionalni razvoj sisara (Kafri i sar., 1992), kao i za očuvanje integriteta genoma (Bird i Wolffe, 1999). Pored toga, ova epigenetička modifikacija učestvuje u inaktivaciji specifičnih gena na X hromozomu ženki čime se postiže dozna kompezacija (Rigs i Pfeifer, 1992), kao i u procesu genetičkog utiskivanja, odnosno imprintingu (Falls i sar., 1999). U svim nabrojanim procesima, metilacija molekula DNK doprinosi održavanju hromatina u transkripciono neaktivnom stanju i postoji nekoliko mehanizama putem kojih se to ostvaruje (Slika 1.5) (Bird, 2002).



Slika 1.5. Metilacija molekula DNK i represija transkripcije (Modifikovano iz Bird 2002)

Samo prisustvo 5-metil-citozina (5mC) može da spreči vezivanje regulatornih proteina transkripcije na način specifičan od sekvence za regulatorne elemente u blizini promotora (Wade i sar., 1999). Pored toga, postoji i grupa proteina sa DNK-metil-vezujućim domenom - MBD proteini (MBD1, MBD2, MBD3, MBD4 i MeCP2) (Klose i Bird, 2006, Sasai i Defossez, 2009), koji se vezuju za metilovane sekvence molekula DNK i dalje regrutuju enzime histondeacetilaze (HDAC) i proteinske komplekse za remodelovanje nukleozoma, koji sinergistički učestvuju u formiranju zatvorene hromatinske strukture, čime se onemogućava vezivanje preinicijalne transkripcione mašinerije za promotore gena (Jones i sar., 1998). Pored toga, otkriveni su i regulatorni proteini transkripcije koji u okviru svojih DNK vezujućih domena poseduju „cinkane prste”, koji inhibiraju transkripciju vezivanjem za metilovane sekvence molekula DNK (Filion i sar., 2006, Sasai i Defossez, 2009). U svakom slučaju, metilacija molekula DNK nije nezavisan događaj u regulaciji

ekspresije gena, već proces koji u sprezi sa drugim epigenetičkim mehanizmima, na strogo koordinisan način doprinosi oblikovanju regionalne hromatinske strukture i funkcije (Cedar i Bergman, 2009).

1.3.2. Uloga metilacije molekula DNK u kancerogenezi

Kod tumora su uočena dva osnovna obrasca metilacionih promena u genomu, globalna hipometilacija genoma i hipermetilacija regulatornih elemenata i promotorskih regiona pojedinih gena (Ehrlich, 2002, Feinberg i Tycko, 2004, Esteller, 2008). Kao posledica hipometilacije velikih regiona genoma dolazi do povećanja stope rekombinacije i aktivacije poli-A retrotranspozona. Povećana stopa rekombinacije i aktivacija poli-A retrotranspozona dovodi do pojave delecija, duplikacija i drugih hromozomskih rearanžmana. Sve ove strukturne promene na nivou genoma tumorske ćelije nazivaju se genomska nestabilnost (Feinberg i Vogelstein, 1983, Cui i sar., 2002, Cadieux i sar., 2006). U različitim tipovima tumora, pokazano je da je demetilacija u regionima koji nisu grupisani u CpG ostrvca u korelaciji sa različitim fazama kancerogeneze i pojavom metastaza (Bedford i van Helden 1987, Kim i sar., 1994, Lin i sar., 2001, Cadieux i sar., 2006), a ova pojava uočena je i u ranim neinvazivnim fazama karcinoma kolona (Goelz i sar., 1985). Sa druge strane, region specifična hipermetilacija, podrazumeva *de novo* metilaciju nemetilovanih CpG ostrvaca u sastavu promotorskih regiona gena. Metilacija citozina u okviru CpG dinukleotida se u ovom slučaju dešava u blizini regulatornih elemenata promotora gena, što je često povezano sa represivnim stanjem hromatina i inhibicijom transkripcije, mada samo prisustvo metilacije ne mora obavezno da utiša ekspresiju okolnih gena. Samo kada je određeni region promotora hipermetilovan na određenoj udaljenosti od mesta početka transkripcije dolazi do uticaja na ekspresiju gena, tako da je metilacioni status specifičnih CpG dinukleotida promotorskog regiona bolji pokazatelj ekspresije gena, nego metilacioni status celokupnog CpG ostrvceta (Ushijima, 2005).

Aberantnom metilacijom u tumorskim ćelijama su pogođeni promotori brojnih gena koji regulišu važne ćelijske procese: ćelijski ciklus (članovi familije INK4 koji inhibiraju komplekse koje formiraju CDK4 i CDK6); sistem za popravku oštećenja u molekulu DNK: *MGMT* (eng. *O-6-Methylguanine-DNA Methyltransferase*, MGMT), *hMLH1*, *BRCA1*; apoptoza: *DAPK1* (eng. *Death-Associated Protein Kinase*, DAPK1); ćelijska adhezija: *CDH1* (eng. *Cadherin1*, CDH1), *CDH13* (eng. *Cadherin13*, CDH13); detoksifikacija: *GSTP1* (eng. *Glutathione S-Transferase P1*, GSTP1); angiogeneza: *THBS1* (eng. *Thrombospondin I*, THBS1); inhibicija metastaze: *TIMP3* (eng. *Tissue Inhibitor of Metalloproteinase 3*, TIMP3); i dr. (Feinberg, 2001). Epigenetičke izmene navedenih gena mogu da se jave veoma rano u procesu kolorektalne kancerogeneze, a moguće ih je detektovati i na stupnju adenokarcinoma (Baylin i sar., 2001). Procenjuje se da je u tipičnom genomu ćelija kolorektalnog karcinoma više gena koji su pogođeni aberantnom metilacijom nego genetičkim alteracijama, dok je kod pojedinih gena metilacija jedini mehanizam koji dovodi do utišavanja njihove ekspresije (Schuebel i sar., 2007).

1.4. Karcinom rektuma

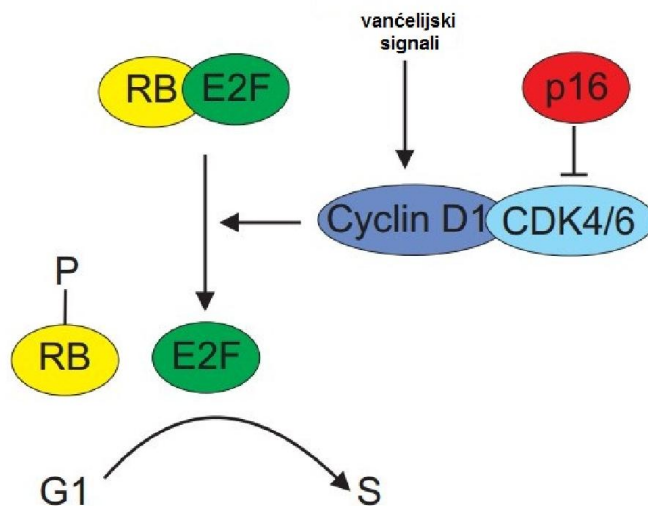
Karcinom rektuma je posle karcinoma proksimalnog kolona drugi najčešći oblik tumora debelog creva i obuhvata između 28-35% svih slučajeva kolorektalnih karcinoma (Siegel i sar., 2014). Obično se u epidemiološkim studijama posmatra zajedno sa ostalim tipovima tumora debelog creva, iako je sve više podataka koji ukazuju na to da se radi o posebnom kliničkom entitetu, sa znatnim razlikama u pogledu patogeneze, što zahteva drugačiji terapijski pristup u odnosu na karcinom kolona (Carethers, 2011, Schmoll i sar., 2012).

Anatomski gledano, rektum predstavlja zadnji deo debelog creva (dužina 12-15 cm) koji se nalazi između sigmoidnog kolona i analnog kanala (Fazeli i Keramati, 2015). Pored toga što je različita raspoređenost hormonskih receptora duž zida kolona i rektuma, ova dva entiteta imaju i različite funkcije u procesu varenja. Rektum je više izložen koncentrovanom fecesu, dok je nesvarena masa u kolonu prekrivena alkalnim mukusom, tako da postoji znatna razlika u pH vrednostima između ova dva segmenta debelog creva, što ih čini podložnim i osetljivim na različite kancerogene faktore (Wei i sar., 2004). Usled različite lokacije, tkivo kolona, odnosno rektuma odlikuje različita prokrvljenost, drenaža i inervacija (van der Sijp i sar., 2016), što rezultuje u tome da primarni tumori kolona, odnosno rektuma imaju različit stepen invazivnog rasta, kao i drugačije mehanizme nastanka i razvoja recidiva i metastaza (Li i Lai, 2009, Kornmann i sar., 2013). Pored toga, metastaze koje formiraju ova dva tipa tumora imaju različit stepen senzitivnosti na hemioterapiju (Elsaleh i sar., 2000, Guyot i sar., 2005, Kornmann i sar., 2013). Navedene karakteristike tumora kolona i rektuma zahtevaju optimizaciju tretmana, dok klinički značaj molekularnih promena asociiranih sa kolorektalnim karcinomom generalno treba dodatno ispitati u svakom entitetu posebno.

Put prenosa signala kinaze MAP koji aktivira komplekse ciklin-zavisnih kinaza/ciklina u fazi G₁ ćelijskog ciklusa (Braicu i sar., 2019), regulacija aktivnosti proteina koji maskira pRb (Knudsen i Wang, 2010) i proteina p53 (Wasylishen i Lozano, 2016) su tri najčešće narušena ćelijska puta u tumorima čoveka. Analiza glavnih učesnika ova tri signalna puta, kao i ispitivanje međuzavisnosti genetičkih/epigenetičkih promena u genima *KRAS*, *p16INK4a* (eng. *Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 2A*, p16INK4a) i *p14ARF* (eng. *Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2A*, *CDKN2A alias symbol p14ARF*), moglo bi značajno doprineti razumevanju molekularne patogeneze karcinoma rektuma kao posebnog entiteta.

1.4.1. Gen *p16INK4a*

Gen *p16INK4a* nalazi se na hromozomskoj poziciji 9p21 (Sherr i Roberts., 1999), u okviru lokusa *INK4a/ARF* koji je često deletiran ili metilovan u različitim tipovima maligniteta kod ljudi (Rocco i Sidransky, 2001). Pokazano je da geni u okviru ovog lokusa kodiraju proteine koji imaju važnu ulogu u regulaciji ćelijskog ciklusa (Chin i sar., 1998). Proteinski produkt gena *p16INK4a* pripada *INK4a* familiji inhibitora ciklin-zavisnih kinaza (CDK), a primarna funkcija ovih proteina jeste sprečavanje prelaska ćelije iz G₁ u S fazu ćelijskog ciklusa (Serrano, 1997, Pei i Xiong, 2005). Ukratko, protein P16INK4a vezuje se za ciklin-zavisne kinaze 4 i 6 (CDK4 i CDK6), sprečavajući formiranje ciklin D-CDK4/6 kompleksa, odnosno fosforilaciju proteina pRb. U prisustvu proteina P16INK4a održava se hipofosforilisano stanje proteina pRb, koji u takvoj konformaciji vezuje transkripcione regulatore iz E2F familije, što za posledicu ima zaustavljanje ćelijskog ciklusa u G₁ fazi (Slika 1.6) (Serrano, 1997).



Slika 1.6. P16INK4A u regulaciji ćeliskog ciklusa (Modifikovano iz Peurala i sar., 2013)

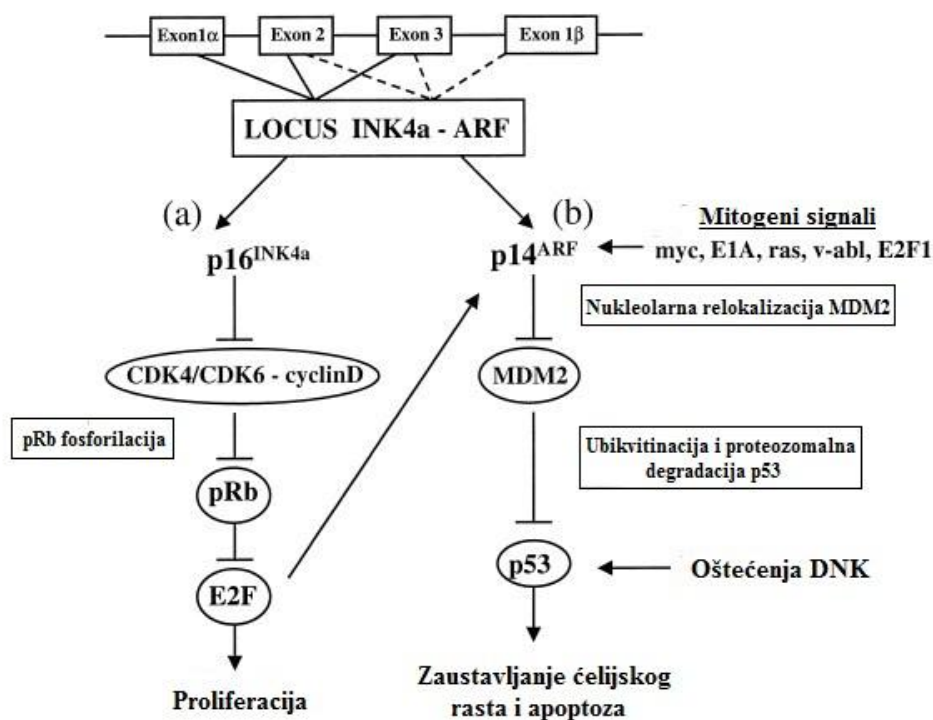
Pored primarne funkcije u regulaciji ćeliskog ciklusa, P16INK4a je i glavni medijator procesa ćeliskog starenja (senescencije), kada se indukuje zaustavljanje ćelijskog rasta, u cilju zaštite ćelije od hiperproliferativnih i stresogenih signala (Bringold i Serrano, 2000, Collado i sar., 2005). Proces senescencije aktivira se tokom starenja organizma (replikativna senescencija) ili u odgovoru na različita oštećenja u molekulu DNK, oksidativni stres ili aktivaciju onkogena (Passegue i Wagner, 2000, Krishnamurthy i sar., 2004, Chen i sar., 2005, Collado i sar., 2007, Ruas i sar., 2007). Pokazano je da aktivacija onkogena *KRAS* predstavlja jak proliferativni signal usled kojeg dolazi do pokretanja zaštitnog sistema ćelije, odnosno onkogenom-indukovane senescencije upravo preko P16INK4a/pRb puta (Bennecke i sar., 2010).

U literaturi su opisane i dodatne uloge proteinskog produkta gena *p16INK4a*, pre svega u regulaciji procesa bitnih u nastanku i progresiji tumora kao što su apoptoza, ćelijska migracija i angiogeneza (Romagosa i sar., 2011). U nekoliko *in vitro* studija je pokazano da P16INK4a učestvuje u regulaciji ćelijske migracije zavisne od vanćelijskog matriksa (Fahraeus i Lane, 1999), zatim u invazivnim fazama glioma (Chintala i sar., 1997), kao i u inhibiciji migracije ćelijskih linija karcinoma dojke (Li i Lu, 2010). Protein P16INK4a ima indirektnu ulogu u regulaciji angiogeneze, procesu stvaranja *de novo* krvnih sudova, koji je važan aspekt za dalji rast tumora i invaziju u okolna tkiva. Utvrđeno je da P16INK4a ovu funkciju ostvaruje regulacijom ekspresije glavnog medijatora angiogeneze - vaskularnog endotelnog faktora rasta (eng. *Vascular Endothelial Growth Factor*, VEGF) (Lu i sar., 2012). U studiji sa ćeliskim linijama glioma, uočeno je da eksperimentalno ponovno uspostavljena ekspresija gena *p16INK4a* dovodi do smanjne ekspresije faktora VEGF i inhibicije angiogeneze (Harada i sar., 1999). Povećana ekspresija gena *p16INK4a* može indukovati i proces ćelijske smrti po tipu apoptoze (p53-zavisanim ili p53-nezavisanim putem) u ćeliskim linijama različitih tipova tumora (Kataoka i sar., 2000, Calbo i sar., 2001, Modesitt i sar., 2001, Katsuda i sar., 2002).

Inaktivacija gena *p16INK4a* je česta pojava u patogenezi različitih tipova tumora, pri čemu je najčešće detektovana u tumorima debelog creva, pluća, dojke, bešike, cerviksa i gliomima (Esteller i sar., 2001). Primarni mehanizam inaktivacije gena *p16INK4a* kod ovih malignih oboljenja je metilacija CpG ostrvaca promotorskog regiona, koja se prema podacima iz literature registruje kod 10-61% slučajeva kolorektalnih karcinoma (Veganzones-de-Castro i sar., 2012, Xing i sar., 2013).

1.4.2. Gen *p14ARF*

Gen *p14ARF* je prvobitno identifikovan kao alternativni transkript lokusa INK4a/ARF koji se nalazi na hromozomu 9p21 (Quelle i sar., 1995). Pomenuti lokus sadrži dva egzona 1 (egzon 1 β i egzon 1 α), kao i egzone 2 i 3, kojim su kodirani proteini P16INK4a i P14ARF (Quelle i sar., 1995). Gen *p14ARF* je kodiran egzonom 1 β , kao i egzonima 2 i 3 koje deli sa genom *p16INK4a* (Slika 1.7). Međutim, produkti ova dva gena nisu izoforme, jer se egzon 2 gena *p14ARF* translata alternativnim okvirom čitanja u odnosu na egzon 2 gena *p16INK4a* (Ozenne i sar., 2010). Pored toga, regulacija transkripcije ova dva gena se vrši preko dva nezavisna promotora (Badal i sar., 2008).



Slika 1.7. Lokus *INK4a/ARF* i funkcije produkta gena *p16INK4a* i *p14ARF* (Modifikovano iz Soufir i sar., 2000)

Svoju tumor-supresorsku ulogu P14ARF ispoljava regulisanjem zaustavljanja ćelijskog ciklusa, kao i regulacijom procesa apoptoze na p53-zavisan ili p53-nezavisan način (Ozenne i sar., 2010). Funkcija proteina P14ARF predstavlja spregu između pRb i p53 signalnih puteva u ćeliji, jer je pokazano da P14ARF pokreće p53-zavisnu kontrolnu fazu ćeliskog ciklusa u slučajevima kada je protein pRB inaktiviran (De Stanchina i sar., 1998, Stott i sar., 1998). Stupanjem u interakciju sa proteinom HDM2 (eng. *Human Double Minute 2*, HDM2) koji deluje kao E3-ubikvitin ligaza, protein P14ARF indirektno sprečava obeležavanje proteina p53 za ubikvitinaciju i na taj način vrši njegovu stabilizaciju (Pomerantz i sar., 1998). Prema podacima iz literature, P14ARF dovodi do zaustavljanja ćelijskog rasta u odgovoru na aktivaciju onkogena, uključujući i onkogen *KRAS*, tako što indukuje aktivnost proteina p53, koji pokreće ekspresiju brojnih gena uključenih u regulaciju procesa apoptoze i inhibiciju ćelijskog ciklusa (De Stanchina i sar., 1998, Palmero i sar., 1998, Zindy i sar., 1998, Parisi i sar., 2002, Berkovich i sar., 2003). Međutim, studije na miševima kao model sistemima i tumorskim ćelijskim linijama su pokazale da P14ARF može da spreči rast i

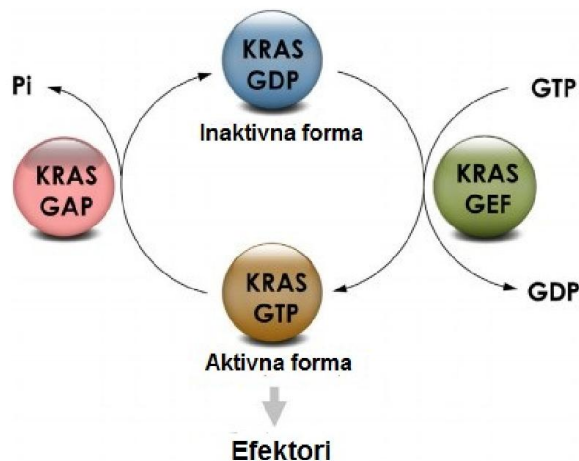
preživljavanje ćelija nezavisno od p53 puta regulacije ovih procesa (Weber i sar., 2000, Eymin i sar., 2003). Tumor-supresorne funkcije nezavisne od p53-puta protein P14ARF ostvaruje interakcijom sa brojnim drugim molekulima, kao što su regulatorni proteini transkripcije (E2F-faktori, DP1, p63, c-Myc, HIF-1 α), nukleolarni protein (NPM/B23), virusni proteini (HIV-1Tat), mitohondrijalni protein p32 i drugi (Sharpless, 2005, Sherr, 2006). Uočena je i obrnuta korelacija između nivoa ekspresije proteina VEGF i P14ARF, odnosno izmenjena ekspresija gena *p14ARF* može dovesti do inhibicije angiogeneze, kako u normalnim fiziološkim uslovima, tako i u različitim tipovima tumora posredstvom regulacije ekspresije faktora VEGF (Kawagishi i sar., 2010, Kotsinas i sar., 2014). Pored toga, rezultati studije kolorektalnog karcinoma su pokazali da protein P14ARF može da reguliše stabilnost proteina P16INK4a (Kobayashi i sar., 2013).

S obzirom na specifičnost strukture INK4a/ARF lokusa, inaktivacija gena *p14ARF* obično se dešava istovremeno sa inaktivacijom gena *p16INK4a*, najčešće kao posledica homozigotne delecije lokusa INK4a/ARF ili, u ređem slučaju, usled mutacije u egzonu 2 oba gena (Sharpless, 2005). Međutim, metilacijom CpG ostrvaca u promotorskom regionu reguliše se ekspresija gena *p14ARF*, bez uticaja na ekspresiju gena *p16INK4a*. Inaktivacija gena *p14ARF* putem metilacije ima važnu ulogu u kancerogenezi tumora gastrointestinalnog sistema, a kod kolorektalnih karcinoma metilacija promotora gena *p14ARF* se detektuje u 28-50% slučajeva (Esteller i sar., 2000, Hibi i sar., 2002, Lee i sar., 2006, Kang i sar., 2008).

1.4.3. Gen *KRAS*

Gen *KRAS* (eng. *Kirsten Rat Sarcoma 2 Viral Oncogene Homolog*, KRAS) je proto-onkogen koji kodira mali GTP-azni signalni protein. Protein KRAS pripada RAS familiji proteina koja je podeljena na šest podfamilija (RAS, RAL, RAP, RHEB, RAD i RIT), čiju strukturu odlikuje centralni G domen uz pomoć kog ostvaruje GTP-aznu aktivnost i zamenu nukleotida GTP/GDP. U humanom genomu postoje tri gena *RAS*, koji kodiraju tri homologa proteina HRAS, NRAS i KRAS, pri čemu postoje dve splajsovane varijante proteina KRAS, od kojih je KRAS4B forma zastupljenija u ćelijama čoveka (McGrath i sar., 1983, Popescu i sar., 1985, Liu i sar., 2019).

Protein KRAS egzistira u ćeliji u aktivnoj ili inaktivnoj formi, u zavisnosti od toga da li vezuje guanin trifosfat (GTP) ili guanin difosfat (GDP) (Bos i sar., 2007). Tranzicija između ova dva stanja proteina KRAS je regulisana GEF-faktorima (eng. *Guanine Nucleotide Exchange Factors*) koji ubrzavaju proces disocijacije GDP-a i vezivanja GTP-a sa jedne strane i GAP-proteinima (eng. *GTPase-Activating Proteins*) sa druge strane, koji ubrzavaju GTP-aznu hidrolitičku aktivnost samog proteina KRAS i vraćanje u prvobitno, neaktivno stanje (Gideon i sar., 1992). U fiziološkim uslovima, protein KRAS je predominantno u neaktivnom GDP-vezanom stanju. U odgovoru na vanćelijske stimulse, najčešće faktore rasta, KRAS prelazi u aktivno GTP-vezano stanje, odnosno dolazi do konformacione promene koja za posledicu ima pojačanu GTP-aznu aktivnost proteina KRAS, što promoviše oslobađanje GTP-a iz kompleksa (Slika 1.8) (Scheffzek i sar., 1997, Pylayeva-Gupta i sar., 2011). Prilikom posredovanja u prenosu signala iz vanćelijskog prostora do nukleusa ćelije, protein KRAS aktivira brojne nishodne puteve prenosa signala, kao što su MAP-kinazni put, PI3-kinazni put i RAL-GEF put, koji regulišu najvažnije ćelijske procese, kao što su diferencijacija, rast, migracija i apoptoza (Schubbert i sar., 2007, Van Krieken i sar., 2008, Liu i sar., 2019).



Slika 1.8. KRAS-GTP-azni ciklus (Modifikovano iz Liu i sar., 2019)

Proteini iz RAS familije spadaju u najčešće mutacijom pogođene gene u tumorima kod ljudi, pri čemu se 86% mutacija detektuje u genu *KRAS* (Prior i sar., 2012, Cox i sar., 2014). Najčešći tip detektovanih mutacija jesu tačkaste mutacije koje menjaju značenje kodona i imaju za posledicu ugradnju druge aminokiseline (eng. *missense*). Ove mutacije mogu dovesti do inhibicije GTP-azne funkcije proteina *KRAS*, usled čega dolazi do akumulacije njegove aktivne GTP-vezane forme. Kontinuirano aktiviran protein *KRAS* promovira procese neoplastične transformacije u ćeliji, odnosno doprinosi inicijaciji, rastu i daljem širenju tumorskih ćelija stimulišući proces angiogeneze regulacijom ekspresije faktora VEGF (Rak i sar., 1995, Figueras i sar., 2013).

U najvećem procentu, mutacije gena *KRAS* zastupljene su kod karcinoma pankreasa (90%) i pluća (30-50%), mada se mutacije ovog gena detektuju i u drugim tipovima tumora (Pylayeva-Gupta i sar., 2011, Singh i sar., 2015, Liu i sar., 2019). Mutacije gena *KRAS* detektovane su kod 30-40% slučajeva KRK, odnosno kod 19-48% slučajeva karcinoma rektuma (Bengala i sar., 2010, Gaedcke i sar., 2010, Garcia-Aguilar i sar., 2011, Duldulao i sar., 2013), pri čemu su mutacije predominantno locirane u 12-om (oko 82%) i 13-om (oko 17%) kodonu egzona 2 (Luna-Pérez i sar., 2000). Mutacije u ovim regionima imaju važnu ulogu u patogenezi KRK, a pokazano je da različiti tipovi mutacija gena *KRAS* ispoljavaju različite biološke efekte, odnosno poseduju različit transformišući potencijal (Andreyev i sar., 2001, Garassino i sar., 2011, Miller i Miller, 2011).

1.5. Terapijski pristup u lečenju karcinoma rektuma

Savremeni pristup u terapiji karcinoma rektuma podrazumeva lečenje pacijenata prema stadijumu bolesti. S obzirom na invazivnu prirodu kolorektalnih karcinoma, određivanje stadijuma tumora se zasniva na tome koliko se tumor proširio u zid creva, da li zahvata okolne strukture i da li se proširio i u okolne limfne čvorove i/ili udaljene organe. Stepenn proširenosti tumora najpreciznije se opisuje TNM klasifikacijom predloženom od strane AJCC (eng. *American Joint Committee on Cancer*), koja uzima u obzir probijanje tumora u zid creva (T), zahvaćenost regionalnih limfnih čvorova (N) i pojavu udaljenjih metastaza (M) („National Cancer Comprehensive Network”, 2015). Nakon određivanja T, N i M kategorije, tumori se prema stepenu uznapredovalosti razvrstavaju u stadijume od I (najmanje uznapredovali) do IV (najviše uznapredovali). U kliničkoj praksi se takođe koristi dopunjena i modifikovana Djuksova klasifikacija po kojoj se prema stepenu proširenosti

tumora razlikuju četiri stadijuma bolesti (A, B, C i D) (Dukes, 1932), koji se suštinski poklapaju sa TNM I-IV stadijumima (Nikolić, 2011).

Karcinom rektuma se drugačije klinički manifestuje u odnosu na ostale tumore gastrointestinalnog trakta, te stoga zahteva i poseban tretman (Fazeli i Keramati, 2015). Osnovni i najvažniji vid lečenja je odstranjivanje tumora hirurškim putem. Ukoliko je tumor lokalizovan i dijagnostifikovan u ranom stadijumu, radikalnom operacijom postižu se zadovoljavajući rezultati u smislu boljeg petogodišnjeg preživljavanja obolelih (Drebin i Niederhuber, 1993, Middleton i Cunningham D, 1995, Bader i sar., 2008). U slučaju lokalne proširenosti bolesti, kombinovana primena hirurgije, radioterapije i hemioterapije predstavlja „zlatni standard“ u lečenju obolelih. Kod lokalno uznapredovalih stadijuma karcinoma rektuma (TNM II i TNM III) indikovana je preoperativna (neoadjuvantna) hemioradioterapija, nakon koje sledi operativni tretman (Sauer i sar., 2004, Bosset i sar., 2006).

Za razliku od postoperativne hemioradioterapije, preoperativna hemioradioterapija (HRT) je manje toksična, a osim što smanjuje tumorsku masu, pokazano je da se nakon njene primene smanjuje verovatnoća pojave lokalnih recidiva i produžava ukupno preživljavanje (Sauer i sar., 2004, Martin i sar., 2012). Bez obzira na nabrojane prednosti ovog tipa tretmana, individualni odgovor obolelih na preoperativnu HRT je varijabilan, tj. kompletan patološki odgovor (pKO), odnosno redukcija tumorske mase postiže se samo kod 10-30% pacijenata (Stipa i sar., 2006, de Campos-Lobato i sar., 2010), dok je kod ostalih odgovor na terapiju delimičan ili potpuno izostaje (Martin i sar., 2012). Ove činjenice odražavaju postojanje značajne biološke heterogenosti u okviru tumora koji pripadaju istom stadijumu. Stoga je neophodno definisati pouzdane prediktivne molekularne markere u cilju kreiranja i primene personalizovane terapije.

1.6. Prediktivni faktori tumorskog odgovora na preoperativnu HRT

S obzirom da odgovor na preoperativnu HRT nije uniforman, od kliničke važnosti je identifikovati pacijente kojima će primenjeni tretman biti od koristi u daljem toku lečenja, a sa druge strane izbeći neželjene efekte zračenja i hemioterapeutika kod pacijenta sa tumorom rezistentnim na terapiju (Spolverato i sar., 2011). Brojni ispitivani biomarkeri dovode se u vezu sa stadijumom bolesti i krajnjim ishodom, a kategorisani su kao prediktivni i prognostički parametri. Prediktivni biomarkeri koriste za procenu efekta primenjene terapije i predviđanje odgovora na terapiju, dok prognostički biomarkeri ukazuju na krajnji ishod bolesti nezavisno od primenjenog tretmana (Winder i Lenz, 2010). Što se tiče samih kliničkih parametara, pokazano je da postoperativno utvrđen stadijum bolesti i stepen regresije tumora - TRG (eng. *Tumor Regression Grade*) značajno utiču na prognozu kod obolelih koji su tretirani preoperativnom hemioradioterapijom (Wheeler i sar., 2002, Rodel i sar., 2005, Vecchio i sar., 2005). Poslednjih godina intenzivno se ispituje prediktivna uloga brojnih molekularnih parametara u pretretmanskim biopsijama, kao što je nivo ekspresije receptora za epidermalni faktora rasta - EGFR (eng. *Epidermal Growth Factor Receptor*), vaskularnog endotelnog faktora rasta - VEGF, TP53, timidilat sintaze - TS, Ki-67 (eng. *Proliferation - Related Ki-67 Antigen*, MKI67), p21 (eng. *p21 Protein-Activated Kinase 2*; PAK2), Bcl-2 (eng. *B-Cell CLL/Lymphoma 2*, BCL2), APAF-1 (eng. *Apoptotic Protease Activating Factor 1*, APAF1) i mnogih drugih (Zeestraten i sar., 2012, Milgrom i García-Aguilar, 2013, García-Flórez i sar., 2015). Međutim, rezultati istraživanja potencijalnih biomarkera su često kontradiktorni i potrebna je usaglašenost u metodologiji i interpretaciji rezultata da bi ispitivani parametri dobili kliničku primenu (García-Flórez i sar., 2015).

1.6.1 EGFR kao prognostički i prediktivni marker kod obolelih od karcinoma rektuma

Receptor za epidermalni faktor rasta (EGFR) pripada ErbB familiji tirozin-kinaznih receptora i ključan je za funkcionisanje ćelija epitelnog tkiva (Schlessinger, 2014). Vezivanjem ekstraćelijskog liganda EGF (eng. *Epidermal Growth Factor*, EGF) dolazi do aktivacije receptora, odnosno do aktivacije različitih nishodnih puteva prenosa signala, najčešće preko puteva prenosa signala MAP kinaza, PI3K/AKT (eng. *Phosphoinositide-3-Kinase-Protein Kinase B/Akt*, PI3K/AKT) ili fosfolipaza C (PLC)/protein kinaza C (PKC) puta (Lemmon i Schlessinger, 2010), čime se regulišu osnovni ćelijski procesi kao što su proliferacija, preživljavanje, diferencijacija i migracija.

Tačkaste mutacije ili prekomerna ekspresija usled amplifikacije gena *EGFR*, česti su molekularni događaji kod različitih tipova maligniteta ljudi (Yarden i Pines, 2010). Prekomerna ekspresija gena *EGFR* zabeležena je kod 25-80% slučajeva KRK (Spano i sar., 2005) i povezuje se sa češćom pojavom lokalnih recidiva (Azria i sar., 2005, Giralt i sar., 2005, Li i sar., 2006) i generalno, lošijom prognozom kod obolelih od kolorektalnog karcinoma (Hemming i sar., 1992, Mayer i sar., 1993). Nekoliko studija pokazalo je da imunohistohemijski utvrđena ekspresija proteina EGFR može imati potencijalni prediktivni značaj kod lokalno uznapredovalih tumora karcinoma rektuma. Pokazana je povezanost niske ekspresije proteina EGFR sa boljim odgovorom na preoperativnu HRT (Toiyama i sar., 2010), kao i sa ponovnim uspostavljanjem povoljnijeg TNM stadijuma nakon tretmana (eng. *TNM Downstaging*) (Kim i sar., 2006) Pored toga, uočena je i asocijacija između pozitivne ekspresije proteina EGFR (kada 5% i više ispitivanih tumorskih ćelija ekspirira dati parametar) i manjeg procenta obolelih koji postižu kompletan patološki odgovor - kPO na HRT i kraćeg ukupnog preživljavanja, kao i kraćeg preživljavanja bez znakova bolesti - DFS (eng. *Disease-Free Survival*) (Giralt i sar., 2005, Richter i sar., 2015).

1.6.2. VEGF kao prognostički i prediktivni marker kod obolelih od karcinoma rektuma

Vaskularni endotelni faktor rasta (VEGF) ima glavnu ulogu u procesu nastanka i razvoja krvnih sudova, kao i u regulaciji permeabilnosti vaskularnih endotelnih ćelija (Breen, 2007). Proces neovaskularizacije, praćen je povećanom ekspresijom VEGF i ključan je za dalji rast i širenje tumorskih ćelija (Theodoropoulos i sar., 2006). Prilikom imunohistohemijskih analiza primećeno je da se protein VEGF ne ekspirira u neizmenjenoj mukozi kolona, dok je ekspresija ovog faktora kod adenokarcinoma značajno povećana (Kang i sar., 1997, Wong i sar., 1999, Zlobec i sar., 2005), odnosno uočava se kao rani događaj tokom transformacije benignog adenoma u adenokarcinom (Wong i sar., 1999). Prema rezultatima eksperimentalnih studija, povećan nivo ekspresije proteina VEGF kod kolorektalnih karcinoma povezan je sa većom agresivnošću tumora, češćom pojavom lokalnih recidiva i metastaza i generalno, lošijom prognozom (Zhang i sar., 2001, Zlobec i sar., 2005). Što se tiče prediktivne uloge kod lokalno uznapredovalih karcinoma rektuma, nekoliko studija pokazalo je da povećana ekspresija ovog faktora samostalno ili u kombinaciji sa izmenjenom ekspresijom drugih proteina, kao što je EGFR, koreliše sa nepovoljnijim odgovorom na terapiju (Zlobec i sar., 2005, Zlobec i sar., 2008, Yu i sar., 2019).

1.6.3. Bcl-2 kao prognostički i prediktivni marker kod obolelih od karcinoma rektuma

Bcl-2 pripada familiji proteina koji imaju važnu ulogu u regulaciji programirane ćelijske smrti, apoptoze (Czabotar i sar., 2014). Svoju anti-apoptotsku funkciju ostvaruje na spoljašnjoj membrani mitohondrija, sprečavajući oslobađanje proapoptotičkih faktora koji aktiviraju kaspaze i tako indirektno štiti ćeliju od prerane smrti (Yang i sar., 1997). Pokazana je izmenjena ekspresija

ovog proteina u nekoliko tipova tumora, koja nastaje različitim mehanizmima kao što su translokacija t(14;18), amplifikacija ili mutacija gena *Bcl-2* (Rantanen i sar., 2001). Prekomerna ekspresija proteina Bcl-2 štiti ćeliju od apoptoze indukovane zračenjem i odgovorna je za rezistenciju na hemioterapeutske agense (Miyashita i Reed, 1993). U jednoj studiji pokazana je korelacija između niže ekspresije proteina Bcl-2 i povoljnijeg odgovora na HRT (Huerta i sar., 2010), dok u većini drugih studija nije uočena ovakva asocijacija sa odgovorom na terapiju kod obolelih od karcinoma rektuma (Lin i sar., 2006, Moral i sar., 2009). Prognoistička uloga ekspresije proteina Bcl-2 ispitivana je u brojnim malignim oboljenjima, međutim, rezultati tih studija su često kontradiktorni (Grizzle i sar., 2002). Prema poslednjem saznanjima, povišena ekspresija proteina Bcl-2 dovodi se u vezu sa boljom prognozom kod obolelih od kolorektalnog karcinoma i značajno utiče na duže ukupno preživljavanje i preživljavanje bez znakova bolesti (Huang i sar., 2017).

1.6.4. Ki-67 kao prognostički i prediktivni marker kod obolelih od karcinoma rektuma

Ki-67 je jedarni protein, koji se često koristi kao marker ćelijske proliferacije, s obzirom da je prisutan u svim aktivnim fazama ćelijskog ciklusa (G_1 , S, G_2 i M) osim u G_0 fazi mirovanja (Scholzen i Gerdes, 2000). Proliferativni indeks, tj. nivo ekspresije proteina Ki-67 značajan je pokazatelj procenta tumorskih ćelija koje se aktivno dele (Lossos i Morgensztern, 2006). Nizak proliferativni indeks Ki-67 u tumorskom tkivu, može biti prediktor hemiorezistencije, s obzirom da se većina malignih ćelija nalazi u fazi mirovanja, što ih čini otpornim na dejstvo hemioterapije (Lossos i Morgensztern, 2006). U tumorima kao što su karcinom dojke i grlića materice, gliom i hepatocelularni karcinom, pokazana je veza između nivoa ekspresije proteina Ki-67 i kraćeg ukupnog preživljavanja, dok prognoistička i prediktivna uloga ovog parametra u KRK nije u potpunosti objašnjena (Mulyawan, 2018). U većini studija karcinoma rektuma nije utvrđen uticaj izmenjene ekspresije proteina Ki-67 na odgovor na HRT (Spolverato i sar., 2011). Rezultati novijih studija pokazuju da krajnji efekat izmenjene ekspresije proteina Ki-67 u tumorima debelog creva zavisi od stadijuma i lokacije bolesti, kao i od primenjene terapije (Mulyawan, 2018).

1.7. Potencijalni klinički značaj gena *p16INK4a*, *p14ARF* i *KRAS* u karcinomu rektuma

Univerzalni mehanizam nastanka i stabilnosti epigenetičkih promena u tumorima omogućava njihovu potencijalnu kliničku primenu kako za procenu rizika i ranu detekciju tumora, tako i za bolju prognostiku i predikciju odgovora na primenjenu terapiju (Herman i Baylin, 2003, Mulero-Navarro i Esteller, 2008). Za razliku od genetičkih promena, epigenetičke promene kod malignih oboljenja imaju farmakološki reverzibilan karakter, odnosno predstavljaju potencijalni target za kreiranje efikasnih terapeutika (Yoo i Jones, 2006, Issa i Kantarjian, 2009). Za procenu metilacionog statusa ciljnih gena koriste se brojne senzitivne metode, uz minimalnu invazivnost prilikom uzorkovanja, što ovu epigenetičku modifikaciju čini potencijalnim biomarkerom široke primene (Laird, 2003). Pokazano je da se detekcijom metilacije u panelu od nekoliko gena u sputumu ispitanika, uključujući i metilaciju gena *p16INK4a*, mogu selektovati osobe sa povećanim rizikom za nastanak karcinoma pluća (Palmisano i sar., 2000, Belinsky i sar., 2006). Metilacioni markeri mogu biti pogodni i za ranu detekciju kancerogenih promena, pa se tako prisustvo metilacije gena *TFPI2* (eng. *Tissue Factor Pathway Inhibitor 2*; TFPI2) i *GATA4* (eng. *GATA-Binding Protein 4*; GATA4) u molekulu DNK poreklom iz stolice može koristiti kao neinvazivni test za dijagnostiku kolorektalnog karcinoma (Glockner i sar., 2009, Hellebrekers i sar., 2009). Brojne studije su pokazale da metilacioni status specifičnih gena može biti pogodan prognostički faktor, kao i potencijalan prediktor odgovora na primenjenu terapiju (Tsai i Baylin, 2011). Tipičan primer je upotreba ispitivanja metilacionog statusa gena *MGMT* za procenu odgovora na terapiju

alkilirajućim agensima kod glioma (Hegi i sar., 2008). Terapeutici koji su trenutno u upotrebi u lečenju hematoloških neoplazmi usmereni su na inhibiciju proteina koji regulišu proces metilacije molekula DNK i mogu se podeliti na DNK-demetilujuće agense (azacitidin i decitabin) (Kaminskas i sar., 2005, Cashen i sar., 2010) i na inhibitore histondeacetilaza (vorinostat i romidepsin) (Stimson i sar., 2009). Pokazano je da se istovremenom primenom ove dve vrste terapeutika uspostavlja ponovna ekspresija gena *in vitro* uz pojačano anti-tumorsko dejstvo (Gore i sar., 2006). Pored toga, ovi agensi sa demetilujućom aktivnošću se mogu primeniti i u kombinaciji sa standardnim hemioterapeutcima (Tsai i Baylin, 2011).

Definisanje metilacionog profila, tj. „metilotipa“ svakog tumora, na osnovu koga bi se predvideo odgovor na primenjenu terapiju, tok i razvoj bolesti, značajno bi doprinelo kreiranju i primeni personalizovane terapije. Geni *p16INK4a* i *p14ARF* često se nalaze u okviru panela gena čiji se metilacioni status određuje u cilju definisanja CIMP fenotipa kod kolorektalnih karcinoma. Inaktivacija ova dva gena putem hipermetilacije promotrskih regiona rani je događaj tokom kolorektalne kancerogeneze (Trzeciak i sar., 2001, Chan i sar., 2002, Shen i sar., 2003, Samowitz i sar., 2005) i predstavlja važan događaj za patogenezu tumora debelog creva (Xing i sar., 2013, Chaar i sar., 2014). Nekoliko studija bavilo se ispitivanjem potencijalnih metilacionih markera u cilju predikcije odgovora na preoperativnu HRT kod obolelih od karcinoma rektuma (Williamson i sar., 2015), međutim prediktivna i prognostička uloga metilacionog statusa gena *p16INK4a* i *p14ARF* u ovom tipu tumora debelog creva nije u potpunosti utvrđena.

Mutacije gena *KRAS* takođe se detektuju kao rani događaj u kolorektalnoj kancerogenezi sa visokom učestalošću (Velho i sar., 2008), stoga su brojne studije ispitivale prognostički i prediktivni značaj njegovog mutacionog statusa u tumorima debelog creva (Andreyev i sar., 2001, Wang i sar., 2006, Van Cutsem i sar., 2010), ali su dobijeni rezultati kontradiktorni i zahtevaju dodatna ispitivanja. Mutacioni status gena *KRAS* koristi se kao molekularni marker odgovora na ciljanu terapiju metastatskog KRK monoklonskim antitelima usmerenim na inhibiciju receptora EGFR (Karapetis i sar., 2008, Bokemeyer i sar., 2011), dok potencijalni klinički značaj mutacionog statusa gena *KRAS* za predikciju odgovora na HRT kod karcinoma rektuma nije u potpunosti razjašnjen (Luna-Pérez i sar., 2000, Gaedcke i sar., 2010, Davies i sar., 2011, Garcia-Aguilar i sar., 2011, Duldulao i sar., 2013).

Imajući u vidu gorenavedene činjenice, analiza metilacionog statusa gena *p16INK4a* i *p14ARF* i mutacionog statusa gena *KRAS* pojedinačno ili u kombinaciji sa imunohistohemijski detektabilnim nivoom ekspresije odabranog seta proteina (EGFR, VEGF, Bcl-2 i Ki-67) može imati potencijalan klinički značaj, pogotovo kada je u pitanju predikcija odgovora na terapiju i prognoza kod obolelih od karcinomima rektuma u lokalno uznapredovalom stadijumu tretiranih preoperativnom HRT.

2. CILJ RADA

Ciljevi ovog rada su bili:

1. određivanje učestalosti aberantne metilacije gena *p16INK4a* i *p14ARF* u uzorcima tumorskog tkiva pre-tretmanskim biopsija obolelih od lokalno uznapredovalog KR;
2. određivanje učestalosti i detekcija tipova mutacija gena *KRAS* u navedenim uzorcima;
3. ispitivanje povezanosti metilacionog statusa gena *p16INK4a* i *p14ARF*, odnosno mutacionog statusa gena *KRAS* sa pojedinačnim kliničko-patološkim parametrima, uključujući: pol i starost ispitanika, stadijum bolesti i lokaciju tumora;
4. ispitivanje povezanosti metilacionog statusa gena *p16INK4a* i *p14ARF*, odnosno mutacionog statusa gena *KRAS* sa imunohistochemijski detektabilnim nivoom ekspresije proteina EGFR, VEGF, Bcl-2 i Ki67;
5. ispitivanje uticaja metilacije, odnosno mutacije analiziranih gena na odgovor na primenjenu terapiju, tok i ishod bolesti kod ispitanika sa KR;
6. procena eventualnog prediktivnog i prognostičkog značaja aberantne metilacije gena *p16INK4a* i *p14ARF*, odnosno mutacije gena *KRAS* kao biomarkera kod ovog tipa tumora debelog creva.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Materijal

3.1.1. Pacijenti i uzorci tkiva

Ovom studijom obuhvaćeno je 63 ispitanika obolelih od karcinoma rektuma u lokalno uznapredovalom stadijumu bolesti, koji su lečeni na Institutu za onkologiju Vojvodine - Sremska Kamenica, u periodu od 2006-2010. godine. Istraživanje je realizovano uz saglasnost Etičkog Komiteta Instituta za nuklearne nauke "Vinča" u Beogradu (odluka doneta 21.05.2018.). Uzorci za analizu su bili dostupni u vidu parafinskih isečaka tkiva, dobijenih endoskopskom biopsijom tkiva rektuma pri uspostavljanju dijagnoze i pre bilo kakvog tretmana. Nakon utvrđivanja kliničkog stadijuma bolesti, sprovedena je preoperativna hemioradioterapija (HRT) kod svakog pacijenta. Kombinovana terapija sastojala se od ukupne doze zračenja od 50,4 Gy podeljene na 28 frakcija (1,8 Gy po frakciji) uz istovremenu primenu terapije citostaticima 5-Fluorouracil (425 mg/m²) i Leukovorin (25 mg/m²) prema protokolu. Na kontrolnom pregledu elektromagnetnom-rezonancijom (EMR) male karlice utvrđen je efekat primenjene HRT kod svakog pacijenta i u slučaju pozitivnog terapijskog odgovora sproveden je operativni zahvat 8-10 nedelja nakon inicijalnog tretmana. Na osnovu histopatološkog pregleda postoperativnog tkiva, tumorski odgovor na preoperativnu hemioradioterapiju je klasifikovan kao povoljan (kompletna ili parcijalna remisija), ili nepovoljan (stacionarno stanje ili progresija bolesti). Kompletni odgovor (KO) podrazumeva potpuno odsustvo tumorske mase u hirurški odstranjenom tkivu, a parcijalni odgovor (PO) podrazumeva smanjenje tumorskog tkiva. Nepovoljan tumorski odgovor podrazumeva izostanak smanjenja tumorske mase - stacionarno stanje (SS) ili povećanje tumorskog tkiva, odnosno progresiju bolesti (PB) bez obzira na primenjenu HRT. Nakon operacije i postoperativnog patohistološkog pregleda, određen broj pacijenata je primio postoperativnu (adjuvantnu hemioterapiju), istim citostaticima prema Mayo režimu.

Kliničko-patološke karakteristike ispitanika, imunohistohemijski podaci, kao i podaci vezani za praćenje ishoda bolesti su prikupljeni iz medicinske dokumentacije gore navedene ustanove. Za analizu su korišćeni sledeći kliničko-patološki podaci ispitanika: 1) starost; 2) pol; 3) klinički stadijum bolesti, odnosno stepen proširenosti tumora prema TNM klasifikaciji; 4) lokacija tumora, utvrđena EMR pregledom (u gornjem, srednjem ili donjem rektumu); 5) odgovor na hemioradioterapiju na osnovu stepena smanjenja tumorske mase; 6) prisustvo lokalnih recidiva sa ili bez udaljenih metastaza (primenom biopsije sa histološkim pregledom ili EMR pregledom u periodu od 24 meseca nakon inicijalnog tretmana); 7) ukupno preživljavanje pacijenata za prosečan period praćenja od 23,5 meseca. Na preoperativnim i pretretmanskim biopsijskim uzorcima imunohistohemijski je određen nivo ekspresije proteina EGFR, VEGF, Bcl-2 i Ki-67. Na osnovu procenta tumorskih ćelija koje su ekspimirale proteine VEGF, Bcl-2 i Ki-67, proteinska ekspresija je označena kao odsutna (0-1% tumorskih ćelija), slaba (1,1-10% tumorskih ćelija), srednja (10,1-50% tumorskih ćelija), odnosno izražena (50,1-100% tumorskih ćelija). U slučaju proteina EGFR, ekspresija u 0-1% tumorskih ćelija je uzimana kao odsutna, u 1,1-25% kao slaba, u 25,1-50% ćelija kao srednja, a u 50,1-100% tumorskih ćelija kao izražena. U daljoj analizi rezultata, ekspresija prva tri proteina, detektovana u 0 do <10% tumorskih ćelija označena je kao niska, a ekspresija detektovana u ≥10% tumorskih ćelija kao visoka. U slučaju proteina EGFR, određena je granica za visoku ekspresiju od 25% i više tumorskih ćelija sa pozitivnom membranskom reakcijom bilo kog inteziteta. Navedeni podaci za svakog pacijenta su prikazani u Tabeli 3.1.

Tabela 3.1. Kliničko-patološke karakteristike obolelih od lokalno uznapredovalog KR

Broj uzorka	god./ pol	Stadijum/ Lokacija *	Odgovor na HRT/ recidivi i/ili metastaze	Ukupno preživljavanje (meseći)/ smrtni ishod	EGFR /VEGF ekspresija	Bcl-2/Ki-67 ekspresija
1	59/ž	TNM III/srednji	PB/DA	50/NE	odsutna/srednja	srednja/izražena
2	77/m	TNM III/gornji	SS/NE	55/NE	ND/ND	ND/ND
3	66/m	TNM III/donji	PO/NE	34/NE	odsutna/slaba	srednja/slaba
4	68/ž	TNM III/srednji	PB/DA	ND/DA	slaba/izražena	izražena/izražena
5	57/m	TNM II/srednji	SS/NE	22/NE	odsutna/srednja	odsutna/izražena
6	72/m	TNM II/gornji	PO/DA	18/NE	odsutna/odsutna	srednja/srednja
7	74/m	TNM II/gornji	PO/NE	77/NE	izražena/odsutna	odsutna/izražena
8	53/ž	TNM III/srednji	SS/NE	9/NE	slaba/izražena	izražena/srednja
9	74/ž	TNM III/srednji	PB/DA	24/DA	izražena/srednja	odsutna/srednja
10	68/m	TNM III/srednji	KO/NE	26/NE	slaba/odsutna	odsutna/slaba
11	72/m	TNM III/srednji	KO/DA	30/NE	slaba/odsutna	odsutna/izražena
12	55/ž	TNM III/srednji	PO/NE	24/NE	odsutna/odsutna	odsutna/izražena
13	82/m	TNM II/srednji	PO/NE	12/NE	odsutna/odsutna	odsutna/slaba
14	53/m	TNM II/donji	KO/NE	30/NE	slaba/odsutna	odsutna/izražena
15	63/m	TNM II/donji	SS/NE	30/NE	odsutna/izražena	odsutna/srednja
16	75/m	TNM II/donji	PO/DA	14/NE	srednja/odsutna	odsutna/slaba
17	59/ž	TNM II/gornji	PO/DA	46/DA	odsutna/odsutna	odsutna/izražena
18	64/m	TNM III/srednji	PO/NE	39/NE	srednja/slaba	srednja/srednja
19	66/m	TNM II/srednji	SS/ND	ND/NE	srednja/srednja	odsutna/izražena
20	52/ž	TNM III/srednji	SS/NE	33/NE	slaba/izražena	izražena/slaba
21	80/ž	TNM II/gornji	SS/DA	11/DA	slaba/srednja	odsutna/srednja
22	71/ž	TNM II/srednji	SS/DA	22/NE	slaba/srednja	srednja/izražena
23	54/ž	TNM III/gornji	SS/DA	101/NE	odsutna/srednja	odsutna/izražena
24	74/ž	TNM III/donji	PO/DA	9/NE	odsutna/slaba	odsutna/slaba
25	66/ž	TNM III/srednji	PO/NE	15/NE	odsutna/odsutna	odsutna/izražena
26	49/m	TNM III/donji	PO/NE	9/NE	slaba/odsutna	izražena/slaba
27	65/ž	TNM III/gornji	SS/DA	11/DA	ND/ND	ND/ND

28	55/m	TNM III/srednji	PB/DA	12/NE	izražena/srednja	srednja/srednja
29	70/ž	TNM III/srednji	PO/NE	55/NE	izražena/slaba	odsutna/srednja
30	58/m	TNM III/srednji	PO/NE	7/NE	srednja/odsutna	odsutna/srednja
31	66/m	TNM II/gornji	SS/NE	17/NE	odsutna/slaba	odsutna/izražena
32	70/m	TNM III/donji	PO/NE	34/NE	odsutna/odsutna	odsutna/slaba
33	55/m	TNM III/srednji	SS/NE	10/NE	slaba/srednja	odsutna/slaba
34	60/m	TNM II/srednji	KO/DA	39/NE	odsutna/srednja	odsutna/izražena
35	62/m	TNM III/donji	PO/NE	8/NE	odsutna/slaba	odsutna/slaba
36	63/ž	TNM III/srednji	SS/DA	ND/DA	srednja/odsutna	odsutna/izražena
37	62/ž	TNM III/srednji	SS/NE	23/NE	izražena/srednja	odsutna/srednja
38	71/m	TNM III/gornji	SS/NE	15/NE	izražena/srednja	odsutna/izražena
39	76/m	TNM II/srednji	SS/DA	25/NE	slaba/srednja	slaba/izražena
40	79/m	TNM III/srednji	SS/DA	9/DA	slaba/izražena	odsutna/izražena
41	64/m	TNM III/srednji	SS/NE	17/NE	slaba/izražena	izražena/izražena
42	50/ž	TNM III/gornji	PO/NE	44/NE	izražena/odsutna	odsutna/izražena
44	58/ž	TNM III/donji	SS/DA	14/DA	odsutna/srednja	odsutna/izražena
47	60/m	TNM III/srednji	PO/NE	47/NE	slaba/odsutna	slaba/izražena
48	58/ž	TNM III/srednji	PO/NE	30/NE	izražena/odsutna	odsutna/izražena
49	69/m	TNM II/srednji	PO/NE	23/NE	izražena/odsutna	odsutna/izražena
50	72/m	TNM II/gornji	PO/DA	ND/DA	odsutna/slaba	srednja/srednja
51	55/m	TNM II/srednji	SS/NE	10/NE	odsutna/srednja	izražena/srednja
52	59/m	TNM III/gornji	PO/NE	78/NE	odsutna/slaba	odsutna/slaba
53	55/m	TNM II/srednji	PB/DA	5/DA	odsutna/srednja	izražena/izražena
54	50/m	TNM III/donji	PO/NE	26/NE	odsutna/odsutna	odsutna/srednja
55	50/m	TNM III/donji	SS/NE	12/NE	srednja/izražena	slaba/izražena
56	54/ž	TNM II/gornji	PB/NE	19/NE	odsutna/srednja	slaba/izražena
57	67/ž	TNM II/donji	KO/NE	28/NE	odsutna/izražena	izražena/slaba
58	57/ž	TNM III/srednji	PO/DA	26/NE	odsutna/odsutna	slaba/slaba
59	67/m	TNM III/ND	PB/DA	2/DA	odsutna/srednja	izražena/izražena
60	74/m	TNM II/gornji	SS/NE	22/NE	slaba/slaba	odsutna/ srednja

61	62/m	TNM III/donji	PO/NE	9/NE	srednja/srednja	slaba/slaba
62	65/m	TNM II/srednji	PO/NE	67/NE	odsutna/slaba	odsutna/srednja
63	62/m	TNM III/srednji	SS/DA	41/DA	odsutna/srednja	srednja/izražena
64	71/m	TNM II/gornji	PO/NE	69/NE	slaba/odsutna	odsutna/izražena
65	70/ž	TNM III/srednji	PO/NE	51/NE	srednja/odsutna	odsutna/slaba
66	72/m	TNM III/gornji	PO/DA	ND/DA	slaba/slaba	srednja/slaba

*lokacija tumora, utvrđena kontrolnim EMR pregledom (u gornjem, srednjem ili donjem rektumu); HRT-hemioradioterapija; m-muški; ž-ženski; KO-kompletan odgovor; PO-parcijalni odgovor; SS-stacionarno stanje; PB-progresija bolesti; ND-podatak nije dostupan.

3.1.2. Kontrolni uzorci

U ispitivanje su bile uključene i odgovarajuće pozitivne i negativne kontrole. Kao standardno zdravo tkivo koristili smo limfocite periferne krvi zdravih osoba, čije su DNK služile kao pozitivne kontrole za potvrdu prisustva regiona gena *KRAS* od interesa u lančanoj reakciji polimeraze – PCR (eng. *Polymerase Chain Reaction*). Genomska DNK istog porekla, bisulfitno-modifikovana, služila je kao pozitivna kontrola za nemetilovane, odnosno kao negativna kontrola za metilovane alele gena *p16INK4a* i *p14ARF*. Ista DNK, metilovana *in vitro* upotrebom enzima M.SssI (*New England Biolabs*, SAD), a zatim i bisulfitno-modifikovana, služila je kao pozitivna kontrola za metilovane alele gena *p16INK4a* i *p14ARF*.

3.2. Metode

Za analizu metilacionog statusa gena *p16INK4a* i *p14ARF*, kao i mutacionog statusa gena *KRAS* korišćene su sledeće metode molekularne biologije:

1. izolacija genomske DNK iz isečaka tkiva karcinoma rektuma i limfocita periferne krvi zdravih osoba;
2. bisulfitna modifikacija izolovane genomske DNK;
3. *In vitro* metilacija molekula DNK izolovane iz limfocita periferne krvi;
4. umnožavanje željenih fragmenata molekula modifikovane DNK PCR tehnikom specifičnom za metilaciju, MSP (eng. *Methylation Specific PCR*), korišćenjem posebno dizajniranih prajmera za metilovanu, tj. nemetilovanu DNK;
5. analiza rezultata dobijenih u MSP reakcijama elektroforezom na agaroznim i poliakrilamidnim gelovima;
6. umnožavanje regiona od interesa gena *KRAS* lančanom reakcijom polimeraze – PCR;
7. provera rezultata dobijenih u PCR reakcijama elektroforezom na agaroznim i poliakrilamidnim gelovima;
8. detekcija mutacija gena *KRAS* automatskim sekvenciranjem metodom sekvenciranja u ponovljenim ciklusima (eng. *Thermal Cycling Sequencing*);
9. statistička obrada dobijenih rezultata.

3.2.1. Izolacija genomske DNK

Genomska DNK je iz svih uzoraka izolovana klasičnom fenol/hloroform/izoamil-alkohol procedurom (Ausubel, 1987). Nakon fenolske ekstrakcije, postupci za izolaciju DNK iz isečaka tkiva, odnosno limfocita periferne krvi su se donekle razlikovali. DNK iz isečaka tkiva je delimično fragmentisana, pa su zbog toga uzorci, nakon dodavanja amonijum acetata i izopropil-alkohola taloženi preko noći na -20°C .

3.2.1.1. Izolacija genomske DNK iz parafinskih isečaka tkiva

Pre same fenolske ekstrakcije genomske DNK, izvršena je deparafinizacija isečaka tkiva dobijenih biopsijom, a zatim je urađena digestija tkiva, kao i izolacija, taloženje i rastvaranje molekula DNK prema sledećem protokolu:

- svakom uzorku je dodato po 1 ml ksilola, kako bi se uklonio parafin, pa je lagano mućkano ručno 30 minuta, centrifugirano 5 min/15300 g, nakon čega je pažljivo uklonjen ksilol nastavkom;
- postupak sa dodavanjem ksilola je ponovljen, nakon mućkanja 15 min i centrifugiranja 5 min/17900 g je uklonjen ksilol;
- dodato je po 500 μl apsolutnog EtOH, lagano mućkano 5 min, centrifugirano 5 min/17900 g, nakon čega je pažljivo uklonjen EtOH nastavkom;
- postupak sa dodavanjem apsolutnog EtOH je ponovljen;
- nakon centrifugiranja 5 min/17900 g, EtOH je pažljivo uklonjen nastavkom;
- iseći tkiva su osušeni u otvorenim epruvetama pored plamenika, tokom 20 do 30 min;
- u svaki uzorak je dodato po 500 μl digestionog pufera koji u finalnoj koncentraciji sadrži 25 mM EDTA, pH 8,0; 100 mM NaCl; 10 mM TRIS-HCl, pH 8,0; 0,5 % SDS i 100 μg (19,6 mg/ml) proteinaze K (*MBI Fermentas*, Litvanija);
- uzorci su inkubirani preko noći na temperaturi $50-55^{\circ}\text{C}$, uz povremeno mućkanje. Veći komadi tkiva su zahtevali duže vreme inkubacije (do 48 h), i dodatne količine digestionog pufera i proteinaze K;
- u svaki uzorak (500 μl) dodata je ista količina smeše koja sadrži fenol/hloroform/izoamil-alkohol (F/H/I) u odnosu 25:24:1, nakon čega je mućkano ručno 10 min, uzorci su zatim centrifugirani 5 min/10600g, pa je izdvojena vodena faza nastavkom sa odsečenim vrhom, i prebačena u novu epruvetu;
- postupak sa fenolom je ponovljen još 1-2 x;
- vodenoj fazi je dodata ista zapremina smeše H/I (24:1), nakon čega je mućkano ručno 10 min i centrifugirano 5 min/10600 g;
- vodena faza je izdvojena u novu epruvetu;
- svakom uzorku u vodenoj fazi je dodato po 1/2 zapremine 7,5M amonijum acetata (*Serva*, Nemačka) i 2 zapremine izopropil-alkohola, nakon čega su uzorci ostavljeni na -20°C da se DNK taloži preko noći;
- uzorci su centrifugirani 20 min/12000g/ 4°C , odliven je supernatant i dodato je 1/2 zapremine hladnog 70% EtOH;
- uzorci su centrifugirani 15 min/12000g/ 4°C , odliven je supernatant, epruvete su ostavljene otvorene pored plamenika 15-30 min. dok sav EtOH ne upari;
- Izolovana DNK je rastvorena u odgovarajućoj zapremini (20-50 μl) ddH₂O, nakon čega je odložena na 4°C .

3.2.1.2. Izolacija genomske DNK iz limfocita periferne krvi

Nakon fenolske ekstrakcije DNK iz taloga limfocita periferne krvi, prethodno dobijenog prema protokolu koji je opisao Boyum (1968), taloženje i rastvaranje DNK je uključivalo sledeće korake:

- vodenoj fazi je dodata 1/10 zapremine 3 M natrijum acetata, pH 5,2 i 2 zapremine hladnog apsolutnog EtOH, nakon čega je, uz ručno mućkanje, došlo do precipitacije DNK u vidu končića;
- makroskopski vidljivi končići DNK su zatim namotani na staklenu Pasterovu pipetu, zatopljenog i zakrivljenog vrha;
- DNK je isprana uranjanjem Pasterove pipete u 70% EtOH, a zatim je sušena na vazduhu 15 min, rastvorena u 100-200 µl ddH₂O i odložena na 4°C.

3.2.1.3. Određivanje koncentracije izolovane genomske DNK

Koncentracija i kvalitet izolovane DNK određeni su merenjem apsorbance na spektrofotometru BioSpec-nano (*Shimadzu Corporation*, Japan). Maksimum apsorbance za nukleinske kiseline je na 260 nm i na osnovu njega se računa koncentracija DNK u našem izolatu (1OD = 50 ng). Maksimum apsorbance soli je na 230 nm, a za proteine na 280 nm. Visoko prečišćena DNK ima odnos apsorbanci $A_{260}/A_{280} > 1,8$ (Glasel, 1995), što je bio slučaj i sa našim uzorcima.

3.2.2. *In vitro* metilacija molekula DNK izolovane iz limfocita periferne krvi

U cilju dobijanja kontrolne DNK, kod koje će sve CpG pozicije biti metilovane, DNK izolovana iz limfocita periferne krvi zdravih osoba tretirana je komercijalnim enzimom CpG metiltransferazom M.SssI (*New England Biolabs*, SAD). Reakcija se odvijala u zapremini od 20 µl. Na 2 µg izolovane DNK iz limfocita periferne krvi zdravih osoba, dodata su 2 µl 10 x NE pufera (finalna koncentracija 10 mM Tris-HCl, pH 7,9, 50 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT), 0,4 µl 32 mM SAM (finalna koncentracija 0,64 mM) i 8 j enzima M.SssI (4 j/µg DNK). Uzorci su inkubirani 4 h/37°C, nakon čega je usledila inaktivacija enzima dodatnim inkubiranjem 20 min/65°C. Tako metilovana DNK je čuvana na 4°C do bisulfitne modifikacije.

3.2.3. Bisulfitna modifikacija izolovane DNK

Izolovana DNK je modifikovana korišćenjem *EZ DNA Methylation-LightningTM* kit-a (*Zymo Research*, SAD). Ova metoda zasniva se na hemijskoj modifikaciji citozina, čime se nemetilovani citozini prevode u uracil, dok metilovani citozini ne podležu ovoj modifikaciji. Za modifikaciju je uzimano od 100 - 500 ng DNK u zapremini od 20 µl. Postupak modifikacije je izvršen po protokolu preporučenom od strane proizvođača:

- svakom uzorku je dodato po 130 µl LCR (eng. *Lightning Conversion Reagent*); lagano je promućkano ručno i centrifugirano kratko (>10000g/30 s), nakon čega su tube stavljane u PCR aparat, kako bi se izvršila bisulfitna modifikacija, pod sledećim uslovima: 98°C/8 min; 54°C/60 min; 4°C/ do 20 h;
Nakon bisulfitne modifikacije, DNK je prečišćena sledećim postupkom:
- dodato je 600 µl MBB (eng. *M-Binding Buffer*) na *Zymo-SpinTM* kolonicu, pa je kolonica stavljena u tubu za prikupljanje;

- modifikovani uzorak je dodan na *Zymo-Spin*TM kolonicu koja sadrži MBB, pa je ceo sadržaj promešan okretanjem kolonice nekoliko puta;
- uzorci su centrifugirani na maksimalnoj brzini (>10000g/30 s), pa je rastvor odliven;
- dodato je 100 µl MWB (eng. *M Washing Buffer*) na kolonicu, pa su uzorci centrifugirani na maksimalnoj brzini (>10000g/30 s);
- dodato je 200 µl LDB (eng. *L-Desulphonation Buffer*) na kolonicu, nakon čega su uzorci ostavljeni na sobnoj temperaturi 15-20 min. Uzorci su zatim centrifugirani na maksimalnoj brzini (>10000g/30 s);
- na svaku kolonicu je dodato 200 µl MWB, pa su uzorci centrifugirani na maksimalnoj brzini (>10000g/30 s). Ovaj korak ispiranja je ponovljen;
- kolonice su stavljene na tube od 1,5 ml i svuda je dodato 10 µl MEB (eng. *M-Elution Buffer*), direktno na matriks kolonice. Nakon toga su tubice sa kolonama centrifugirane na maksimalnoj brzini (>10000g/30 s) kako bi se eluirala DNK.
- ovako modifikovana i prečišćena DNK je čuvana na -20°C i predstavljala je uzorak za amplifikaciju MSP tehnikom.

3.2.4. Amplifikacija molekula DNK MSP tehnikom

Metilacioni status gena *p16INKa* i *p14ARF* ispitivan je amplifikacijom modifikovane DNK PCR tehnikom specifičnom za metilaciju - MSP. Za razlikovanje nemetilovanih od metilovanih promotrskih regiona analiziranih gena, korišćena su dva seta prajmera, specifičnih za nemetilovanu, odnosno metilovanu modifikovanu DNK. Za svaki uzorak modifikovane DNK izvedene su po dve PCR reakcije za odgovarajući gen, upotrebom dva seta prajmera. U Tabeli 3.2 su prikazane sekvence prajmera koji su korišćeni za amplifikaciju gena *p16INKa* (Herman i sar., 1996) i *p14ARF* (Esteller i sar., 2000).

Tabela 3.2. Prajmeri za MSP

Parovi prajmera	Sekvence prajmera (5'→3')	Dužina produkta /Temp. hibridizacije
<i>p16m</i>	s TTATTAGAGGGTGGGGCGGATCGC a GACCCCGAACCGCGACCGTAA	150 bp / 65°C
<i>p16n</i>	s TTATTAGAGGGTGGGGTGGATTGT a CAACCCCAAACCACAACCATAA	151 bp / 60°C
<i>p14m</i>	s GTGTAAAGGGCGGCGTAGC a AAAACCCTCACTCGCGACGA	122 bp / 62°C
<i>p14n</i>	s TTTTGGGTGTTAAAGGGTGGTGTAGT a CACAAAAACCCTCACTCACAACAA	132 bp / 60°C

m-metilovani; n-nemetilovani; s-sense; a-antisense; bp-bazni par.

Pored uzoraka, korišćene su i odgovarajuće kontrole PCR reakcije: tzv. „slepa kontrola“ za proveru specifičnosti reakcije (ddH₂O umesto DNK), pozitivna i negativna kontrola za uzorke (nemetilovana i *in vitro* metilovana DNK iz limfocita zdravih osoba). MSP je izvođen na PCR aparatu Applied Biosystems 2720 (*Applied Biosystems*, SAD) u Eppendorf epruветama (0,2 ml) u finalnoj zapremini od 25 µl. Amplifikacija se odvijala u toku 40 ciklusa koji su se sastojali od denaturacije DNK (45 s na 95°C), hibridizacije (45 s na odgovarajućoj temperaturi u zavisnosti od korišćenih prajmera, Tabela 3.2) i elongacije (60 s na 72°C) prajmera. Prvi ciklus amplifikacije je započet sa 5 min inicijalne denaturacije na 95°C, a u poslednjem je elongacija produžena na 4 min

na 72°C. Za svaku PCR reakciju su pripremljeni odgovarajuće PCR smeše u čiji sastav ulaze komponente prikazane u Tabeli 3.3.

Tabela 3.3. Sastav smeše za MSP

Komponente		Finalna koncentracija u 25 µl	
10 x PCR pufer*		1 x	
25 mM MgCl ₂		6,7 mM	
10 mM dNTP		1,25 mM	
50 µM <i>p16 sense</i> prajmeri	20 µM <i>p14 sense</i> prajmeri	0,8 µM (za <i>p16</i>)	0,6 µM (za <i>p14</i>)
50 µM <i>p16 antisense</i> prajmeri	20 µM <i>p14 antisense</i> prajmeri	0,8 µM (za <i>p16</i>)	0,6 µM (za <i>p14</i>)
100% DMSO		5%	
20 mg/ml BSA		0,4 mg/ml	

*pufer koji je korišćen za PCR je napravljen prema protokolu koji su dali Herman i sar., (1996) i omogućava specifičnu i visoko efikasnu amplifikaciju. MgCl₂ koji prema originalnom protokolu ulazi u sastav 1 x PCR pufera je dodavan posebno u PCR reakcionu smešu. Sastav 10 x pufera: 16,6 mM amonijum sulfat, 67 mM Tris-HCl pH 8,8, 10 mM 2-merkaptoetanol.

Nakon dodavanja i mešanja svih komponenata, jednaka zapremina reakcione smeše je razdeljena u epruvete za PCR, nakon čega je dodato po 1/10 – 2/10 zapremine modifikovane DNK. Epruvete su u aparatu za PCR zagrevane 5 min/95°C (inicijalna denaturacija) i nakon isteka ovog vremena u svaku epruvetu je dodata po 1 jedinica *Taq* polimeraze (*Thermo Scientific*, SAD) razblažene u 2,8 µL ddH₂O, u tzv. „hot start“ reakciji.

3.2.5. Amplifikacija regiona egzona 2 gena *KRAS*

U cilju pripreme izolovane DNK iz tumorskog tkiva za sekvenciranje, izvedena je reakcija umnožavanja regiona gena *KRAS* od interesa PCR tehnikom. U tu svrhu, korišćeni su prajmeri specifični za kratak region egzona 2 (Stanojević i sar., 2011, Tabela 3.4), kojim su obuhvaćena mutacijom najčešće pogođena mesta u okviru kodona 12 i 13.

Tabela 3.4. Prajmeri za utvrđivanje mutacionog statusa gena *KRAS*

Par prajmera	Sekvence prajmera (5'→3')	Dužina produkta/ Temp. hibridizacije
<i>KRAS</i> egzon 2	<i>s</i> GTCACATTTTCATTATTTTATTATAAG <i>a</i> CTGTATCGTCAAGGCACTCTT	105 bp / 51°C

s-sense; a-antisense; bp-bazni par.

Reakcija umnožavanja regiona od interesa je izvođena na PCR aparatu *Applied Biosystems 2720* (*Applied Biosystems*, SAD) u Eppendorf epruvetama (0,2 ml) u finalnoj zapremini od 25 µl. Amplifikacija se odvijala u toku 40 ciklusa koji su se sastojali od denaturacije DNK (30 s na 94°C), hibridizacije (30 s na 51°C) i elongacije (30 s na 72°C). Prvi ciklus amplifikacije je započet sa 5 min inicijalne denaturacije na 95°C, a u poslednjem je finalana elongacija produžena na 4 min na 72°C. Za svaku PCR reakciju su pripremljene odgovarajuće PCR smeše u čiji sastav ulaze komponente prikazane u Tabeli 3.5.

Tabela 3.5. Komponente PCR reakcije za amplifikaciju egzona 2 gena KRAS

Komponente	Finalna koncentracija u 25 μ l
10 x GoldBuffer (<i>Applied Biosystems</i> , SAD)	1 x
25 mM MgCl ₂	1,5 mM
10 mM dNTP	0,2 mM
10 μ M <i>sense</i> prajmer	0,2 μ M
10 μ M <i>antisense</i> prajmer	0,2 μ M
Taq Gold Polymerase	0.625 j

Za potvrdu prisustva i uspešnost amplifikacije gena *KRAS*, kao pozitivna kontrola korišćena je DNK izolovana iz limfocita periferne krvi zdrave osobe. Za kontrolu specifičnosti PCR reakcije korišćena je slepa proba koja umesto DNK sadrži odgovarajuću zapreminu ddH₂O.

3.2.6. Utvrđivanje mutacionog statusa gena *KRAS* automatskim sekvenciranjem Sangerovom metodom

Nakon elektroforeze i vizuelizacije PCR produkata na agaroznim i poliakrilamidnim gelovima (postupak opisan u odeljku 3.2.7.), uzorci su prečišćeni i sekvencirani na Institutu za mikrobiologiju i imunologiju, Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu. Kako bi se dobili što precizniji rezultati sekvenciranja, PCR produkti su prvo bili prečišćeni od zaostalih komponenata reakcije i u tu svrhu korišćen je *Qiagen Minielute PCR purification* kit (*Qiagen*, Nemačka) prema uputstvu proizvođača. Automatsko sekvenciranje kratkog fragmenta egzona 2 gena *KRAS* u oba smera (upotrebom istih prajmera koji su korišćeni i za amplifikaciju pomenutog regiona gena *KRAS*, Tabela 3.4) rađeno je na automatskom sekvenatoru (ABI 310, *Applied Biosystems*, SAD) metodom sekvenciranja u ponovljenim ciklusima. Metoda je bazirana na kapilarnoj elektroforezi sa fluorescentno obeleženim ddNTP-ovima (Sanger i sar., 1997). Za svaki uzorak (po 2 μ l prečišćenog PCR produkta), lančana reakcija sekvenciranja izvodila se upotrebom *BigDye Terminator system v3.1 ready reaction* kit-a (*Applied Biosystem*, SAD) prema uputstvu proizvođača. Rezultati automatskog sekvenciranja, dobijeni u vidu grafičkog i slovnog zapisa (elektroferogram), su detaljno analizirani uz pomoć softvera *Finch TV Ver. 1.4*.

3.2.7. Analiza uspešnosti i specifičnosti PCR reakcija metodom gel-elektroforeze

Detekcija produkata PCR reakcije za gena *KRAS*, kao i MSP reakcije za gene *p16INK* i *p14ARF*, vršena je gel-elektroforezom na agaroznom i poliakrilamidnom gelu. U ovom radu, fragmenti su razdvajani na osnovu njihove dužine. Utvrđivanje veličine ispitivanih fragmenata je vršeno u odnosu na odgovarajući marker.

3.2.7.1. Elektroforeza na agaroznom gelu

Provera uspešnosti PCR reakcija je rađena na 1,8% agaroznom gelu koji je pripreman prema sledećem protokolu prikazanom u Tabeli 3.6.

Tabela 3.6. Komponente za pripremu agaroznog gela

komponente za 2% gel	količina(50 ml)
Agarozna	0,9 g
10xTAE*	5 ml
SYBR Green I (<i>Sigma</i> , USA)	5 µl
ddH ₂ O	45 ml

*10xTAE pufer, pH 8,0 (48,4 g Tris, 11,42 ml CH₃COOH, 20 ml 0,5 M EDTA, ddH₂O do 1000 ml).

Razdvajanje fragmenata DNK odvijalo se na sistemu za horizontalnu elektroforezu u električnom polju jačine 120 V (7,5 V/cm) u trajanju od 40 min. Na gel je nanošeno po 10 µl uzorka pomešanog sa 2 µl boje bromfenol plavo (0,25% bromfenol plavo, 0,25% ksilen-cijanolo u 30% glicerolu). Za detekciju dužine PCR produkata na gelu korišćen je marker *GeneRuler 50 bp* (*Thermo Scientific*, SAD). Vizuelizacija traka nakon elektroforeze odvijala se pod UV-svetlošću transiluminatora.

3.2.7.2. Elektroforeza na poliakrilamidnom gelu

Razdvajanje fragmenata DNK i analiza rezultata PCR reakcije, vršena je elektroforezom na 6% poliakrilamidnom (PAA) gelu u nenedenaturišućim uslovima. Gel je pripreman prema protokolu prikazanom u Tabeli 3.7.

Tabela 3.7. Komponente za pripremu poliakrilamidnog gela

komponente za 6% gel	količina (25 ml)
PAA štok* 40%	5 ml
10 x TBE**	2,5 ml
10% amonijum persulfat	210 µl
N, N, N', N' TEMED	16 µl
ddH ₂ O	17,5 µl

*38:2 (akrilamid:bis-akrilamid); **10 x TBE pufer, pH 8,3 (108 g Tris, 55 g H₃BO₃, 40 ml 0,5 M EDTA, pH 8,0, ddH₂O do 1000 ml).

Elektroforeza se odvijala u vertikalnom polju u kadama sa 1x TBE puferom, u trajanju od 5 min/90 V (4 V/cm), a zatim 75 min/140 V (7,5 V/cm). Na gel je nanošeno po 10 µl uzorka pomešanog sa 2 µl boje bromfenol plavo (0,25% bromfenol plavo, 0,25% ksilen-cijanolo u 30% glicerolu). Za detekciju dužine PCR produkata na gelu korišćen je marker *GeneRuler 50 bp* (*Thermo Scientific*, SAD). Vizuelizacija razdvojenih DNK fragmenata na gelu izvršena je postupkom bojenja srebronitratom prema sledećem protokolu (Hiort i sar., 1994):

- 10% rastvor EtOH, 5-10 min;
- 1% rastvor HNO₃, 3 min;
- ispiranje u ddH₂O, 2-3x po 1 min;
- 0,2% rastvor AgNO₃ (500 mg AgNO₃ u 250 ml ddH₂O), 20-30 min;
- ispiranje u ddH₂O, 2-3x po 1 min;
- 2,96% Na₂CO₃ sa 0,02% formaldehidom (9 g Na₂CO₃/300 ml ddH₂O + 227 µl formaldehida), do pojave traka;
- fiksiranje u 10% CH₃COOH, nekoliko minuta;
- ispiranje u ddH₂O i pakovanje gela u plastičnu foliju.

3.2.8. Statistička obrada rezultata

Dobijeni rezultati su obrađeni i prikazani u tabelama i na grafikonima uz propratnu diskusiju istih, a u zavisnosti od prirode posmatrane varijable. Deskripcija numeričkih obeležja je urađena klasičnim metodama opisne statistike i to aritmetičkom sredinom, i medijanom od srednjih vrednosti, a od mera varijabiliteta standardnom devijacijom, koeficijentom varijacije i standardnom greškom, kao i minimalnom i maksimalnom vrednošću. Relativni brojevi su korišćeni u svim tabelama. U analizi rezultata, u zavisnosti od prirode samih varijabli, korišćeni su Pirsonov χ^2 -test, i to u obliku testova slaganja i tablica kontingencija, za poređenje razlike između učestalosti kod neparametarskih obeležja i to za jedno odnosno dva obeležja. Kod numeričkih ograničenja tablice 2x2 primenjen je Fišerov egzaktni test. Za poređenje prosečnih vrednosti parametarskih obeležja upotrebljen je Studentov t-test za dve grupe podataka. U svim primenjenim analitičkim metodama prihvaćeni nivo statističke značajnosti je bio $p \leq 0,05$. Za obradu podataka je korišćen licencirani program za statističku analizu Sigma Plot 10.0.

4. REZULTATI

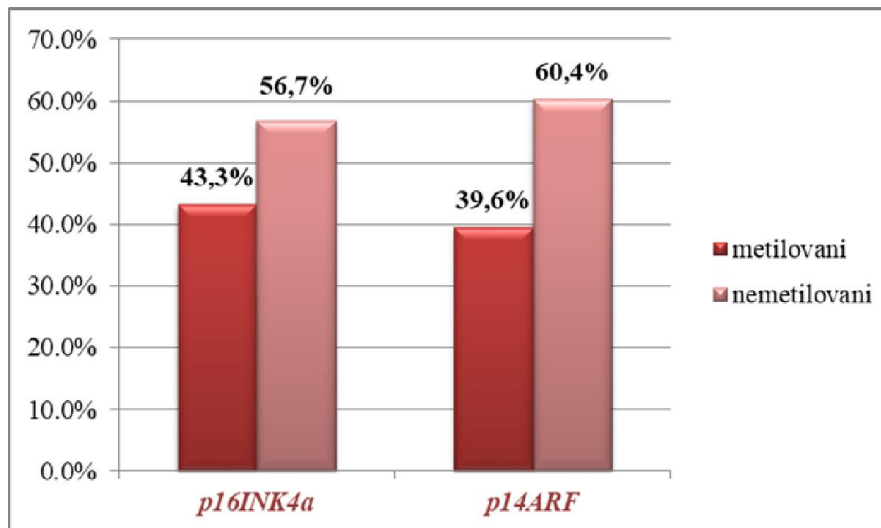
4.1. Analiza kliničko-patoloških karakteristika bolesnika sa KR

Grupa obolelih od karcinoma rektuma je obuhvatala 63 ispitanika, čija je prosečna starost iznosila $64 \pm 8,4$ godine (opseg 49-82). Grupa se sastojala od 23 (36,5%) ispitanika ženskog i 40 (63,5%) ispitanika muškog pola, čija se prosečna starost nije statistički značajno razlikovala ($62,6 \pm 8,2$ vs. $64,9 \pm 8,5$ godina, $p=0,287$). Prema TNM klasifikaciji stadijuma karcinoma, 23/63 (36,5%) tumora je pripadalo stadijumu TNM II, a kod 40/62 (63,5%) obolelih je bio prisutan tumor u stadijumu TNM III. Kod 13/62 (21%) bolesnika tumor je bio lokalizovan u donjoj polovini rektuma (do 7 cm od anokutane linije), kod 16/62 (25,8%) bolesnika u gornjoj polovini rektuma (preko 7 cm od anokutane linije), dok je kod 33/62 (53,2%) bolesnika tumor zahvatao oba segmenta rektuma (srednji rektum, do i preko 7 cm od anokutane linije). Podaci o imunohistohemijskoj ekspresiji EGFR, VEGF, Bcl-2 i Ki-67 proteina su bili dostupni za 61/63 pacijenta. Prema kriterijuma navedenim u poglavlju 3, Materijal i metode, niska ekspresija proteina EGFR je zabeležena kod 72,1% (44/61) obolelih, a visoka ekspresija ovog parametra kod 27,9% (17/61) obolelih. Niska ekspresija proteina VEGF uočena je kod 52,5% (32/61) ispitanika, dok je visoka ekspresija proteina VEGF uočena kod 47,5% (29/61) ispitanika. U slučaju proteina Bcl-2, kod 70,5% (43/61) obolelih zabeležena je niska ekspresija, a kod 29,5% (18/61) obolelih visoka ekspresija. Niska ekspresija parametra Ki-67 uočena je kod 26,2% (16/61) pacijenata, a visoka ekspresija ovog parametra kod 73,8% (45/61) ispitanika.

Povoljan odgovor na terapiju (KO/PO) uočen je kod 32/63 (50,8%) ispitanika, dok je nepovoljan odgovor (SS/PB) na preoperativnu hemioradioterapiju zabeležen kod 31/63 (49,2%). Do pojave lokalnih recidiva i/ili udaljenih metastaza tokom trajanja studije je došlo kod 24/62 (38,7%) bolesnika, a do smrtnog ishoda, kao posledice kancera, kod 13/62 (21%). Podaci o lokalizaciji tumora, pojavi recidiva i/ili metastaza i konačnom ishodu su nedostajali za jednog pacijenta.

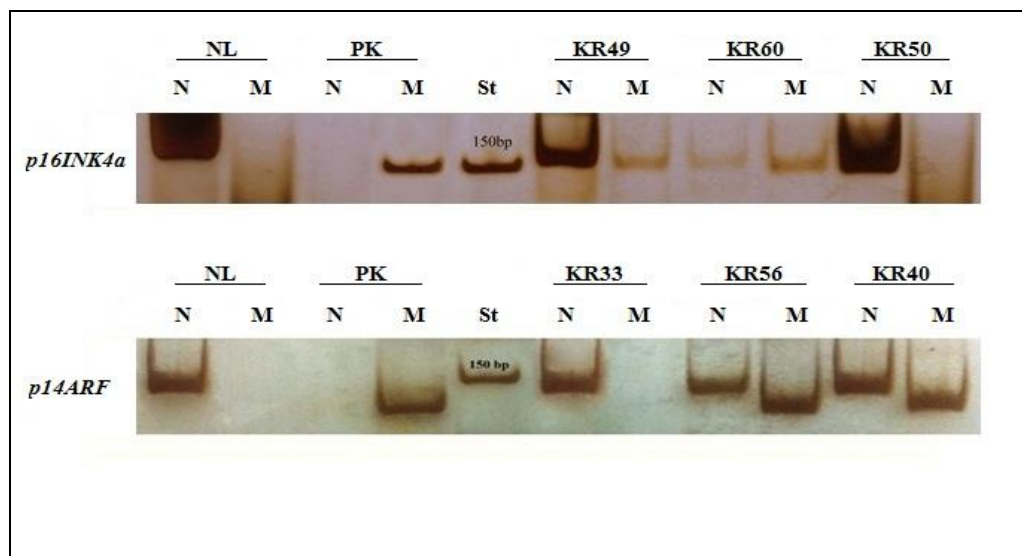
4.2. Ispitivanje metilacionog statusa gena *p16INK4a* i *p14ARF* u uzorcima tkiva KR

Metilacioni status gena *p16INK4a* uspešno je utvrđen kod 60 od ukupno 63 ispitanika, dok je metilacioni status gena *p14ARF* određen kod 58 od ukupno 63 ispitanika. Metilacija promotorskih regiona gena *p16INK4a* i *p14ARF* bila je prisutna u 43,3% (26/60), odnosno u 39,6% (23/58) slučajeva (Slika 4.1). Istovremena metilacija oba gena detektovana je u 18,9% (11/58) slučajeva, dok je kod 65,5% (38/58) pacijenata detektovan bar jedan metilovan gen. Kod 36,2% (21/58) obolelih nije detektovana metilacija ni jednog od analiziranih gena.



Slika 4.1. Metilacioni profil ispitivanih uzoraka karcinoma rektuma

Metilacioni status analiziranih gena nakon MSP reakcije i elektroforeze određen je na osnovu prisustva specifičnih traka koje odgovaraju metilovanim, odnosno, nemetilovanim alelima. Metilacija analiziranih gena nije uočena ni u jednoj kontrolnoj DNK poreklom iz limfocita periferne krvi zdravih osoba, dok je kod kontrolnih DNK prethodno metilovanih *in vitro* potvrđeno prisustvo metilovanih alela gena *p16INK4a* i *p14ARF*. Kod skoro svih uzoraka detektovana je i specifična traka koja odgovara nemetilovanim alelima analiziranih gena različitog inteziteta obojenosti, što ukazuje na različitu proporciju metilovanih i nemetilovanih alela gena *p16INK4a* i *p14ARF* u tumorskom tkivu. Na Slici 4.2 predstavljeni su odabrani uzorci, razdvojeni elektroforezom na 6% PAA gelu.



Slika 4.2. Rezultati MSP za gene *p16INK4a* i *p14ARF* za uzorke KR. Traka u koloni N ukazuje na prisustvo nemetilovanog (151, odnosno, 132 bp), a traka u koloni M na prisustvo metilovanog alela (150, odnosno, 122 bp) za odgovarajuće gene; NL, neizmenjeni limfociti kao pozitivna kontrola za nemetilovane alele analiziranih gena; PK, DNK iz normalnih limfocita metilovana *in vitro*, kao pozitivna kontrola za metilovane alele oba gena; St, molekularni marker (50 bp); KR, DNK izolovana iz uzoraka tkiva obolelih od karcinoma rektuma.

4.2.1. Ispitivanje povezanosti metilacionog statusa gena *p16INK4a* i *p14ARF* sa kliničko-patološkim i imunohistohemijskim karakteristikama obolelih

Rezultati ispitivanja povezanosti metilacionog statusa gena *p16INK4a* i *p14ARF* sa kliničko-patološkim i imunohistohemijskim karakteristikama obolelih su prikazani u Tabeli 4.1. Bolesnici sa metilovanim, odnosno nemetilovanim genima *p16INK4a* i *p14ARF* se nisu statistički značajno razlikovali po starosti, mada je grupa ispitanika sa metilovanim *p14ARF* bila nešto starija (66,7±8,0 vs. 62,9±8,7, p=0,095). Pokazano je da metilacija gena *p16INK4a* i *p14ARF* ne zavisi od pola bolesnika (p=0,797; p=0,923), kao i da metilacija ispitivanih gena nije povezana sa lokalizacijom tumora (p=0,828; p=0,824), i TNM stadijumom (p=0,827; p=0,923). Analizom rezultata nije utvrđena statistički značajna povezanost metilacionog statusa gena *p16INK4a* i *p14ARF* sa različitim nivoima ekspresije četiri imunohistohemijska parametra (p>0,05 u svim testovima). Ipak, primećeno je da se metilacija gena *p16INK4a* češće javlja kod obolelih sa visokom ekspresijom EGFR (58,8% vs. 39%) i Ki-67 (51,2% vs. 26,7%), kao i kod ispitanika sa nižom ekspresijom proteina VEGF (53,3% vs. 35,7%) i bcl-2 (50% vs. 33,3%). Metilacija gena *p14ARF* je sa približno jednakom učestalošću detektovana kod ispitanika sa visokim i niskim nivoima ekspresije svih imunohistohemijskih parametara.

Tabela 4.1. Metilacioni status gena *p16INK4a* i *p14ARF* u korelaciji sa kliničko-patološkim i imunohistohemijskim karakteristikama obolelih od KR

Kliničko-patološki i imunohistohemijski parametri	Metilacioni status <i>p16INK4a</i>			Metilacioni status <i>p14ARF</i>		
	M	N	P	M	N	P
Starost (god. median)	63,846 ±9.124	64,647 ± 8.082	0,720	66,7 ± 8,0	62,9 ± 8,7	0,095
Pol						
Muški	18/38 (47,4%)	20/38 (52,6%)	0,797	14/37 (37,8%)	23/37 (62,2%)	0,923
Ženski	8/22 (36,4%)	14/22 (63,6%)		9/21(42,9%)	12/21 (57,1%)	
Lokalizacija tumora						
Donji (≤ 7 cm)	6/13 (46,1%)	7/13 (53,8%)	0,828	6/13 (46,1%)	7/13 (53,8%)	0,824
Gornji (> 7 cm)	7/14 (50%)	7/14 (50%)		11/30 (33,7%)	19/30 (63,3%)	
Srednji (<7> cm)	13/32 (40,6%)	19/32 (59,4%)		6/14 (42,9%)	8/14 (57,1%)	
TNM stadijum						
TNM II	9/21 (42,9%)	12/21 (57,1%)	0,827	9/21 (42,9%)	12/21 (57,1%)	0,827
TNM III	17/39 (43,6%)	22/39 (56,4%)		14/37 (37,8%)	23/37 (62,2%)	
Ekspresija EGFR						
Niska (< 25%)	16/41 (39%)	25/41 (61%)	0,276	14/40 (35%)	26/40 (65%)	0,760
Visoka (≥ 25%)	10/17 (58,8%)	7/17 (41,2%)		7/16 (43,7%)	9/16 (56,3%)	
Ekspresija VEGF						
Niska (< 10%)	16/30 (53,3%)	14/30 (46,7%)	0,278	11/29 (37,9%)	18/29 (62,1%)	0,836
Visoka (≥ 10%)	10/28 (35,7%)	18/28 (64,3%)		10/27 (37%)	17/27 (63%)	
Ekspresija Bcl-2						
Niska (< 10%)	20/40 (50%)	20/40 (50%)	0,371	15/39 (38,5%)	24/39 (61,5%)	0,940
Visoka (≥ 10%)	6/18 (33,3%)	12/18 (66,7%)		6/17 (35,3%)	11/17 (64,7%)	
Ekspresija Ki-67						
Niska (< 10%)	4/15 (26,7%)	11/15 (73,3%)	0,180	5/15 (33,3%)	10/15 (66,7%)	0,938
Visoka (≥ 10%)	22/43 (51,2%)	21/43 (48,8%)		16/41 (39%)	25/41 (61%)	

M-metilovani; N-nemetilovani; p-verovatnoća statističke značajnosti je ispitivana Studentovim t-testom, Fišerovim egzaktnim testom i Pirsonovim χ^2 -testom.

U cilju daljeg ispitivanja eventualnog značaja metilacije kao epigenetičke modifikacije genske aktivnosti za patogenezu KR, poredili smo grupu ispitanika kod kojih je detektovana

metilacija najmanje jednog od analiziranih gena (*p16m/p14m*, *p16m/p14n*, *p16n/p14m*) sa grupom u kojoj su oba gena bila nemetilovana (*p16n/p14n*). Takođe, izdvojili smo i grupu ispitanika sa oba metilovana gena (*p16m/p14m*) i poredili je sa grupom u kojoj su oba gena bila nemetilovana (*p16n/p14n*). Navedene grupe smo analizirali u kombinaciji sa odgovarajućim kliničko-patološkim karakteristikama i imunohistohemijskim podacima. Dobijeni rezultati nisu bili statistički značajni (Prilog 1, Tabele 1 i 2).

4.2.2. Ispitivanje povezanosti metilacionog statusa gena *p16INK4a* i *p14ARF* sa odgovorom na preoperativnu hemioradioterapiju, tokom i ishodom bolesti

Rezultati ispitivanja povezanosti metilacionog statusa gena *p16INK4a* i *p14ARF* sa odgovorom na terapiju, tokom i ishodom bolesti su prikazani u Tabeli 4.2. Metilacioni status gena *p16INK4a* i *p14ARF* nije imao uticaj na odgovor bolesnika na preoperativnu hemioradioterapiju ($p=1,000$), kao ni na krajnji ishod bolesti u toku perioda praćenja ($p=0,870$). Iako je veća učestalost metilacije gena *p16INK4a* detektovana u grupi pacijenata bez pojave recidiva i/ili metastaza (51,4% vs. 33,3%), a veća učestalost metilacije gena *p14ARF* u grupi sa prisutnim lokalnim recidivima i/ili udaljenim metastazama (54,2% vs. 30,3%), uočene razlike nisu bile statistički značajne ($p>0,05$ u oba slučaja).

Tabela 4.2. Povezanost metilacionog statusa gena *p16INK4a* i *p14ARF* sa odgovorom na terapiju, tokom i ishodom bolesti

Kliničko-patološki parametri	Metilacioni status <i>p16INK4a</i>			Metilacioni status <i>p14ARF</i>		
	M	N	P	M	N	P
Odgovor na HRT						
Povoljan (KO/PO)	15/30 (50%)	15/30 (50%)	0,434	11/29 (37,9%)	18/29 (62,1%)	1,000
Nepovoljan (SS/PB)	11/30 (36,7%)	19/30 (63,3%)		12/29 (41,4%)	17/29 (58,6%)	
Lokalni recidivi/metastaze						
Da	8/24 (33,3%)	16/24 (66,7%)	0,286	13/24 (54,2%)	11/24 (45,8%)	0,124
Ne	18/35 (51,4%)	17/35 (48,6%)		10/33 (30,3%)	23/33 (69,7%)	
Smrtni ishod						
Da	5/13 (38,5%)	8/13 (61,5%)	0,885	17/44 (38,6%)	27/44 (61,4%)	0,870
Ne	21/46 (45,6%)	25/46 (54,4%)		6/13 (46,2%)	7/13 (53,8%)	

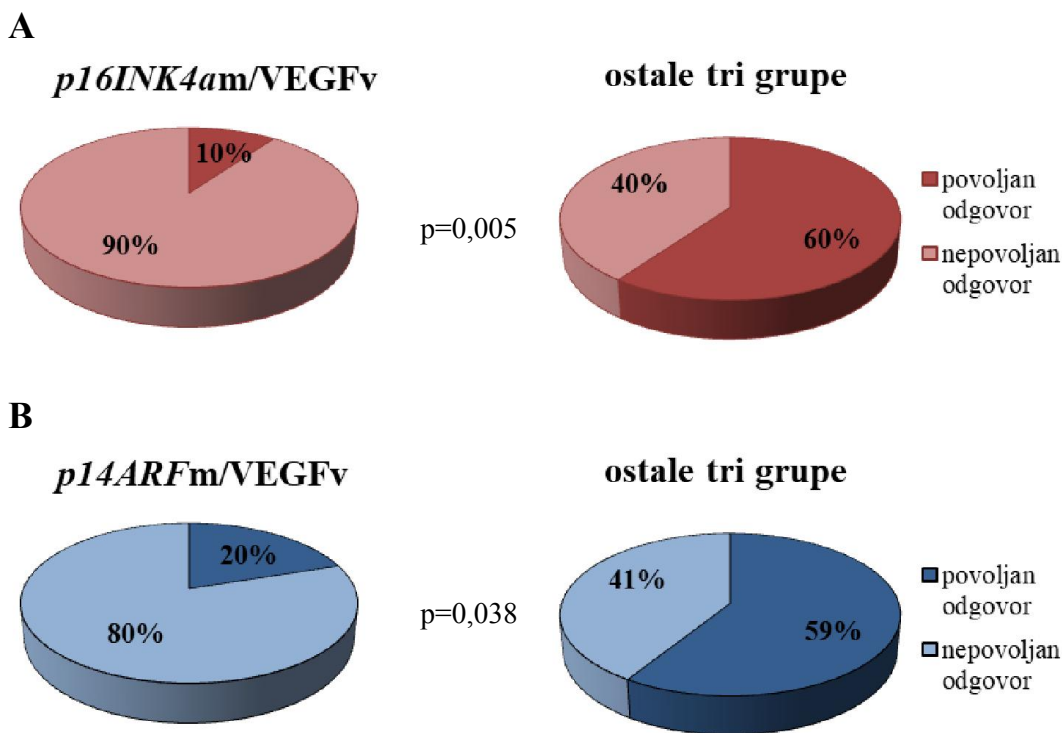
HRT-hemioradioterapija; KO-kompletan odgovor; PO-parcijalni odgovor; SS-stabilna bolest; PB-progresija bolesti; M-metilovani; N-nemetilovani; p-verovatnoća statističke značajnosti je ispitivana Fišerovim egzaktnim testom i Pirsonovim χ^2 -testom.

Rezultati analize povezanosti istovremenog metilacionog statusa gena *p16INK4a* i *p14ARF* sa odgovorom na preoperativnu hemioradioterapiju, tokom i ishodom bolesti nisu se značajno razlikovali od onih dobijenih u analizi pojedinačnih gena (Prilog 1, Tabele 1 i 2).

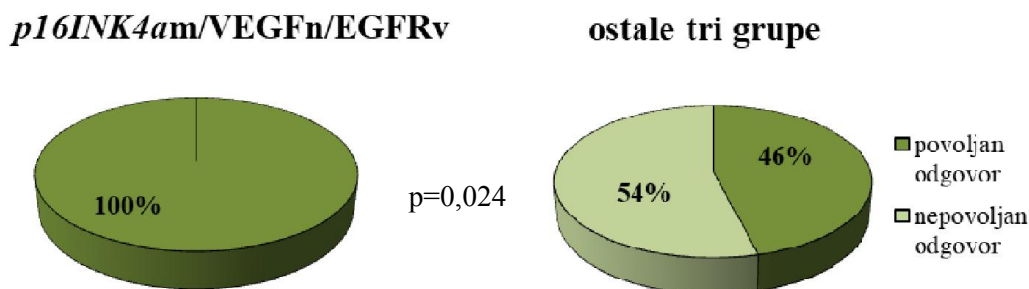
Analizom podataka iz medicinske dokumentacije, povoljan tumorski odgovor na terapiju je uočen kod pacijenata sa niskom ekspresijom VEGF ($p<0,001$), sa istovremenom niskom ekspresijom VEGF i visokom ekspresijom EGFR ($p=0,014$), kao i kod pacijenata sa niskom ekspresijom Ki-67 proteina ($p=0,004$). Iako metilacioni status gena *p16INK4a* i *p14ARF* pojedinačno nije uticao na odgovor na terapiju, u daljem istraživanju smo analizirali da li istovremeno prisustvo metilacije gena *p16INK4a* ili *p14ARF* u kombinaciji sa različitim nivoima ekspresije proteina

EGFR, VEGF, Bcl-2 i Ki-67 može doprineti definisanju podgrupa ispitanika sa preciznijom predikcijom odgovora na primenjenu terapiju, toka i ishoda bolesti. Na osnovu analiziranih parametara dobijeni su sledeći rezultati.

Značajno nepovoljniji odgovor na preoperativnu hemioradioterapiju zabeležen je u grupi pacijenata sa istovremenim prisustvom metilacije gena *p16INK4a* i visokom ekspresijom proteina VEGF (*p16m/VEGFv*), u odnosu na ostale tri grupe: sa nemetilovanim genom *p16INK4a* i niskom ekspresijom proteina VEGF (*p16n/VEGFn*), sa nemetilovanim genom *p16INK4a* i visokom ekspresijom proteina VEGF (*p16n/VEGFv*) i sa metilovanim genom *p16INK4a* i niskom ekspresijom proteina VEGF (*p16m/VEGFn*) (90% vs. 40%, $p=0,005$) (Slika 4.3A). U grupi ispitanika sa istovremenim prisustvom metilacije gena *p14ARF* i visokom ekspresijom proteina VEGF (*p14m/VEGFv*) zapažen je značajno nepovoljniji odgovor na terapiju u poređenju sa ostale tri grupe (*p14n/VEGFn*, *p14n/VEGFv*, *p14m/VEGFn*) (80% vs. 41%, $p=0,038$) (Slika 4.3B). S druge strane, značajno bolji odgovor na terapiju primećen je u grupi obolelih sa istovremenim prisustvom metilacije gena *p16INK4a*, niske ekspresije VEGF i visoke ekspresije proteina EGFR (*p16m/VEGFn/EGFRv*) u odnosu na preostale tri grupe (100% vs. 46%, $p=0,024$) (Slika 4.3C). U ostalim ispitivanim slučajevima istovremenog uticaja metilacije gena *p16INK4a* ili *p14ARF* i različitog nivoa ekspresije datih proteinskih markera na odgovor na HRT nisu zabeleženi statistički značajni rezultati ($p>0,05$ u svim testovima, Prilog 2 Tabela 1; Prilog 3 Tabela 1).



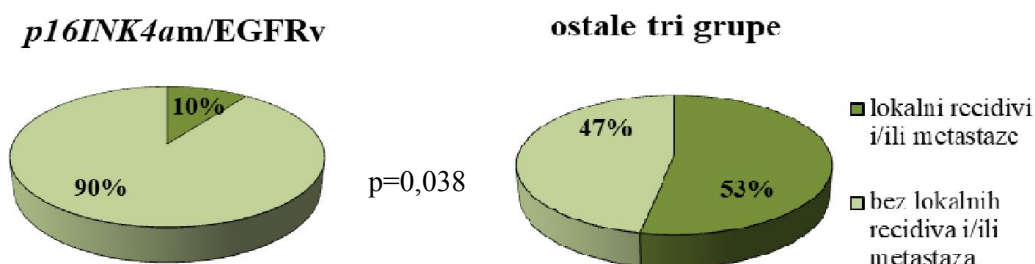
C



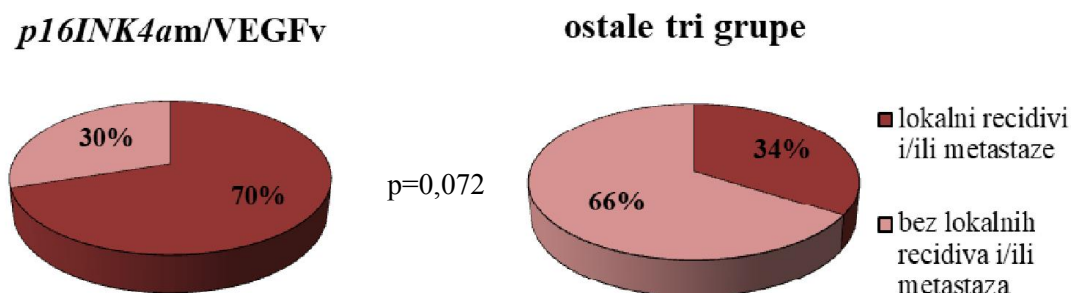
Slika 4.3. Kombinovana analiza metilacionog statusa gena *p16INK4a* i *p14ARF* i različitog nivoa ekspresije proteina *EGFR* i *VEGF* sa odgovorom na HRT

U grupi ispitanika sa istovremenim prisustvom metilacije gena *p16INK4a* i visokom ekspresijom proteina *EGFR* (*p16m/EGFRv*), detektovana je statistički značajno manja učestalost lokalnih recidiva i metastaza u odnosu na preostale tri grupe ispitanika (10% vs. 53,2%, $p=0,038$) (Slika 4.4A). Zabeleženi su i statistički trendovi ka češćoj pojavi lokalnih recidiva i metastaza u grupi obolelih sa istovremenim prisustvom metilacije gena *p16INK4a* i visokom ekspresijom proteina *VEGF* ($p=0,072$) (Slika 4.4B), kao i u grupi sa istovremenim prisustvom metilacije gena *p14ARF* i visokom ekspresijom proteina *VEGF* ($p=0,075$) (Slika 4.4C). U ostalim ispitivanim slučajevima istovremenog uticaja metilacije gena *p16INK4a* ili *p14ARF* i različitog nivoa ekspresije datih proteinskih markera na prisustvo lokalnih recidiva i/ili metastaza, nisu zabeležene statistički značajne razlike ($p>0,05$ u svim testovima, Prilog 2 Tabela 2; Prilog 3 Tabela 2).

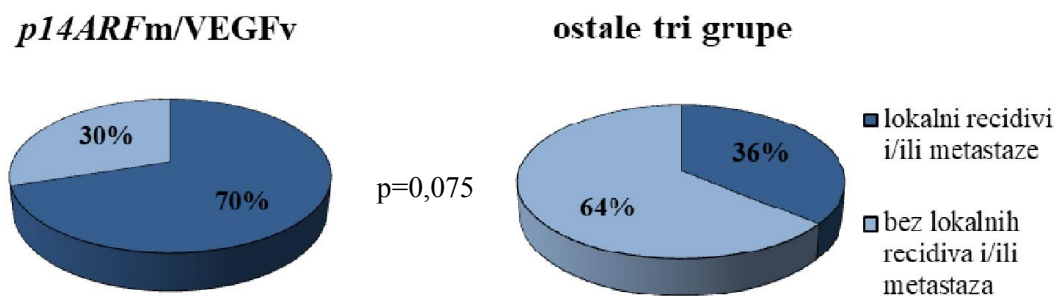
A



B



C

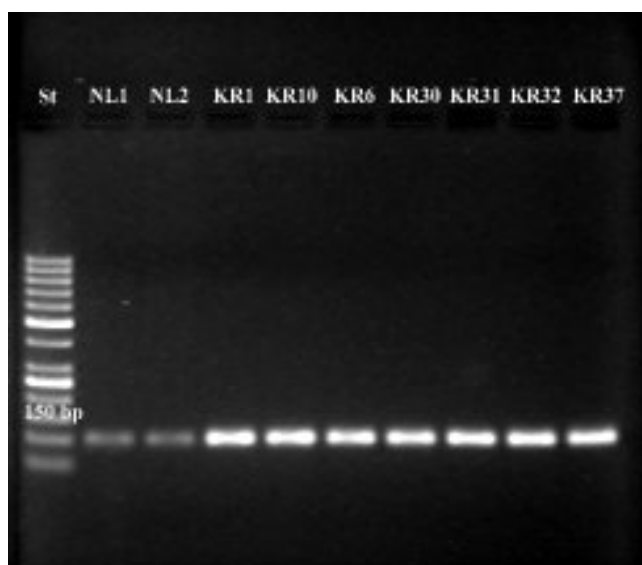


Slika 4.4. Kombinovana analiza metilacionog statusa gena *p16INK4a* i *p14ARF* i različitog nivoa ekspresije proteina *EGFR* i *VEGF* sa prisustvom lokalnih recidiva i/ili metastaza

U grupi obolelih sa istovremenim prisustvom metilacije gena *p16INK4a* i visokom ekspresijom proteina *VEGF* (p16m/VEGFv) zabeležen je veći broj smrtnih ishoda nego u ostale tri grupe (50% vs. 14,9%, $p=0,026$). U ostalim slučajevima kombinovane analize uticaja datih parametara na krajnji ishod bolesti nije zabeležena statistička značajnost kako za metilacioni status gen *p16INK4a*, tako i za metilacioni status gen *p14ARF* ($p>0,05$ u svim ispitivanim slučajevima, Prilog 2 Tabela 3; Prilog 3 Tabela 3).

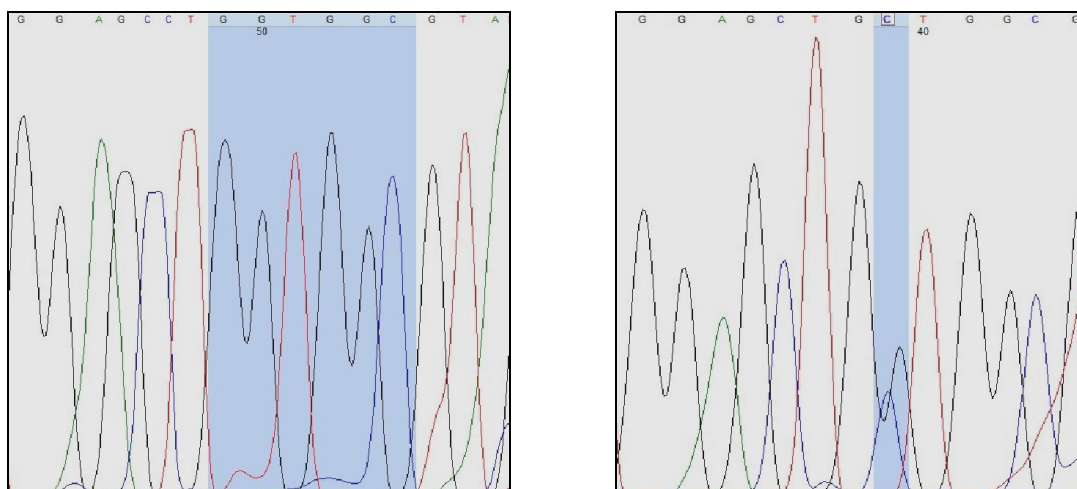
4.3. Ispitivanje mutacionog statusa gena *KRAS* u uzorcima tkiva KR

Mutacioni status gena *KRAS* uspešno je određen u svim (63/63) uzorcima koji su obuhvaćeni studijom. Prvobitno je urađena reakcija umnožavanja regiona gena *KRAS* od interesa PCR tehnikom opisanom u odeljku 3.2.5, čiji su produkti razdvojeni elektroforezom na 1,8% agaroznom gelu (Slika 4.5). Za potvrdu prisustva i uspešnost amplifikacije odabrane sekvence gena *KRAS*, kao pozitivna kontrola korišćena je DNK izolovana iz limfocita periferne krvi zdrave osobe, a za kontrolu specifičnosti PCR reakcije korišćena je slepa proba koja umesto DNK sadrži odgovarajuću zapreminu ddH₂O.



Slika 4.5. Rezultati umnožavanja regiona gena *KRAS* od interesa za uzorke *KR*. Specifična traka dužine 105 bp ukazuje na prisustvo sekvence gena *KRAS* koja obuhvata kodone 12 i 13; *NL1* i *NL2*, DNK iz neizmenjenih limfocita kao pozitivna kontrola za wt sekvencu gena *KRAS* (količina 100 ng, odnosno 200 ng DNK); *St*, molekularni marker (50 bp); *KR*, DNK izolovana iz uzoraka tkiva obolelih od karcinoma rektuma.

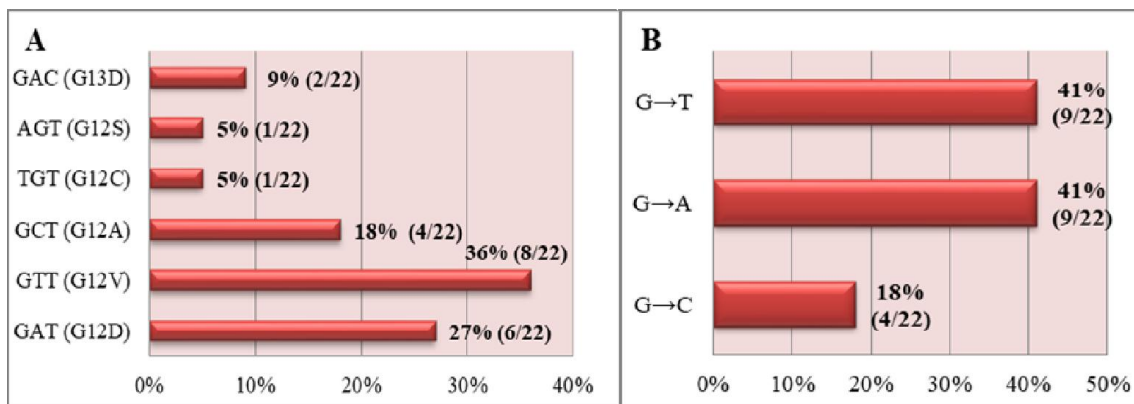
Za precizno automatsko sekvenciranje neophodno je da koncentracija amplifikovanog produkta bude veća od 30 ng/100 bp i da nespecifični produkti, ukoliko ih ima, budu prisutni u količini manjoj od 10% u odnosu na specifični amplikon. Kada su postignuti ovi preduslovi za svaki uzorak, detekcija mutacija u regionu gena *KRAS* od interesa je izvršena metodom automatskog sekvenciranja. Primer rezultata sekvenciranja je dat na Slici 4.6.



Slika 4.6. Primeri elektroferograma regiona gena *KRAS* koji obuhvata kodone 12 i 13. (A) Osenčena wt sekvenca kodona 12 (GGT) i 13 (GGC); (B) Osenčena tačkasta mutacija na drugoj poziciji kodona 12 tipa transverzije G u C (G12A).

Mutacija gena *KRAS* detektovana je kod 35% (22/63) pacijenata, od toga je 91% (20/22) mutacija detektovano u kodonu 12 i 9% (2/22) u kodonu 13. Najčešće detektovan tip mutacije su bile transverzije (59%) i to isključivo u kodonu 12, dok su tranzicije (41%) bile detektovane u oba ispitivana kodona gena *KRAS*. Na Slici 4.7A prikazana je učestalost različitih tipova detektovanih mutacija, pri čemu je najčešća transverzija (G u T) na drugoj poziciji kodona 12 (36% slučajeva),

što za posledicu ima zamenu aminokiseline glicina valinom (G12V). Prema tipu izmene baznog para, raspodela mutacija u oba kodona je bila sledeća: kod 41% (9/22) ispitanika detektovana je transverzija G u T, kod 41% (9/22) tranzicija G u A, a kod 18% (4/22) ispitanika transverzija G u C (Slika 4.7B). Ni u jednom od ispitivanih uzoraka nije detektovano više od jednog tipa mutacije gena *KRAS*.



Slika 4.7. Distribucija detektovanih mutacija u genu *KRAS*. Učestalost različitih tipova mutacija detektovanih pojedinačno u kodonima 12 i 13 gena *KRAS* (A); Učestalost specifičnog tipa mutacija prema tipu bazne izmene u okviru oba kodona gena *KRAS* (B).

4.3.1. Ispitivanje povezanosti mutacionog statusa gena *KRAS* sa kliničko-patološkim i imunohistohemijskim karakteristikama obolelih od KR

Rezultati ispitivanja povezanosti mutacionog statusa gena *KRAS* sa kliničko-patološkim i imunohistohemijskim karakteristikama obolelih su prikazani u Tabeli 4.3. Prisustvo mutacije u genu *KRAS* je statistički značajno povezano sa lokalizacijom tumora u srednjem rektumu ($p=0,019$), dok asocijacija mutacionog statusa gena *KRAS* nije utvrđena ni sa jednom drugom ispitivanom kliničko-patološkom karakteristikom ($p>0,05$ u svim testovima). Iako je mutacija gena *KRAS* sa nešto većom učestalošću detektovana kod ispitanika sa povišenim nivoom ekspresije sva četiri ispitivana proteina, uočene razlike nisu statistički značajne ($p>0,05$ u svim testovima).

Tabela 4.3. Povezanost mutacionog statusa gena KRAS sa kliničko-patološkim i imunohistochemijskim karakteristikama obolelih od KR

Kliničko-patološki i imunohistochemijski parametri	Mutacioni status gena KRAS		p
	mutiran	wt	
Starost (god. median)	66,182 ± 8,787	62,927 ± 8.070	0,144
Pol			
Muški	14/40 (35%)	26/40 (65%)	0,797
Ženski	8/23 (34,8%)	15/23 (65,2%)	
Lokalizacija tumora			
Donji (≤ 7 cm)	2/13 (15,4%)	11/13 (84,6%)	0,019
Gornji (> 7 cm)	3/16 (18,7%)	13/16 (81,3%)	
Srednji (<7>)	17/33 (51,5%)	16/33 (48,5%)	
TNM stadijum			
TNM II	8/23 (34,8 %)	15/23 (65,2%)	0,797
TNM III	14/40 (35%)	26/40 (65%)	
Ekspresija EGFR			
Niska (< 25%)	14/44 (31,8%)	30/44 (68,2%)	0,697
Visoka (≥ 25%)	7/17 (41,2%)	10/17 (58,8%)	
Ekspresija VEGF			
Niska (< 10%)	8/32 (25%)	24/32 (75%)	0,151
Visoka (≥ 10%)	13/29 (44,8%)	16/29 (55,2%)	
Ekspresija Bcl-2			
Niska (< 10%)	10/37 (27%)	27/37 (73%)	0,217
Visoka (≥ 10%)	11/24 (45,8%)	13/24 (54,2%)	
Ekspresija Ki-67			
Niska (< 10%)	4/16 (25%)	12/16 (75%)	0,537
Visoka (≥ 10%)	17/45 (37,7%)	28/45 (62,3%)	

wt-eng. *wild type*; p-verovatnoća statističke značajnosti je ispitivana Studentovim t-testom, Fišerovim egzaktnim testom i Pirsonovim χ^2 -testom.

Kada su analizirani određeni tipovi baznih izmena u okviru oba ispitivana kodona gena *KRAS*, primećeno je da ispitanici sa transverzijom G u C imaju značajno nižu ekspresiju proteina VEGF (100% vs. 24%, p=0,012) i Ki-67 (75% vs. 6%, p=0,012) u odnosu na ispitanike kod kojih su detektovane mutacije tipa transverzije G u T i tranzicije G u A (Tabela 4.4). S druge strane, u grupi ispitanika sa transverzijom G u C zabeležen je statistički trend ka visokom nivou ekspresije proteina EGFR, u odnosu na grupu sa prisutnim mutacijama tipa transverzije G u T i tranzicije G u A (75% vs. 23,5%, p=0,088). Različiti tipovi detektovanih baznih izmena u posmatranom regionu gena *KRAS* nisu bili značajno povezani sa ekspresijom proteina Bcl-2 (p>0,05; Tabela 4.4).

Tabela 4.4. Tip bazne izmene u genu KRAS u asocijaciji sa ekspresijom analiziranih proteina

Imunohistohemijski parametri	Tip bazne izmene u genu KRAS		p
	G u A, G u T	G u C	
Ekspresija EGFR			
Niska (< 25%)	13/17 (76,5%)	1/4 (25%)	0,088
Visoka (≥ 25%)	4/17 (23,5%)	3/4 (75%)	
Ekspresija VEGF			
Niska (< 10%)	4/17 (23,5%)	4/4 (100%)	0,012
Visoka (≥ 10%)	13/17 (76,5%)	0/4 (0%)	
Ekspresija Bcl-2			
Niska (< 10%)	10/17 (58,8%)	3/4 (75%)	1,000
Visoka (≥ 10%)	7/17 (41,2%)	1/4 (25%)	
Ekspresija Ki-67			
Niska (< 10%)	1/17 (5,9%)	3/4 (75%)	0,012
Visoka (≥ 10%)	16/17 (94,1%)	1/4 (25%)	

4.3.2. Ispitivanje povezanosti mutacionog statusa gena KRAS sa odgovorom na preoperativnu hemioradioterapiju, tokom i ishodom bolesti

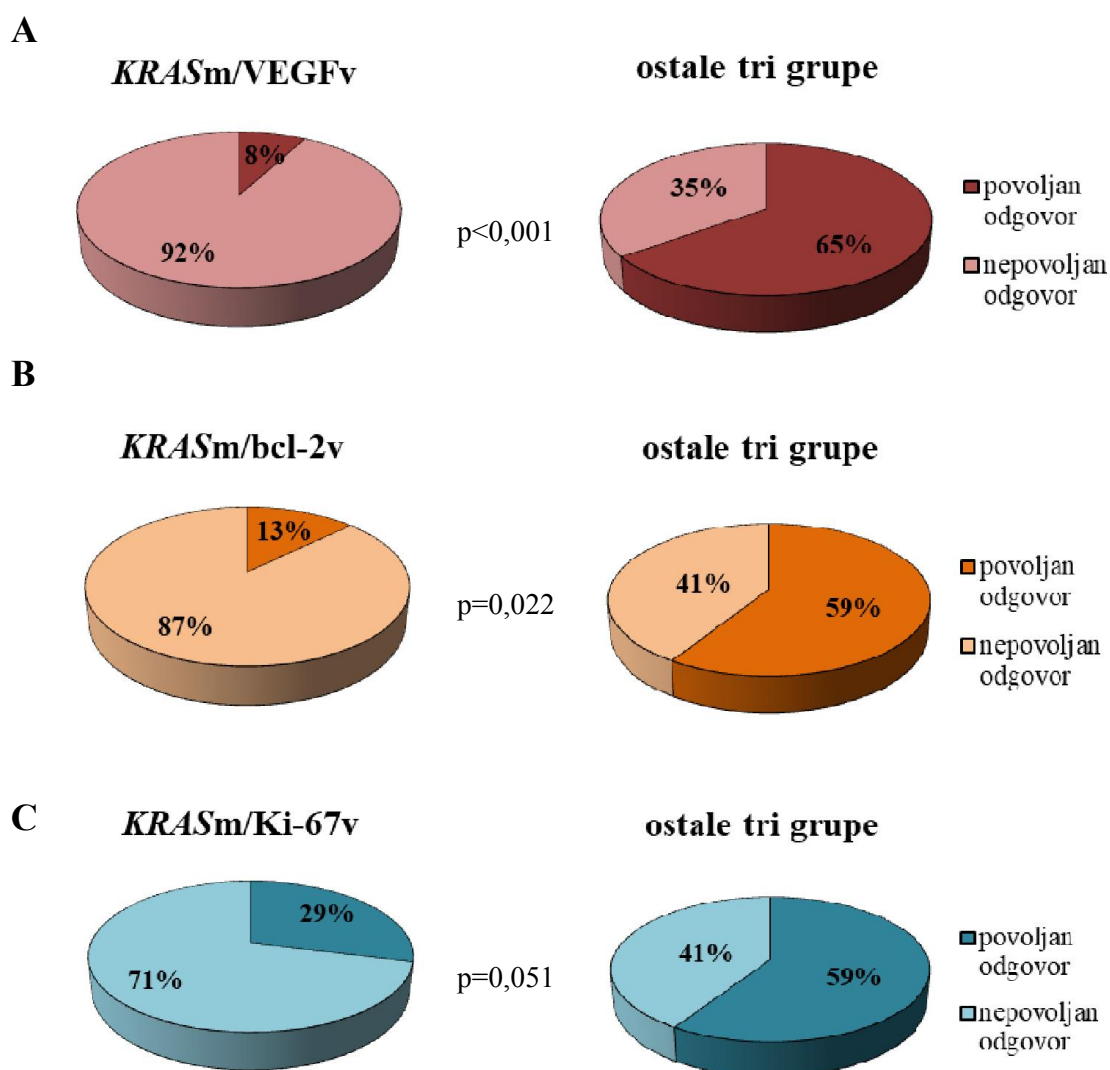
Rezultati ispitivanja povezanosti mutacionog statusa gena KRAS sa odgovorom na terapiju, tokom i ishodom bolesti su prikazani u Tabeli 4.5. Mutacioni status gena KRAS nije imao uticaj na odgovor bolesnika na HRT ($p=0,376$), kao ni na krajnji ishod bolesti ($p=1,000$). Iako je učestlost mutacija ispitivanog gena skoro dvostruko veća u grupi pacijenata sa prisutnim lokalnim recidivima i/ili udaljenim metastazama nego u grupi bez navedenih događaja (50% vs. 26,3%), uočena razlika nije bila statistički značajna ($p=0,101$). Kod pacijenata sa lokalizacijom tumora u srednjem rektumu i sa istovremenim prisustvom mutacije u genu KRAS, uočeno je statistički značajno češće prisustvo lokalnih recidiva i udaljenih metastaza u odnosu na pacijente sa neizmenjenim genom KRAS u okviru iste lokalizacije karcinoma rektuma (59% vs. 20%, $p=0,036$). Takva asocijacija nije uočena kod pacijenata sa tumorom lokalizovanim u gornjem i donjem segmentu rektuma. Kada se uzmu u obzir specifični tipovi mutacije u oba ispitivana kodona gena KRAS, uočava se da su ispitanici sa detektovanom transverzijom G u C postigli značajno povoljniji odgovor na terapiju nego ispitanici sa bilo kojim drugim tipom mutacije gena KRAS (100% vs. 29%, $p=0,017$), dok povezanost ovog tipa nukleotidne izmene u genu KRAS sa prisustvom lokalnih recidiva i/ili metastaza i smrtnim ishodom nije uočena ($p>0,05$ u oba testa, rezultati nisu prikazani).

Tabela 4.5. Povezanost mutacionog statusa gena KRAS sa odgovorom na terapiju, tokom i ishodom bolesti

Kliničko-patološki parametri	Mutacioni status gena KRAS		p
	mutiran	wt	
Odgovor na HRT			
Povoljan (KO/PO)	9/32 (28,11%)	23/32 (71,9%)	0,376
Nepovoljan (SS/PB)	13/31 (41,9%)	18/31 (58,1%)	
Lokalni recidivi/metastaze			
Da	12/24 (50%)	12/24 (50%)	0,101
Ne	10/38 (26,3%)	28/38 (73,7%)	
Smrtni ishod			
Da	5/13 (38,5%)	8/13 (61,5%)	1,000
Ne	17/49 (34,7%)	32/49 (65,3%)	

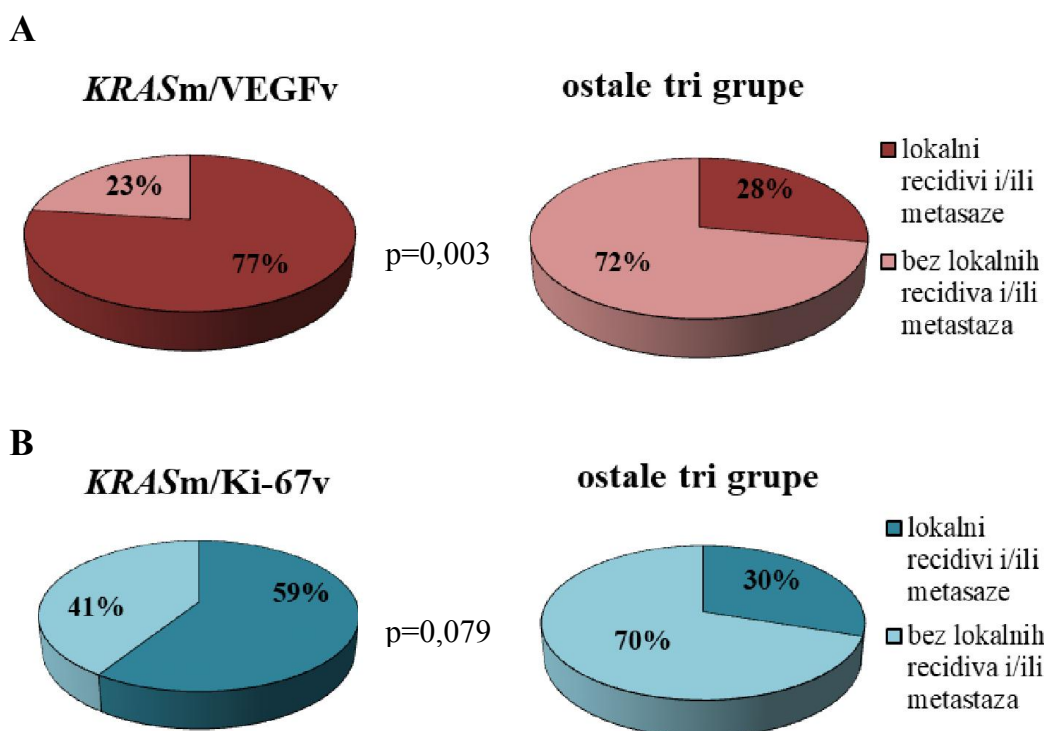
HRT - hemioradioterapija; KO - kompletan odgovor; PO - parcijalni odgovor; SS - stabilna bolest; PB - progresija bolesti; wt- eng. *wild type*; p-verovatnoća statističke značajnosti je ispitivana Fišerovim egzaktnim testom i Pirsonovim χ^2 -testom.

U kombinovanoj analizi mutacionog statusa gena *KRAS* sa različitim nivoima ekspresije proteinskih markera dobijeni su sledeći rezultati. U grupi obolelih sa istovremenim prisustvom mutacije u genu *KRAS* i visokom ekspresijom proteina VEGF (*KRAS*_{mut}/VEGF_v) zabeležen je značajno nepovoljniji odgovor na preoperativnu hemioradioterapiju u poređenju sa ostale tri grupe: sa neizmenjenim genom *KRAS* i niskom ekspresijom proteina VEGF (*KRAS*_{wt}/VEGF_n) proteina, sa neizmenjenim genom *KRAS* i visokom ekspresijom proteina VEGF (*KRAS*_{wt}/VEGF_v) i sa mutiranim genom *KRAS* i niskom ekspresijom proteina VEGF (*KRAS*_{mut}/VEGF_n) (100% vs. 35,4%, $p < 0,001$) (Slika 4.8A). Nepovoljniji odgovor na HRT uočen je i u grupi ispitanika sa istovremenom mutacijom gena *KRAS* i visokom ekspresijom proteina Bcl-2 u odnosu na ostale tri grupe (*KRAS*_{wt}/Bcl-2_v, *KRAS*_{wt}/Bcl-2_n, *KRAS*_{mut}/Bcl-2_n) (87,5% vs. 41,5%, $p = 0,022$) (Slika 4.8B). U grupi ispitanika sa istovremenim prisustvom mutacije gena *KRAS* i visokom ekspresijom proteina Ki-67 (*KRAS*_{mut}/Ki-67_v) takođe je zapažen nepovoljniji odgovor na hemioradioterapiju u poređenju sa preostale tri grupe pacijenata, što je na granici statističke značajnosti (70,6% vs. 40,9%, $p = 0,051$) (Slika 4.8C). Izmenjena ekspresija proteina EGFR sa istovremenim prisustvom mutacije u genu *KRAS* ne utiče značajno na odgovor na HRT ($p > 0,05$, Prilog 4 Tabela 1).



Slika 4.8. Kombinovana analiza mutacionog statusa gena *KRAS* i različitog nivoa ekspresije proteina VEGF, Bcl-2 i Ki-67 sa odgovorom na HRT

Pokazano je da je u grupi obolelih sa istovremenim prisustvom mutacije gena *KRAS* i visokom ekspresijom proteina VEGF (*KRAS*mut/VEGFv) značajno češća pojava lokalnih recidiva i/ili udaljenih metastaza u odnosu na preostale tri grupe (76,9% vs. 27,7%, $p=0,003$) (Slika 4.9A), dok je sličan statistički trend uočen u grupi ispitanika sa istovremenim prisustvom mutacije gena *KRAS* i visokom ekspresijom proteina Ki-67 (*KRAS*mut/Ki-67v) (58,8% vs. 30,2%, $p=0,079$) (Slika 4.9B). Ovakve asocijacije nisu zabeležene u kombinovanim analizama koje uključuju različit nivo ekspresije proteina EGFR i Bcl-2 (Prilog 4 Tabela 2). S druge strane, kombinovane analize nisu pokazale uticaj istovremeno izmenjenog mutacionog statusa gena *KRAS* i izmenjenog nivoa ekspresije data četiri imunohistohemjska parametra na krajnji ishod bolesti ($p>0,05$ u svim ispitivanim slučajevima, Prilog 4 Tabela 3).



Slika 4.9. Kombinovana analiza mutacionog statusa gena *KRAS* i različitog nivoa ekspresije proteina VEGF (A) i Ki-67 (B) sa prisustvom lokalnih recidiva i/ili metastaza

4.4. Povezanost metilacije gena *p16INK4a* i *p14ARF* sa mutacijama u genu *KRAS*

U daljim analizama ispitivali smo međusobnu povezanost detektovanih epigenetičkih odnosno genetičkih promena, kao i povezanost istovremeno izmenjenog metilacionog statusa gena *p16INK4a* i/ili *p14ARF* i mutacionog statusa gena *KRAS* sa datim kliničko-patološkim i imunohistohemijskim parametrima obolelih od KR. Statističkim testovima je pokazano da su metilacioni status gena *p16INK4a*, metilacioni status gena *p14ARF* i mutacioni status gena *KRAS* međusobno nezavisni događaji u ispitivanoj grupi uzoraka ($p>0,05$ u sva tri testa). U grupi od 26 ispitanika sa metilovanim genom *p16INK4a* detektovano je 7 ispitanika sa prisustvom mutacije u genu *KRAS*, dok je u grupi od 34 ispitanika sa nemetilovanim genom *p16INK4a* detektovano 15 ispitanika sa prisustvom mutacije u genu *KRAS*. Od ukupno 23 pacijenta sa metilovanim genom *p14ARF*, 9 pacijenata ima mutiran gen *KRAS*, dok je u grupi od 35 pacijenata sa nemetilovanim genom *p14ARF* uočeno 12 slučajeva sa prisutnom mutacijom *KRAS*. Od 11 ispitanika sa oba

metilovana gena, mutiran gen *KRAS* je detektovan kod 4 ispitanika. Kod 37 obolelih sa najmanje jednim metilovanim genom, mutiran gen *KRAS* bio je prisutan kod 12 obolelih.

Poredili smo grupu ispitanika kod kojih je detektovana metilacija najmanje jednog gena (*p16m/p14m*, *p16m/p14n*, *p16n/p14m*) sa grupom u kojoj su oba gena bila nemetilovana (*p16n/p14n*) prema prisustvu mutacije u genu *KRAS*, pri čemu je uočeno da ne postoji statistički značajna razlika u navedenim grupama za dati parametar ($p=0,610$; Prilog 1 Tabela 1). Takođe, ne postoji značajna razlika u broju ispitanika sa prisutnom mutacijom gena *KRAS* između grupe sa oba metilovana gena (*p16m/p14m*) i grupe u kojoj su oba gena bila nemetilovana (*p16n/p14n*) ($p=1,000$; Prilog 1 Tabela 2).

4.4.1. Povezanost istovremenog prisustva metilacije gena *p16INK4a* i mutacije gena *KRAS* sa kliničko-patološkim i imunohistohemijskim parametrima obolelih od KR

Rezultati ispitivanja istovremenog prisustva izmenjenog metilacionog statusa gena *p16INK4a* i izmenjenog mutacionog statusa gena *KRAS* sa kliničko-patološkim i imunohistohemijskim karakteristikama obolelih od KR prikazani su u Tabeli 4.6. U podgrupi ispitanika sa istovremeno prisutnom metilacijom gena *p16INK4a* i mutacijom gena *KRAS* (*p16m/KRASmut*) primećena je isključiva lokalizacija tumora u gornjem i srednjem rektumu (15,6%, odnosno 14,3% vs. 0%), visok nivo ekspresije proteina Ki-67 (16,3% vs. 0%) i trostruko veći broj ispitanika sa visokom ekspresijom proteina EGFR nego sa niskom ekspresijom ovog proteina (23,5% vs. 7,3%), ali uočene razlike u okviru iste grupe ispitanika nisu statistički značajne ($p>0,05$ u svim ispitivanim slučajevima).

Tabela 4.6. Istovremeno izmenjen metilacioni status gena *p16INK4a* i mutacioni status gena *KRAS* u asocijaciji sa kliničko-patološkim i imunohistohemijskim parametrima

Kliničko-patološki i imunohistohemijski parametri	Metilacioni status gena <i>p16INK4a</i> /Mutacioni status gena <i>KRAS</i>		P
	<i>p16m/KRASmut</i>	<i>p16n/KRASmut, p16m/KRASwt, p16n/KRASwt</i>	
Starost (god. median)	67 ± 8,307	63,943 ± 8,520	0,375
Pol			
Muškarci	5/38 (13,2%)	33/38 (86,8%)	1,000
Žene	2/22 (9,1%)	20/22 (90,9%)	
Lokalizacija tumora			
Donji (≤ 7 cm)	0/13 (0%)	13/13 (100%)	0,174
Gornji (> 7 cm)	2/14 (14,3%)	12/14 (85,7%)	
Srednji (<7> cm)	5/32 (15,6%)	27/32 (84,4%)	
TNM stadijum			
TNM II	3/21 (14,3%)	18/21 (85,7%)	0,687
TNM III	4/39 (10,3%)	35/39 (89,7%)	
Ekspresija EGFR			
Niska (< 25%)	3/41 (7,3%)	38/41 (92,7%)	0,178
Visoka (≥ 25%)	4/17 (23,5%)	13/17 (76,5%)	
Ekspresija VEGF			
Niska (< 10%)	3/30 (10%)	27/30 (90%)	0,701
Visoka (≥ 10%)	4/28 (14,3%)	24/28 (85,7%)	
Ekspresija Bcl-2			
Niska (< 10%)	4/40 (10%)	36/40 (90%)	0,665
Visoka (≥ 10%)	3/18 (16,7%)	15/18 (83,3%)	
Ekspresija Ki-67			
Niska (< 10%)	0/15 (0%)	15/15 (100%)	0,173
Visoka (≥ 10%)	7/43 (16,3%)	36/43 (83,7%)	

m-metilovani; n-nemetilovani; mut-mutirani; wt-eng. *wild type*; p-verovatnoća statističke značajnosti je ispitivana Studentovim t-testom, Fišerovim egzaktnim testom i Pirsonovim χ^2 -testom.

Rezultati koji se odnose na povezanost istovremenog prisustva izmenjenog metilacionog statusa gena *p16INK4a* i izmenjenog mutacionog statusa gena *KRAS* sa odgovorom na preoperativnu hemioradioterapiju, tokom i ishodom bolesti su prikazani u Tabeli 4.7. U grupi ispitanika sa istovremenom metilacijom gena *p16INK4a* i mutacijom gena *KRAS* češće je dolazilo do smrtnog ishoda (23,1% vs. 8,7%), ali uočena razlika nije statistički značajna (p=0,173). Istovremeno različito izmenjen metilacioni status gena *p16INK4a* i mutacioni status gena *KRAS* nije značajno uticao na odgovor na primenjenu HRT, kao ni na pojavu lokalnih recidiva i/ili metastaza.

Tabela 4.7. Istovremeno izmenjen metilacioni status gena *p16INK4a* i mutacioni status gena *KRAS* u asocijaciji sa tokom i ishodom bolesti

Kliničko-patološki parametri	Metilacioni status gena <i>p16INK4a</i> /Mutacioni status gena <i>KRAS</i>		P
	<i>p16m/KRASmut</i>	<i>p16n/KRASmut, p16m/KRASwt, p16n/KRASwt</i>	
Odgovor na HRT			
Povoljan (KO/PO)	3/30 (10%)	27/30 (90%)	1,000
Nepovoljan (SS/PB)	4/30 (13,3%)	26/30 (86,7%)	
Lokalni recidivi/metastaze			
Da	4/24 (16,7%)	20/24 (83,3%)	0,427
Ne	3/35 (8,6%)	32/35 (91,4%)	
Smrtni ishod			
Da	3/13 (23,1%)	10/13 (76,9%)	0,173
Ne	4/46 (8,7%)	42/46 (91,3%)	

HRT - hemioradioterapija; KO - kompletan odgovor; PO - parcijalni odgovor; SS - stabilna bolest; PB - progresija bolesti; m-metilovani; n-nemetilovani; mut-mutirani; wt-eng. *wild type*; p-verovatnoća statističke značajnosti je ispitivana Fišerovim egzaktnim testom i Pirsonovim χ^2 -testom.

4.4.2. Povezanost istovremenog prisustva metilacije gena *p14ARF* i mutacije gena *KRAS* sa kliničko-patološkim i imunohistohemijskim parametrima obolelih od KR

U Tabeli 4.8 sumirani su rezultati ispitivanja istovremenog prisustva izmenjenog metilacionog statusa gena *p14ARF* i izmenjenog mutacionog statusa gena *KRAS* sa kliničko-patološkim i imunohistohemijskim karakteristikama pacijenata obolelih od KR. Istovremena metilacija gena *p14ARF* i mutacija gena *KRAS* češće su detektovane u grupi ispitanika sa lokalizacijom tumora u srednjem rektumu (23,3% vs. 7,7%, odnosno 7,1%), kao i kod ispitanika sa visokom ekspresijom proteina VEGF (22,2% vs. 6,9%), ali uočene razlike nisu bile statistički značajne ($p > 0,05$). I u ostalim ispitivanim slučajevima p vrednosti statističkih testova su bile veće od 0,05.

Tabela 4.8. Povezanost istovremenog izmenjenog metilacionog statusa gena *p14ARF* i mutacionog statusa gena *KRAS* sa kliničko-patološkim i imunohistohemijskim parametrima

Kliničko-patološki i imunohistohemijski parametri	Metilacioni status gena <i>p14ARF</i> /Mutacioni status gena <i>KRAS</i>		P
	<i>p14m/KRASmut</i>	<i>p14n/KRASmut, p14m/KRASwt, p14n/KRASwt</i>	
Starost (god. median)	68,111± 9,778	63,735± 8,286	0,162
Pol			
Muški	7/37 (18,9%)	30/37 (81,1%)	0,465
Ženski	2/21 (9,5%)	19/21 (90,5%)	
Lokalizacija tumora			
Donji (≤ 7 cm)	1/13 (7,7%)	12/13 (92,3%)	0,234
Gornji (> 7 cm)	1/14 (7,1%)	13/14 (91,9%)	
Srednji (<> cm)	7/30 (23,3%)	23/30 (76,7%)	
TNM stadijum			
TNM II	4/21 (19,1%)	17/21 (80,9%)	0,710
TNM III	5/37 (13,5%)	32/37 (86,5%)	
Ekspresija EGFR			
Niska (< 25%)	5/40 (12,5%)	35/40 (87,5%)	0,676
Visoka (≥ 25%)	3/16 (18,8%)	13/16 (81,2%)	
Ekspresija VEGF			
Niska (< 10%)	2/29 (6,9%)	27/29 (93,1%)	0,137
Visoka (≥ 10%)	6/27 (22,2%)	21/27 (77,7%)	
Ekspresija Bcl-2			
Niska (< 10%)	6/39 (15,4%)	33/39 (84,6%)	1,000
Visoka (≥ 10%)	2/17 (11,8%)	15/17 (88,2%)	
Ekspresija Ki-67			
Niska (< 10%)	1/15 (6,7%)	14/15 (93,3%)	0,428
Visoka (≥ 10%)	7/41 (17,1%)	34/41 (82,9%)	

m-metilovani; n-nemetilovani; mut-mutirani; wt-eng. *wild type*; p-verovatnoća statističke značajnosti je ispitivana Studentovim t-testom, Fišerovim egzaktnim testom i Pirsonovim χ^2 -testom.

U Tabeli 4.9 sumirani su rezultati ispitivanja povezanosti istovremenog prisustva izmenjenog metilacionog statusa gena *p14ARF* i izmenjenog mutacionog statusa gena *KRAS* sa odgovorom na preoperativnu hemioradioterapiju, tokom i ishodom bolesti. Istovremena metilacija gena *p14ARF* i mutacija gena *KRAS* značajno je češće detektovana kod ispitanika sa lokalnim recidivima i/ili metastazom bolesti (p=0,027). Ovakve asocijacije nisu uočene u odnosu na odgovor obolelih na primenjenu HRT, kao ni na smrtni ishod.

Tabela 4.9. Povezanost istovremenog prisustva izmenjenog metilacionog statusa gena *p14ARF* i mutacionog statusa gena *KRAS* sa tokom i ishodom bolesti

Kliničko-patološki parametri	Metilacioni status gena <i>p14ARF</i> /Mutacioni status gena <i>KRAS</i>		P
	<i>p14m/KRASmut</i>	<i>p14n/KRASmut, p14m/KRASwt, p14n/KRASwt</i>	
Odgovor na HRT			
Povoljan (KO/PO)	3/29 (10,3%)	26/29 (89,7%)	0,470
Nepovoljan (SS/PB)	6/29 (20,7%)	23/29 (79,3%)	
Lokalni recidivi/metastaze			
Da	7/24 (29,2%)	17/24 (70,8%)	0,027
Ne	2/33 (6,1%)	31/33 (93,9%)	
Smrtni ishod			
Da	3/13 (23,1%)	10/13 (76,9%)	0,412
Ne	6/44 (13,6%)	38/44 (86,4%)	

HRT - hemioradioterapija; KO - kompletan odgovor; PO - parcijalni odgovor; SS - stabilna bolest; PB - progresija bolesti; m-metilovani; n-nemetilovani; mut-mutirani; wt-eng. *wild type*; p-verovatnoća statističke značajnosti je ispitivana Fišerovim egzaktnim testom i Pirsonovim χ^2 -testom.

4.4.3. Povezanost istovremenog prisustva epigenetičkih i genetičkih promena sa kliničko-patološkim i imunohistohemijskim parametrima obolelih od KR

Grupa pacijenata sa istovremenom metilacijom gena *p16INK4a* i *p14ARF* i mutiranim genom *KRAS* (*p16m/p14m/KRASmut*) sastojala se od svega 4 ispitanika, tako da statističke analize povezanosti sa kliničko-patološkim, imunohistohemijskim i parametrima praćenja toka i ishoda bolesti nisu bile moguće. Ipak, primećeno je da je 3/4 (75%) ovih ispitanika imalo nepovoljan odgovor na preoperativnu hemioradioterapiju, lokalne recidive i/ili metastaze bolesti, povišenu ekspresiju proteina VEGF i kod svo četvoro (4/4, 100%) je tumor bio lokalizovan u srednjem rektumu.

Urađene su i analize povezanosti istovremenog prisustva metilacije gena *p16INK4a* ili *p14ARF* i specifičnog tipa mutacije u oba kodona gena *KRAS* prema tipu bazne izmene sa kliničko-patološkim i imunohistohemijskim karakteristikama. Značajna razlika uočena je u prosečnoj starosti između ispitanika sa istovremeno prisutnom metilacijom gena *p16INK4a* i mutacijom u genu *KRAS* tipa tranzicije G u A (*p16m/KRAS_{G u A}*) i ostale tri grupe ispitanika (*p16n/KRAS_{G u A}*, *p16m/KRAS_{G u T; G u C}*, *p16n/KRAS_{G u T; G u C}*), dok povezanost sa drugim kliničko-patološkim parametrima i imunohistohemijskom ekspresijom analiziranih proteina nije utvrđena ($p > 0,05$ u svim ispitivanim slučajevima, rezultati nisu prikazani). Kombinovane analize u odnosu na druga dva tipa mutacija u oba kodona gena *KRAS* (transverzija G u T; transverzija G u C) nisu bile moguće zbog malog broja ispitanika sa istovremenim prisustvom navedenih mutacija i metilacijom gena *p16INK4a* ili *p14ARF*.

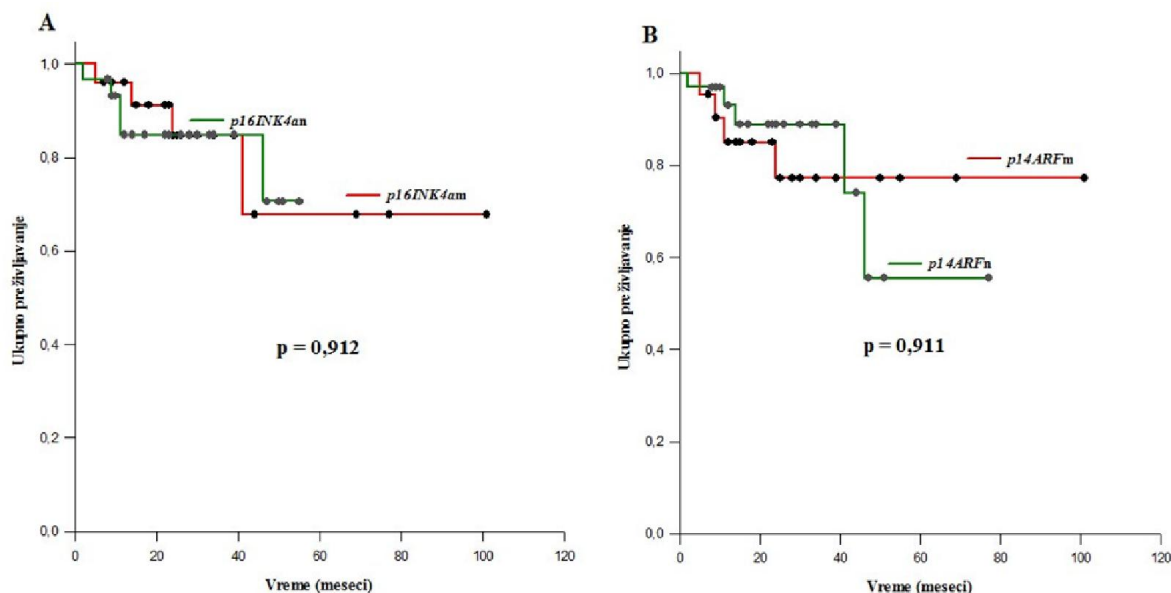
4.5. Analiza preživljavanja bolesnika sa KR

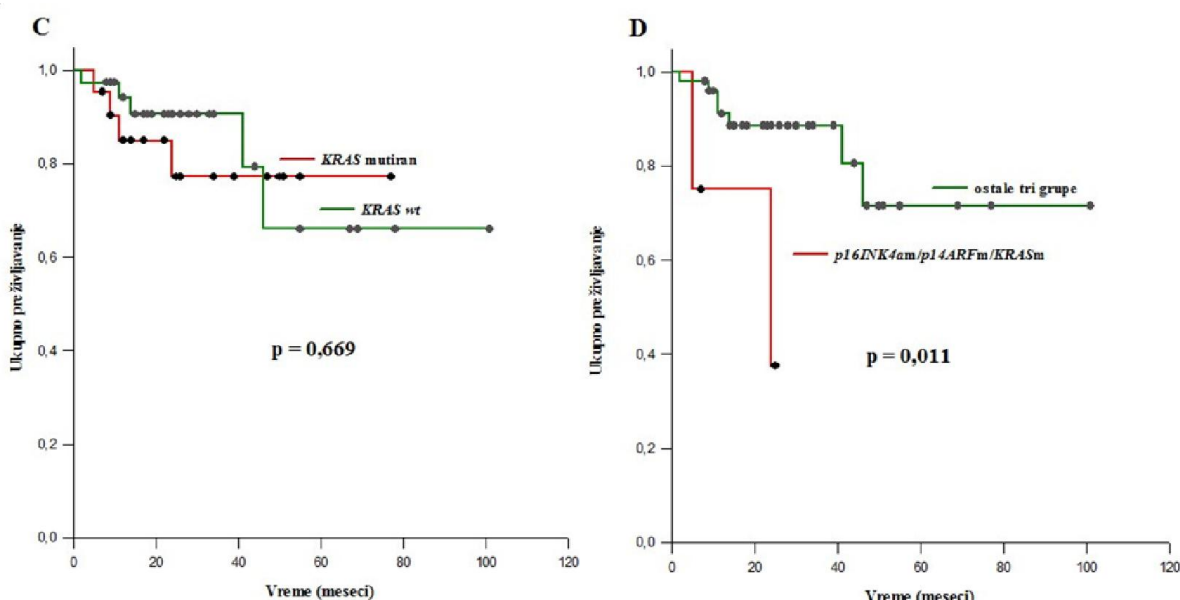
Podaci o preživljavanju su bili dostupni za 58/63 pacijenata uključenih u studiju. Prosečan period praćenja iznosio je 23,5 meseci (opseg 2-101 mesec). Ukupno preživljavanje je bilo značajno kraće u grupama ispitanika sa: visokom ekspresijom proteina VEGF ($p=0,006$), istovremenom visokom ekspresijom proteina VEGF i niskom ekspresijom proteina EGFR ($p=0,007$), nepovoljnim odgovorom na terapiju ($p=0,005$), kao i u grupi sa prisustvom lokalnih recidiva i/ili udaljenih metastaza ($p < 0,001$). U slučaju metilacionog statusa gena *p16INK4a* i *p14ARF*, nije zabeležena

statistički značajna razlika u ukupnom preživljavanju među ispitanicima sa metilovanim i ispitanicima sa nemetilovanim genima *p16INK4a* i *p14ARF* ($p=0,912$, odnosno $p=0,911$) (Slika 4.10A; Slika 4.10B). Uočeno je da ni prisustvo metilacije bar jednog gena (*p16m/p14m*, *p16m/p14n*, *p16n/p14m*) nije povezano sa ukupnim preživljavanjem ispitanika ($p=0,910$). Takođe, ne postoji značajna razlika u ukupnom preživljavanju obolelih sa metilacijom oba gena (*p16m/p14m*) u odnosu na grupu sa oba nemetilovana gena (*p16n/p14n*) ($p=0,979$).

Nije uočena ni statistički značajna razlika u ukupnom preživljavanju među obolelima sa neizmenjenim genom *KRAS* i obolelima sa mutiranim genom *KRAS* ($p=0,669$) (Slika 4.10C). Analiza preživljavanja u grupama ispitanika sa specifičnim tipom mutacije nije bila moguća zbog malog broja uzoraka u odgovarajućim grupama.

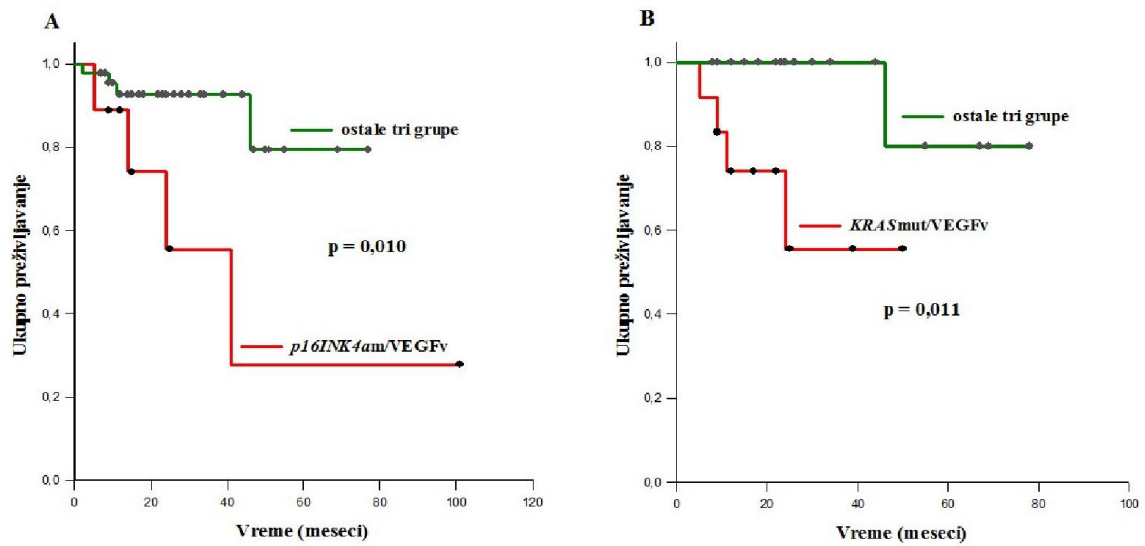
Istovremena metilacija gena *p16INK4a* i mutacija gena *KRAS* ($p=0,241$), odnosno istovremena metilacija gena *p14ARF* i mutacija gena *KRAS* ($p=0,190$) nije statistički značajno povezana sa ukupnim preživljavanjem. S druge strane, podgrupu ispitanika sa istovremeno prisutnom metilacijom gena *p16INK4a* i *p14ARF* i mutacijom u genu *KRAS* (*p16m/p14m/KRASmut*) odlikuje značajno kraće ukupno preživljavanje u odnosu na ostale podgrupe pacijenata ($p=0,011$) (Slika 4.10D).





Slika 4.10. Asocijacija ukupnog preživljavanja pacijenata obolelih od KR sa metilacionim statusom gena *p16INK4a* (A), gena *p14ARF* (B), mutacionim statusom gena *KRAS* (C) i izmenama u sva tri ispitivana gena (D).

Grupa obolelih sa istovremenim prisustvom metilacije gena *p16INK4a* i visokim nivoom ekspresije proteina VEGF (*p16m/VEGFv*), pokazuje statistički značajno kraće ukupno preživljavanje u poređenju sa preostale tri grupe obolelih (*p16n/VEGFn*, *p16n/VEGFv*, *p16m/VEGFn*) ($p=0,010$) (Slika 4.11A), dok takva asocijacija nije primećena kod ispitanika sa istovremenim prisustvom metilacije gena *p14ARF* i visokom ekspresijom proteina VEGF ($p=0,266$). U kombinovanim analizama izdvaja se i grupa obolelih kod kojih je istovremeno prisustvo mutacije gena *KRAS* i visoke ekspresije proteina VEGF statistički značajno povezano sa kraćim ukupnim preživljavanjem ($p=0,011$), u odnosu na ostale tri grupe (*p16n/KRASwt*, *p16n/KRASmut*, *p16m/KRASwt*) (Slika 4.11B). U daljim kombinovanim analizama sa drugim imunohistohemijskim parametrima (EGFR, Bcl-2 i Ki-67) nisu uočene ovakve asocijacije u odnosu na ukupno preživljavanje obolelih od karcinoma rektuma ($p>0,05$ u svim ispitivanim slučajevima, rezultati nisu prikazani).



Slika 4.11. Asocijacija ukupnog preživljavanja pacijenata obolelih od KR sa istovremeno izmenjenim metilacionim statusom gena *p16INK4a* (A), odnosno mutacionim statusom gena *KRAS* (B) i različitim nivoom ekspresije proteina *VEGF*.

5. DISKUSIJA

Tumori debelog creva lokalizovani u rektumu čine oko 30% svih slučajeva KRK, koji se sa kliničkog aspekta posmatraju kao zaseban entitet i zahtevaju drugačiji tretmanski pristup zbog karlične pozicije tumora i blizine važnih neurovaskularnih struktura i organskih sistema (Kokelaar i sar., 2016). Primena neoadjuvatne heimioradioterapije značajno je doprinela tome da tumori u lokalno uznapredovalom stadijumu postanu operabilni, kao i boljoj lokalnoj kontroli bolesti, u smislu ređe pojave lokalnih recidiva nakon primarnog hirurškog tretmana (Brown i Solomon, 2018). Iako je kombinovana primena preoperativne HRT i hirurgije standardizovana kod KR u lokalno uznapredovalom stadijumu (Glimelius, 2013), patološki kompletan odgovor (pKO), kao najbolji ishod, postiže se kod svega 10-20% obolelih, dok u 30% slučajeva odgovor u potpunosti izostaje (Beddy i sar., 2008, Topova i sar., 2011). Ovakva heterogenost tumorskog odgovora na primenjenu HRT odražava se i na različitu prognozu bolesti kod svakog pojedinačnog slučaja (Jo i sar., 2012). U eri napretka presonalizovane medicine, krajni cilj je definisati molekularne biomarkere u pre-tretmanskim biopsijama KR, koji će pored standardnih kliničko-patoloških parametara, doprineti boljoj stratifikaciji pacijenata i optimizaciji terapijskog režima za svakog pacijenta posebno (Karagkounis i Kalady, 2017, Kokelaar i sar., 2018).

Genetičke i epigenetičke aberacije koje leže u osnovi kancerogeneze tumora debelog creva su kompleksne i nisu u potpunosti razjašnjene, ali je opšte prihvaćeno da su različiti molekularni procesi odgovorni za nastanak i razvoj tumora u različitim delovima kolona i rektuma (Dienstmann i sar., 2017). Mutacije u genu *KRAS* smatraju se ranim događajem u kolorektalnoj kancerogenezi (Velho i sar., 2008), a s obzirom da je onkogeno aktivacija RAS signalnog puta uključena u mnoge aspekte malignog procesa, pretpostavlja se da mutacioni status gena *KRAS* može biti prognostički faktor u KRK. Međutim, podaci o prognostičkom značaju mutacionog statusa gena *KRAS* u KRK su kontroverzni i zahtevaju dodatna ispitivanja. Mutacije gena *KRAS* predstavljaju molekularne markere odgovora na ciljanu terapiju metastatskog KRK monoklonskim antitelima (Karapetis i sar., 2008, Bokemeyer i sar., 2011), dok njihova uloga kao prediktivnih faktora u KR nije u potpunosti utvrđena.

Odgovor na tretman kolorektalnih karcinoma različitim terapeutima može da zavisi i od specifičnog obrasca metilacije pojedinih gena (Azad i sar., 2013), pogotovo kada su metilacijom pogođeni geni sa važnom ulogom u popravci oštećenja u molekulu DNK, u održavanju stabilnosti genoma ili u regulaciji propagacije ćelija kroz faze ćeliskog ciklusa (Kurkjian i sar., 2008, Toyota i sar., 2009, Toyota i Suzuki, 2010). Prema rezultatima brojnih eksperimentalnih studija, metilacija tumor-supresornih gena *p16INK4a* i *p14ARF* takođe je relativno čest i rani događaj u patogenezi KRK (Trzeciak i sar., 2001, Chan i sar., 2002, Shen i sar., 2003, Samowitz i sar., 2005). U većini dosadašnjih studija fokus je bio na ispitivanju uloge inaktivacije ovih gena u nastanku i prognozi KRK, dok se mali broj studija zapravo bavio ispitivanjem uticaja metilacionog statusa navedenih gena na odgovor na neoadjuvantnu HRT (Molinari i sar., 2013). Osnovni problem u analizi potencijalnih metilacionih biomarkera za karcinom rektuma je u nedostatku studija koje razmatraju KR kao poseban entitet, kao i u činjenici da se u većini studija uloga metilacije molekula DNK razmatra u okviru CIMP fenotipa, pri čemu se panel gena za definisanje ovog fenotipa često razlikuje od studije do studije. (Exner i sar., 2015).

Cilj ove studije bio je utvrditi metilacioni status gena *p16INK4A* i *p14ARF* i mutacioni status gena *KRAS* u selektovanoj grupi ispitanika obolelih od KR u lokalno uznapredovalom stadijumu, kako bi se ispitala potencijalna asocijacija metilacionog, odnosno mutacionog statusa navedenih gena sa kliničko-patološkim i imunohistohemijskim parametrima i uloga aberacije ova tri gena u

patogenezi KR. Od posebnog interesa bilo je ispitati potencijalni klinički značaj promena u navedenim genima, odnosno da li su metilacioni statusi gena *p16INK4a* i *p14ARF* i mutacioni status gena *KRAS* pojedinačno ili u kombinaciji sa različitim nivoom ekspresije proteina EGFR, VEGF, Bcl-2 i Ki-67, povezani sa odgovorom na preoperativnu HRT, tokom i ishodom bolesti ispitanika obuhvaćenih istraživanjem.

U našoj studiji, metilacija gena *p16INK4a* je detektovana kod 43,3% ispitanika, što je u skladu sa drugim studijama na kolorektalnim karcinomima, prema kojima se ovaj događaj detektuje u 10% do 61% analiziranih slučajeva (Veganzones-de-Castro i sar., 2012, Xing i sar., 2013). Rezultati se odnose na studije čiji je predmet istraživanja bio KRK kao jedan entitet, dok podaci o učestalosti metilacije gena *p16INK4a* u KR zasebno nisu dostupni. Iako je metilacija ispitivanog gena relativno čest događaj u našoj grupi uzoraka, nije uočena povezanost metilacionog statusa gena *p16INK4a* sa datim kliničko-patološkim parametrima kao što su starost, pol, TNM stadijum i lokacija tumora. Ovi rezultati su takođe u skladu sa rezultatima prethodnih studija (Esteller i sar., 2000, Hibi i sar., 2002, Brücher i sar., 2006), mada je u pojedinim studijama zabeleženo da se metilacija promotorskog regiona gena *p16INK4a* češće javlja kod tumora debelog creva sa proksimalnom i rektalnom pozicijom (Veganzones-de-Castro i sar., 2012), kao i u uzanpredovalim stadijumima maligne bolesti (Goto i sar., 2009).

U okviru naše studije, ispitivanjem potencijalne prediktivne i prognostičke uloge metilacionog statusa gena *p16INK4a*, pokazano je da metilacija ovog gena nije povezana sa odgovorom na primenjenu HRT, pojavom lokalnih recidiva i/ili metastaza i ukupnim preživljavanjem obolelih od KR. Prisustvo metilacije gena *p16INK4a* kod KRK uglavnom se povezuje sa agresivnijim tokom maligne bolesti. Rezultati meta-studije Jiang i saradnika iz 2014. godine pokazali su da je metilacija ovog gena zapravo nepovoljan prognostički parametar kod KRK. Zapaženo je da metilacija gena *p16INK4a* koreliše sa češćom pojavom metastaza u limfnim čvorovima, prisustvom limfovaskularne invazije okolnog tkiva, kao sa kraćim ukupnim preživljavanjem obolelih (Hibi i sar., 2002, Jiang i sar., 2014). Do danas, nije precizno utvrđena uloga inaktivacije gena *p16INK4a* u karcinomu rektuma kao posebanom entitetu. Generalno, CIMP-H fenotip prisutan je kod 2-10% karcinoma rektuma (Jo i sar., 2012, Yamauchi i sar., 2012) i obično se povezuje sa nepovoljnim krajnjim ishodom bolesti (Jo i sar., 2012, Bae i sar., 2013). Problem u interpretaciji ovih rezultata je to što gen *p16INK4a* nije uvek u sastavu panela gena kojim se određuje CIMP fenotip (de Maat i sar., 2010, Jo i sar., 2012, Gaedcke i sar., 2014), dok je broj istraživanja koja su se bavila ispitivanjem uloge gena *p16INK4a* pojedinačno u KR mali. U radu Kim i saradnika iz 2010. godine koji je za temu imao ispitivanje uticaja metilacije pojedinih gena na tok i ishod bolesti kod pacijenata obolelih od KRK, zabeležena je asocijacija metilacije gena *p16INK4a* i pojave lokalnih recidiva nakon operativnog tretmana, kao i asocijacija sa kraćim ukupnim preživljavanjem pacijenata (Kim i sar., 2010). Međutim, treba naglasiti da u tretmanu obolelih obuhvaćenih ovom studijom nije primenjivana preoperativna HRT, tako da je teško proceniti da li je ovaj rezultat posledica isključivo inaktivacije gena *p16INK4a* ili izostanka primene HRT, za koju je pokazano da značajno doprinosi lokalnoj kontroli bolesti, odnosno smanjuje stopu pojave lokalnih recidiva (Sauer i sar., 2004, Martin i sar., 2012). U drugoj studiji, kod obolelih od KR, zabeleženo je da se metilacija gena *p16INK4a* u univarijantnoj analizi ne izdvaja kao prognostički faktor, dok je istovremeno prisustvo metilacije gena *p16INK4a* i mutacije gena *KRAS* u asocijaciji sa nepovoljnim ishodom bolesti, odnosno kraćim ukupnim preživljavanjem (Kohonen-Corish i sar., 2014). I u ovom slučaju kod većine ispitanika nije primenjivana preoperativna HRT. Očigledno je da prognostička uloga metilacionog statusa gena *p16INK4a* posmatrano nezavisno od uloge ostalih gena iz CIMP-panela i određenih onkogeni nije dovoljno istražena u smislu specifične lokacija tumora debelog creva.

Što se tiče prediktivne uloge metilacionog statusa gena *p16INK4a* u odgovoru na preoperativnu HRT kod KR, gotovo da nema literaturnih podataka sa kojima možemo da uporedimo dobijeni rezultat. Prilikom ispitivanja prediktivne uloge metilacije pojedinih gena u odgovoru na hemioradioterapiju tumora jednjaka, uočeno je da je metilacija gena *p16INK4a* prisutna u većem procentu kod ispitanika koji nisu odgovorili na terapiju, a rezistentnost na HRT se objašnjava činjenicom da metilaciona inaktivacija ovog gena sprečava ćeliju da se zaustavi u G₂ fazi ćeliskog ciklusa u kojoj je dejstvo hemioterapeutika i radioterapije najefikasnije (Hamilton i sar., 2006). U studiji koja se bavila ispitivanjem uticaja metilacionog statusa brojnih tumorsupresornih gena na odgovor obolelih od KR u primeni preoperativne HRT, metilacioni status gena *p16INK4a* se nije izdvojio kao statistički značajan prediktor odgovora na HRT, ali su zabeleženi različiti nivoi metilacije ovog gena u različitim tipovima odgovora na HRT, definisanih prema stepenu smanjenja tumorske mase (Molinari i sar., 2013). Za bolje razumevanje uloge metilacionog statusa gena *p16INK4a* u predikciji odgovora na standardan tretman KR, neophodna je, pre svega, analiza na većem broju uzoraka, pri čemu je bitna usaglašenost u terapijskim režimima, načinu evaluacije odgovora na HRT, kao i stadijumima bolesti ispitanika uključenih u studije, ali i standardizacija metodologije ispitivanja metilacionog statusa.

U ovoj studiji, metilacija gena *p14ARF* detektovana je kod 39,6% ispitanika, što je takođe u saglasnosti sa rezultatima dosadašnjih studija prema kojima se ova epigenetička alteracija detektuje kod 28-50% slučajeva KRK (Esteller i sar., 2000, Hibi i sar., 2002, Lee i sar., 2006, Kang i sar., 2008). Podaci o zastupljenosti i ulozi metilacije gena *p14ARF* u kancerogenezi potiču iz studija koje su razmatrale karcinom kolona i karcinom rektuma kao jedan entitet, a u jednoj od takvih studija uočena je asocijacija metilacije gena *p14ARF* sa lokacijom tumora u rektumu (Chaar i sar., 2014). Stoga dobijeni rezultat o učestalosti metilacije ovog gena kod lokalno uznapredovalih karcinoma rektuma treba proveriti na većem broju uzoraka.

Prema rezultatima naše studije, nije detektovana značajna asocijacija između prisustva metilacije gena *p14ARF* i ispitivanih kliničko-patoloških parametara, što je u skladu sa rezultatima drugih studija koje uključuju obolele od KRK (Esteller i sar., 2000, Hibi i sar., 2002, Kang i sar., 2008). Među našim ispitanicima uočen je trend ka većoj procentualnoj zastupljenosti metilacije gena *p14ARF* kod ispitanika starijeg životnog doba ($p=0,095$), a sličan rezultat zabeležen je i u drugim studijama kolorektalnih karcinoma (Zheng i sar., 2000, Shen i sar., 2003), gde je između ostalog metilacija ovog gena bila asocirana sa ženskim polom. Pored toga, primećena je i značajna povezanost metilacije gena *p14ARF* sa ranim stadijumima kolorektalnih karcinoma (TNM I i TNM II) (Burri i sar., 2001, Dominguez i sar., 2003, Chaar i sar., 2014), što ukazuje na potencijalnu dijagnostičku ulogu metilacionog statusa ovog gena kod tumora debelog creva. S obzirom na relativno čestu pojavu abrentne metilacije gena *p14ARF* u našoj grupi uzoraka, metilacioni status ovog gena bi mogao da se razmotri kao potencijalni dijagnostički parametar u KR, pri čemu su neophodne dodatne analize u koje bi morali biti uključeni i ispitanici u ranim fazama bolesti.

Metilacija gena *p14ARF* nije bila značajno povezana sa odgovorom ispitanika na HRT, kao ni sa tokom i krajnim ishodom bolesti u ovoj studiji, a slični rezultati dobijeni su i u drugim istraživanjima koja su za temu imala ispitivanje uloge metilacione inaktivacije ovog gena u patogenezi KRK (Esteller i sar., 2000, Hibi i sar., 2002, Kang i sar., 2008). Što se tiče podataka o potencijalnoj prediktivnoj i prognostičkoj ulozi metilacije ovog gena kod obolelih od KRK, broj studija je ograničen, sa često kontradiktornim rezultatima. Autori koji su zabeležili korelaciju metilacije gena *p14ARF* sa ranim stadijumima tumora (TNM I i TNMII) (Chaar i sar., 2014), takođe su uočili da ovi tumori debelog creva, iako dijagnostifikovani u ranoj fazi, pokazuju invazivan karakter sa izraženim infiltrativnim rastom u okolno tkivo. Ovi rezultati sugerišu da bi metilacija gena *p14ARF* mogla biti marker invazivnijih tipova KRK, sa sklonošću ka daljoj progresiji tumora i

formiranju lokalnih recidiva i metastaza. U okviru naše studije zabeležen je veći procenat metilacije gena *p14ARF* kod obolelih kod kojih je došlo do pojave lokalnih recidiva i/ili metastaza nego kod obolelih bez recidiva (54,2% vs. 30,3%), ali uočena asocijacija nije bila statistički značajna ($p=0,124$). S druge strane, Hibi i Nakao, (2006), pokazali su da je metilacija gena *p14ARF* sa istovremenom metilacionom inaktivacijom druga četiri gena (*p16INK4a*, *HLTF* (eng. *Helicase-Like Transcription Factor*; *HLTF*), *CDH13* i *RUNX3* (eng. *Runt-Related Transcription Factor*; *RUNX3*)) kod KRK povezana sa manje agresivnim tokom bolesti, odnosno manjim brojem zahvaćenih limfnih čvorova. Potencijalnu ulogu metilacionog statusa gena *p14ARF* u predikciji agresivnijeg ponašanja karcinoma rektuma, treba razmotriti na većem broju uzoraka i u kombinaciji sa alteracijama drugih gena za koje se takođe zna da doprinose invazivnim karakteristikama tumora debelog creva kao što su *KRAS*, *p53*, *VEGF*, *TIAM1* (eng. *T-Cell Lymphoma Invasion and Metastasis 1*; *TIAM1*); i drugi (Fan i sar., 2005, Boutin i sar., 2017, Izumi i sar., 2019, Li i sar., 2019).

U našoj studiji, metilacija bar jednog ispitivanog gena detektovana je kod 60,3% ispitanika, dok je istovremena metilacija gena *p16INK4a* i *p14ARF* bila prisutna kod skoro petine obolelih, što ukazuje na to da je epigenetička alteracija ova dva gena relativno čest događaj koji može imati potencijalno važnu ulogu u patogenezi karcinoma rektuma. U studiji koja je uključivala karcinome kolona, bešike i dojke pokazana je značajna korelacija između kometilacije gena *p16INK4a* i *p14ARF* i kliničko-patoloških parametara koji su povezani sa nepovoljnijom prognozom kod ovih maligniteta (Dominguez i sar., 2003). Rezultati rada Lee i saradnika iz 2006. godine ukazuju da simultana metilacija oba gena ima veći prognostički značaj kod karcinoma kolona nego metilacioni status svakog gena pojedinačno. Pored toga, zabeleženo je i da kolorektalni karcinomi sa istovremeno prisutnom metilacijom gena *p14ARF* i *p16INK4a* ispoljavaju invazivnije karakteristike u odnosu na tumore debelog creva bez istovremene inaktivacije ova dva gena (Hibi i sar., 2002). Među našim ispitanicima nisu utvrđene ovakve asocijacije, odnosno nije utvrđena povezanost istovremene metilacije ova dva gena sa kliničko-patološkim parametrima, niti je pokazana prognostička i prediktivna uloga istovremene metilacije datih gena kod ispitanika obuhvaćenih studijom. Metilacioni status ispitivanih gena analiziran je primenom PCR metode specifične za metilaciju kvalitativnog karaktera, na osnovu koje se ne može odrediti procentualna zastuplenost metilovanih, odnosno nemetilovanih alela u istom uzorku. Ovakav kvantitativni podatak bi doprineo interpretaciji značaja istovremene metilacije u našoj grupi uzoraka. Pored toga, efekat istovremenog prisustva metilacije navedenih gena kod KR svakako treba analizirati na većem broju uzoraka. Rezultati studija na ćelijskim linijama i mišijim model sistemima sugerišu da inaktivacija lokusa *INK4a/ARF* možda nije ključni događaj u inicijalnim fazama kancerogeneze, ali svakako u sadejstvu sa drugim onkogenim događajima doprinosi daljoj progresiji i invazivnosti tumora (Uhrbom i sar., 2002, Aguirre i sar., 2003). Stoga je neophodno analizirati i druge molekularne događaje koji bi bili od potencijalnog značaja za patogenezu karcinoma rektuma.

Procenat detektovanih mutacija u genu *KRAS* u našoj studiji je skladu sa rezultatima drugih studija, prema kojima su mutacije u ovom genu prisutne kod 19-48% obolelih od karcinoma rektuma (Bengala i sar., 2010, Gaedcke i sar., 2010, Garcia-Aguilar i sar., 2011, Duldulao i sar., 2013). Najčešće detektovani tip mutacije (36%) bila je transverzija G u T na drugoj poziciji kodona 12, što rezultuje u zameni glicina valinom (G12V). Ovaj rezultat je u saglasnosti sa prethodno objavljenim studijama sprovedenim na obolelima od KRK sa našeg geografskog područja, prema kojima se najveća učestalost ovog tipa mutacije u genu *KRAS* pripisuje izloženosti region-specifičnim karcinogenima (Urošević i sar., 1993, Krtolica i sar., 2007). U ovoj studiji nije utvrđena povezanost metilacionog statusa gena *KRAS* sa kliničko-patološkim parametrima kao što su starost i pol ispitanika, odnosno TNM stadijum tumora, kao ni u većini prethodno objavljenih studija (Andreyev i sar., 1998). Međutim, zabeležena je značajna asocijacija između mutacija gena *KRAS* i

lokalizacije tumora u srednjem rektumu ($p=0,019$). Pored toga, primećeno je da se kod ispitanika sa tumorima lokalizovanim u srednjem rektumu i istovremeno prisutnom mutacijom gena *KRAS* češće razvijaju lokalni recidivi i/ili metastaze, nego kod ispitanika sa neizmenjenim genom *KRAS* u tumorima na istoj lokaciji (59% vs. 20%, $p=0,036$). Poznato je da postoji korelacija između veće udaljenosti tumora rektuma od anokutane linije i slabog odgovora na HRT jer primarni tumori sa takvom lokacijom imaju veći invazivni potencijal (Sauer i sar., 2004). S obzirom da nema dostupnih podataka o povezanosti mutacionog statusa ovog gena sa lokalizacijom tumora, potencijalni klinički značaj ovog rezultata treba ispitati na većem broju uzoraka.

Mutaciona aktivacija gena *KRAS* jedan je od najispitivanijih onkogenih događaja u patogenezi KRK. I pored toga, njegova prognostička i prediktivna uloga u karcinomu rektuma nije u potpunosti definisana. Rezultati studija koje su ispitivale potencijalnu ulogu mutacionog statusa gena *KRAS* kao prediktora odgovora obolelih od karcinoma rektuma na preoperativnu HRT su kontradiktorni. Dok je u određenom broju studija uočena povezanost prisustva mutacija u genu *KRAS* sa nepovoljnijim odgovorom na HRT (Luna-Perez i sar., 2000, Garcia-Aguilar i sar., 2011, Duldulao i sar., 2013), postoje studije kod kojih ovakve asocijacije nisu uočene (Gaedcke i sar., 2010, Garassino i sar., 2011). Ipak, treba naglasiti da u ovakvim studijama nisu primenjivani uvek isti hemioterapeutici, kao i da su postojali različiti principi definisanja tumorskog odgovora. Pored toga, često su u analizu mutacionog statusa uključeni i drugi kodoni pored standardnog 12. i 13. kodona gena *KRAS*. U našoj studiji, prisustvo mutacija u genu *KRAS* nije bilo povezano sa odgovorom na HRT, kao ni sa tokom i krajnjim ishodom bolesti. Međutim, kada se posmatraju specifični tipovi mutacija, prisustvo transverzije G u C na drugoj poziciji 12. kodona (G12A) značajno koreliše sa povoljnijim odgovorom na HRT, u poređenju sa ostalim tipovima detektovanih mutacija u ispitivanim kodonima (100% vs. 29%, $p=0,017$). Bez obzira na mali broj uzoraka sa prisutnom mutacijom G12A u ovoj studiji, rezultat je vredan pažnje i zahteva dodatna ispitivanja na većem broju uzoraka. Većina studija koje su se fokusirale na ispitivanje prediktivne uloge gena *KRAS* kod karcinoma rektuma su se zasnivale na utvrđivanju samog mutacionog statusa ovog gena bez identifikacije specifičnih tipova detektovanih mutacija, što značajno doprinosi nekonzistentnosti dobijenih rezultata. Prethodno objavljeni rezultati su pokazali da različiti tipovi mutacija gena *KRAS* imaju i različit transformišući potencijal na ćelijskom nivou. U jednoj od multi-institucionalnih RASCAL studija (Andreyev i sar., 2001) uočeno je da mutacija tipa izmene G u T u okviru 12. kodona doprinosi nastanku agresivnijih tipova kolorektalnih karcinoma, što nije slučaj sa mutacijama tipa zamene G u A ili G u C na istom kodonu. Rezultati studije Garassino i saradnika iz 2011. godine, pokazali su da različit tip mutacije u okviru 12. kodona gena *KRAS* može biti povezan sa različitim nivoom hemiosenzitivnosti, što se na ćelijskom nivou ogleda u aktivaciji različitih nishodnih puteva prenosa signala u odgovoru na primenjeni hemioterapeutik. Pored toga, postoji mogućnost da tumori sa određenim tipom mutacije u genu *KRAS* mogu biti povezani sa različitim dodatnim genetičkim alteracijama. Tako je npr. zabeležena asocijacija prisustva mutacije tipa G13D (tranzicija G u A) u genu *KRAS* sa prisustvom mutacije u genu *TP53* (Duldulao i sar., 2013). Međutim, nema mnogo podataka o uticaju i značaju mutacije tipa G12A (transverzija G u C) u progresiji tumora, verovatno zato što ovaj tip mutacije nije tako čest događaj i predstavlja svega 11% svih detektovanih tipova mutacija u genu *KRAS* kod KRK-a (Andreyev i sar., 1998). Kao što je poznato, kolon i rektum kao različite anatomske celine debelog creva izloženi su različitim sredinskim faktorima, a različit tip mutacija može nastati usled dejstva različitih karcinogena (Doll i Peto., 1981, Boyle, 1998). Mutacije gena *KRAS* tipa izmene G u T mogu nastati usled dejstva policikličnih aromatičnih ugljovodonika i heterocikličnih amina (Vousden i sar., 1986, Brown i sar., 1990), izmene G u A pod dejstvom alkilirajućih agenasa prisutnih u namirnicama bogatim nitritima (Bos, 1989, Capella i sar., 1991), a za transverzije G u C pokazano je da nastaju u uslovima oksidativnog stresa (Kino i Sugiyam, 2001). Imajući u vidu navedene činjenice, pretpostavka je da različiti karcinogeni dovode do različitih promena u genomu i doprinose u većoj ili manjoj meri

tumorskoj progresiji i invazivnosti, što se reflektuje kroz različit tip detektovanih mutacija u genu *KRAS*.

Dobijeni rezultati analize metilacionog statusa gena *p16INK4a* i *p14ARF*, kao i mutacionog statusa gena *KRAS* u našoj studiji sugerišu da treba sagledati globalni genetički, odnosno epigenetički status tumorskih ćelija, ne samo uticaj pojedinačnih molekularnih događaja na razvoj i progresiju tumora, kao i odgovor tumorskih ćelija na primenjenu terapiju. Imajući u vidu činjenicu da je inaktivacija lokusa *INK4a/ARF* zabeležena kod 70% slučajeva KRK sa istovremeno prisutnom mutacijom u genu *KRAS* (Burri i sar., 2001, Dominguez i sar., 2003, Lind i sar., 2004, Kaneda i Yagi, 2011), ispitivali smo i međusobnu povezanost detektovanih epigenetičkih odnosno genetičkih promena u našoj grupi uzoraka.

Iako nije uočena direktna veza između metilacionog statusa gena *p16INK4a*, metilacionog statusa gena *p14ARF* i mutacionog statusa gena *KRAS*, pri analizi kombinovanog uticaja promena u navedenim genima na odgovor na HRT, tok i ishod bolesti zabeleženo je nekoliko značajnih rezultata.

Pre svega, izvojila se podgrupa ispitanika sa istovremeno prisutnom metilacijom gena *p14ARF* i mutacijom gena *KRAS*, kod kojih su značajno češće detekovani lokalni recidivi i/ili metastaze ($p=0,027$). U prethodnim studijama karcinoma rektuma pokazano je da prisustvo mutacije *KRAS* u ranim stadijumima tumora (TNM I) asocira sa pojavom udaljenih recidiva u kasnijim fazama bolesti (Sideris i sar., 2016). Detekcija mutacije ovog gena kod tumora u lokalno uznapređovalim stadijumima KR jeste česta pojava, ali mutacioni status gena *KRAS* nije dovoljan za predikciju agresivnijeg ponašanja tumora i potrebna je analiza i drugih parametara koji bi ukazivali na potencijalni rizik za razvoj recidiva (Sideris i sar., 2017). Iako nije uočena direktna povezanost između metilacionog statusa gena *p14ARF* i mutacionog statusa gena *KRAS* u našoj studiji, u literaturi je opisana dobro poznata funkcija proteinskog produkta gena *p14ARF* u supresiji ćelijskog rasta u odgovoru na aktivaciju onkogena (Palmero i sar., 1998, Berkovich i sar., 2003). Dobijeni rezultat ukazuje na potencijalno sadejstvo promena u ova dva gena u nastanku agresivnije forme tumora. S jedne strane aktivacija onkogena *KRAS* kao inicijalni događaj dovodi do nekontrolisane deobe tumorskih ćelija i daljeg rasta potencijalno invazivnog tumora. S druge strane, metilacionom inaktivacijom gena *p14ARF* izostaje zaustavljanje ćelijskog ciklusa i indukovanje apoptoze kao tumor-supresornih mehanizama, što omogućava dalju propagaciju tumora i formiranje lokalnih recidiva. Ovakav model onkogeneze adenokarcinoma duktusa pankreasa pokazan je eksperimentalno na miševima, kod kojih mutacija gena *KRAS* u kombinaciji sa inaktivacijom lokusa *INK4a/ARF* dovodi do ranog formiranja premalignih lezija koje brzo propagiraju ka invazivnim i metastatskim oblicima tumora, dok pojedinačno ovi molekularni događaji ne dovode do formiranja agresivnih formi tumora (Aguirre i sar., 2013). Treba naglasiti da su u našem istraživanju metilacija gena *p14ARF* i mutacija gena *KRAS* češće detektovane u grupi obolelih sa lokalizacijom tumora u srednjem rektumu nego u ostalim segmentima rektuma (23,3% vs. 7,1% vs. 7,1%), kao i u većem procentu kod ispitanika sa visokom ekspresijom proteina VEGF, nego kod ispitanika sa niskom ekspresijom ovog proteina (22% vs. 6,9%). Iako uočene razlike nisu bile statističke značajne, pokazano je da sama lokacija tumora u srednjem rektumu (do 10 cm od anokutane linije) (Derbel i sar., 2013), kao i povišena ekspresija proteina VEGF kao medijatora angiogeneze (Giatromanolaki i sar., 2006) mogu biti povezane sa većom verovatnoćom za pojavu recidiva i metastaza kod KRK. Očigledno je da metilacioni status gena *p14ARF* i mutacioni status gena *KRAS* mogu definisati podgrupu obolelih sa karcinomima rektuma koji ispoljavaju agresivnije ponašanje, što svakako treba razmotriti u daljim studijama na većem broju uzoraka. Pored toga, među ispitanicima obuhvaćenim ovom studijom izdvojila se i podgrupa obolelih sa istovremeno prisutnom metilacijom gena *p16INK4a* i *p14ARF* i mutacijom u genu *KRAS* kod kojih je

zabeleženo statistički značajno kraće ukupno preživljavanje u odnosu na ostale podgrupe pacijenata ($p=0,011$). Iako je broj uzoraka sa navedenim promenama u genima *p16INK4a*, *p14ARF* i *KRAS* mali (svega 4), dobijeni rezultat nije zanemarljiv i može imati potencijalni prognostički značaj kod obolelih od KR, uz dodatno ispitivanje na većem broju uzoraka. Značajno kraće preživljavanje zabeleženo je i kod miševa kod kojih su eksperimentalno indukovani različiti tumori, uz prisustvo onkogene aktivacije gena *KRAS* i inaktivacije lokusa *INK4a/ARF* (Aguirre i sar., 2003, Konstantinidou i sar., 2013). U studiji autora Serra i saradnika iz 2014. godine, koja je rađena na ćelijskim linijama KRK otkriven je molekularni mehanizam, odnosno signalni protein koji posreduje u metilacionoj inaktivaciji lokusa *INK4a/ARF* u odgovoru na onkogenu aktivaciju gena *KRAS*. U pitanju je protein ZNF304 (eng. *Zinc Finger Protein 304*, ZNF304) koji funkcioniše kao transkripcioni represor, odnosno regrutuje represioni proteinski kompleks, uključujući i enzim DNMT1 koji vrši metilaciju i utišavanje ekspresije kompletnog lokusa *INK4a/ARF*. Pokazano je da ovaj regulatorni protein transkripcije može da indukuje i metilacionu inaktivaciju ekspresije i drugih tumor-supresornih gena odgovornih za CIMP fenotip kod KRK. Za jasnije sagledavanje prognostičke uloge metilacionog statusa gena *p16INK4a* i *p14ARF*, kao i mutacionog statusa gena *KRAS* kod karcinoma rektuma svakako je neophodna analiza na većem brojem uzoraka i dužim periodom praćenja obolelih nakon tretmana.

S obzirom da promene u ispitivanim genima pojedinačno ne utiču značajno na odgovor na HRT, tok i ishod bolesti, u daljem istraživanju smo analizirali da li istovremeno prisustvo metilacije gena *p16INK4a* ili *p14ARF*, mutacije gena *KRAS* i izmenjene ekspresije proteina EGFR, VEGF, Bcl-2 i/ili Ki-67 može doprineti definisanju podgrupa obolelih kod kojih će ispitivani molekularni događaji imati precizniju prediktivnu i prognostičku ulogu. U kombinovanoj analizi metilacije gena *p16INK4a* i *p14ARF*, kao i mutacije gena *KRAS* i različitog nivoa ekspresije odabranih proteina dobijeni su rezultati vredni pažnje, pogotovo oni koji se odnose na simultano dejstvo metilacije odnosno mutacije ispitivanih gena i povišene ekspresije proteina VEGF.

Rezultati kombinovane analize pokazali su da je istovremeno prisustvo kako metilacije gena *p16INK4a*, tako i gena *p14ARF* i povišene ekspresije proteina VEGF značajno povezano sa agresivnijim ponašanjem tumora, odnosno sa nepovoljnijim odgovorom obolelih na HRT ($p=0,001$, odnosno $p=0,038$) i češćom pojavom lokalnih recidiva i/ili metastaza ($p=0,072$, odnosno $p=0,075$). Prema rezultatima drugih studija, kod KRK ekspresija proteina VEGF obično je asocirana sa agresivnijim ponašanjem tumora i lošom prognozom bolesti (Giatromanolaki i sar., 2006, Giralt i sar., 2007), što je pokazano i u našoj studiji. Dobijeni rezultati posebno naglašavaju važnu ulogu proteina VEGF u nastanku tumora, kao i ulogu gena *p16INK4a* i *p14ARF* u supresiji tumorskog rasta. Poznato je da su produkti ova dva gena supresori procesa angiogeneze i tu ulogu ostvaruju regulacijom ekspresije VEGF na nekoliko načina (Kawagishi i sar., 2010, Lu i sar., 2012). Produkti gena *p16INK4a* i *p14ARF* suprimiraju ekspresiju gena *VEGF* putem inhibicije glavnog regulatornog proteina njegove ekspresije, HIF-1 α (eng. *Hypoxia-Inducible Factor-1 α* , HIF-1 α) (Lu i sar., 2012). Pored toga, pokazano je i da *p16INK4a* može da blokira puteve prenosa signala posredovane VEGF na receptorskom nivou, odnosno suprimiranjem ekspresije gena *FLK1* (eng. *Tyrosine Kinase Growth Factor Receptor FLK1, Mouse, Homolog of; FLK1*) za receptor VEGF 2 (Lu i sar., 2012). Iako u našoj studiji nije utvrđena direktna povezanost ekspresije proteina VEGF sa metilacionim statusom gena *p16INK4a* i *p14ARF*, dobijeni rezultati sugerišu da istovremeno povišena ekspresija ovog faktora i inaktivacija gena *p16INK4a* ili *p14ARF* može indukovati hemiozistenciju tumorskih ćelija na primenjenu HRT. Poznato je da se stvaranjem novih krvnih sudova usled povišene ekspresije VEGF povećava i njihova permeabilnost, što za posledicu ima smanjenu efikasnost usvajanja hemioterapeutika od strane tumorskog tkiva (Azria i sar., 2005). Pored toga, uočeni trendovi ka češćoj pojavi lokalnih recidiva i/ili metastaza ukazuju da se tumori sa ovakim molekularnim promenama brže razvijaju i imaju veći invazivni potencijal.

Osim toga, uočeno je i značajno kraće ukupno preživljavanje obolelih u našoj studiji kod kojih je istovremeno prisutna metilacija gena *p16INK4a* i visoka ekspresija proteina VEGF ($p=0,010$). Sličan rezultat zabeležen je prilikom analize karcinoma skvamoznih ćelija jednjaka, gde se inaktivacija gena *p16INK4a* u kombinaciji sa određenim nivoom ekspresije proteina VEGF povezuje sa lošim krajnjim ishodom obolelih (Takeuchi i sar., 2004). Kombinovan uticaj ova dva molekularna događaja na ukupno preživljavanje ispitanika obuhvaćenih našom studijom može se objasniti time da inaktivacija gena *p16INK4a* dovodi do nekontrolisane proliferacije tumorskih ćelija i brže progresije ka invazivnijim stadijumima bolesti. Sa druge strane, povišena ekspresija proteina VEGF, koja je inače nezavisan parameter kraćeg ukupnog preživljavanja u našoj studiji, indirektno utiče na krajnji ishod bolesti tako što promovise stvaranje novih krvnih sudova i dalju invaziju tumorskih ćelija u okolno tkivo. Za razliku od metilacionog statusa gena *p16INK4a*, metilacioni status gena *p14ARF* u kombinaciji sa nivoom ekspresije proteina VEGF ne koreliše značajno sa ukupnim preživljavanjem obolelih obuhvaćenih našom studijom ($p=0,266$). To nas dovodi do pretpostavke da su inaktivacija gena *p14ARF*, kao i povišena ekspresija proteina VEGF molekularni događaji koji imaju potencijal da dovedu do nastanka agresivnijeg oblika tumora, ali da na krajni ishod bolesti utiču i druge molekularne alteracije. Pregledom literature ustanovili smo da je ovo prva studija koja je za temu imala analizu uloge metilacionog statusa gena *p14ARF* i ekspresije proteina VEGF kod karcinoma rektuma. Slična istraživanja nisu zabeležena ni kod drugih tipova tumora. Da bi se rasvetlio potencijalni klinički značaj metilacije gena *p16INK4a* i *p14ARF* i izmenjene ekspresije faktora VEGF, potrebne su detaljnije analize većeg broja molekularnih markera uključenih u puteve prenosa signala posredovane VEGF, kao i gena koji regulišu ekspresiju proteina VEGF, kao što su *KRAS* i *TP53* (Figueras i sar., 2013, Amelio i Melino, 2015).

Kombinovanim analizama u našoj studiji uočena je i grupa ispitanika kod kojih je istovremeno prisutna metilacija gena *p16INK4a* i visoka ekspresija proteina EGFR povezana sa redom pojavom lokalnih recidiva i udaljenih metastaza, u odnosu na preostale tri grupe obolelih (10% vs. 53,2%, $p=0,038$). Pored toga, identifikovali smo grupu obolelih kod kojih je simultano prisustvo metilacije gena *p16INK4a*, niske ekspresije proteina VEGF i visoke ekspresije proteina EGFR povezano sa povoljnijim odgovorom na terapiju ($p=0,024$). Dobijeni rezultati nisu još uvek razjašnjeni i zahtevaju detaljnije analize. U nekoliko studija pokazano je da bazalni nivo ekspresije proteina EGFR asocira sa lošom prognozom, slabijim odgovorom tumorskog tkiva na terapiju, kao i češćom pojavom recidiva (Giralt i sar., 2005, Kim i sar., 2006, Li i sar., 2006), što nije slučaj u našoj studiji. Pored toga, u radu autora Zlobec i saradnika iz 2008. godine, pokazano je da je verovatnoća za postizanje kompletnog patološkog odgovora na HRT šest puta veća kod karcinoma rektuma sa pozitivnom ekspresijom proteina EGFR. Takođe je identifikovana grupa ispitanika kod kojih tumori sa pozitivnom ekspresijom proteina VEGF i negativnom ekspresijom proteina EGFR ispoljavaju hemiorezistentnost na terapiju. U studiji koja je obuhvatala obolele od mišićno-invazivnog tumora bešike, ekspresija proteina EGFR isto se pokazala kao povoljan prognostički faktor, odnosno povećan nivo ekspresija ovog proteina bio je značajno povezan sa dužim ukupnim preživljavanjem i redom pojavom udaljenih metastaza (Chakravarti i sar., 2005). Rezultati ovih studija sugerišu da povećana ekspresija proteina EGFR utiče na bolju senzitivnost tumorskih ćelija na hemioradioterapiju, što se odražava i na bolji odgovor na HRT. Visok nivo ekspresije proteina EGFR generalno nije povoljan događaj jer dovodi do ubrzane proliferacije tumorskih ćelija. Rezultati studije autora Roberts i Der iz 2007. godine, ukazali su na to da putevi prenosa signala preko proteina VEGF i EGFR nisu međusobno povezani, dok su Ciardiello i saradnici u studiji iz 2006. godine pokazali da EGFR može uticati na povećanje ekspresije proteina VEGF. Iako naši rezultati sugerišu da nivo ekspresije ova dva proteina u kombinaciji sa metilacionim statusom gena *p16INK4a* mogu poslužiti u predikciji podgrupe obolelih sa manje agresivnom formom karcinoma rektuma, potrebna su dalja ispitivanja za potvrdu zapaženih asocijacija.

Rezultati našeg istraživanja su pokazali da mutacioni status gena *KRAS* ne doprinosi značajno predikciji odgovora na HRT, kao ni prognozi kod obolelih od karcinoma rektuma. Kada smo u analizu uključili i imunohistohemijske parametre, izdvojilo se nekoliko značajnih rezultata. Prethodno je uočeno da onkogen aktivacija gena *KRAS* u tumorskim ćelijama dovodi značajnog povećanja ekspresije proteina VEGF (Rak i sar., 1995, Figueras i sar., 2013). U našoj studiji nije uočena značajna asocijacija između mutacionog statusa gena *KRAS* i nivoa ekspresije proteina VEGF. Međutim, kada se posmatraju specifični tipovi detektovanih mutacija, uočava se asocijacija mutacije tipa G12A (transverzija G u C) u genu *KRAS* sa nižim nivoom ekspresije proteina VEGF ($p=0,012$). S druge strane, ispitanici kod kojih je detektovan bilo koji tip mutacije u okviru kodona 12 i 13 gena *KRAS* i istovremeno visok nivo ekspresije proteina VEGF ispoljavaju značajno nepovoljniji odgovor na primenjenu HRT ($p<0,001$), dolazi do češće pojave lokalnih recidiva i/ili metastaza ($p=0,003$), a zabeleženo je i kraće ukupno preživljavanje ($p=0,001$). Ovakve rezultate treba analizirati sa više aspekata. Pre svega, opet se ističe važnost utvrđivanja specifičnog tipa mutacija, a ne samo generalno određivanje mutacionog statusa gena *KRAS*, bez detaljne analize nukleotidnih promena na kodonima 12 i 13. U studiji Figueras i saradnika iz 2013. godine, pokazano je da različiti tipovi nukleotidnih izmena u analiziranom regionu gena *KRAS* imaju različit uticaj na bazalni nivo ekspresije proteina VEGF-A koja je posredovana transkripcionim regulatorom HIF-1 α , pri čemu se najviši nivo produkcije faktora VEGF-A ostvaruje ukoliko je prisutan G13D tip mutacije (tranzicija G u A) gena *KRAS*. Pored toga, postoji mogućnost da istovremeno prisustvo oba navedena molekularna događaja doprinosi agresivnijem ponašanju tumorskih ćelija, usled pojačanog inteziteta proliferacije kao posledice mutacije u genu *KRAS* sa jedne strane i pokretanja procesa neovaskularizacije kao rezultat povišene ekspresije faktora VEGF sa druge strane. Pošto je u našem istraživanju utvrđeno da je povišena ekspresija proteina VEGF povezana sa agresivnijim tokom bolesti nezavisno od mutacionog statusa gena *KRAS*, kao i metilacionog statusa gena *p16INK4a* i *p14ARF*, u budućim analizama treba ispitati ulogu i drugih regulatora angiogeneze koji bi mogli imati potencijalnu ulogu u progresiji karcinoma rektuma. Pre svega to se odnosi na gene čiji produkti učestvuju u JAK/STAT i PI3-kinaznim putevima prenosa signala (Steelman i sar., 2004).

Nepovoljan odgovor na primenjenu HRT u našoj studiji zabeležen je i kod obolelih sa istovremeno prisutnom mutacijom gena *KRAS* i visokom ekspresijom proteina Bcl-2, nego kod ostale tri grupe ispitanika (87,5% vs. 41,5%, $p=0,022$). Prekomerna ekspresija proteina Bcl-2 čest je događaj kod različitih tipova tumora (karcinomi prostate, pluća, debelog creva i želuca, kao i kod limfoma i leukemija) (Kirkin i sar., 2004), koji se povezuje sa rezistencijom na mnoge hemioterapeutike (Condon i sar., 2002, Buchholz i sar., 2003, García-Flórez i sar., 2015). Pored toga, pokazano je da povećana ekspresija ovog proteina predstavlja mehanizam kojim se ćelija štiti od radioterapijom-indukovane apoptoze (García-Flórez i sar., 2015), sa posledičnom pojavom radiorezistencije kod tretiranih ćelija (Kariya i sar., 1999, Lee i sar., 1999, Condon i sar., 2002). Ovim bi moglo delimično da se objasni da je u našoj grupi uzoraka odsustvo ekspresije proteina Bcl-2 u pretretmanskim biopsijama tumorskog tkiva u korelaciji sa povoljnijim terapijskim odgovorom na primenjeni tretman. Međutim, nema mnogo podataka kojima se objašnjava uticaj simultanog dejstva onkogene aktivacije gena *KRAS* i povišene ekspresije proteina Bcl-2 na odgovor na HRT. Iako u našoj studiji nije uočena direktna veza između mutacionog statusa gena *KRAS* i ekspresije proteina Bcl-2, poznato je da su tumorske ćelije sa mutacijom ovog proto-onkogeno otpornije na apoptozu (Hata i sar., 2014). U studijama na ćelijskim linijama KRK otkriveno je da mutacije gena *KRAS* indukuju značajno povišenu ekspresiju gena *Bcl-XL* (eng. *BCL2-Related Protein, Long Isoform, Included; BCLXL*), koji je inače strukturni i funkcionalni homolog gena *Bcl-2* (Zamzami i sar., 1998), takođe sa anti-apoptotskom ulogom (Okamoto i sar., 2015, Zaanan i sar., 2015). U cilju boljeg razumevanja našeg rezultata, neophodno je ispitati i druge molekularne regulatore procesa apoptoze, pre svega mutacioni status gena *TP53*, za koji je pokazano da ima

dominantniju ulogu u patogenezi karcinoma rektuma kao posebnom entitetu, nego kod karcinoma kolona (Kapiteijn i sar., 2001).

U daljim kombinovanim analizama, imunohistohemijski utvrđena ekspresija proteina Ki-67 izdvojila se kao mogući prediktor odgovora na HRT uz istovremeno prisustvo mutacije gena *KRAS*. Ekspresija ovog proteina se inače koristi kao pouzdan marker proliferacije ćelija i ima potencijalnu prognostičku ulogu u određenim malignitetima, uključujući i KRK (Haga i sar., 2003, Woo i sar., 2009). U prethodno objavljenoj studiji autora Jakob i saradnika iz 2008. godine, zapaženo je da je niži nivo ekspresije ovog proteina u pozitivnoj korelaciji sa povoljnijim odgovorom na HRT kod obolelih od KR, a takva asocijacija utvrđena je i u našoj studiji. Iako nije utvrđena direktna povezanost mutacionog statusa gena *KRAS* i nivoa ekspresije proteina Ki-67, analizom pojedinačnih tipova mutacija gena *KRAS* pokazano je da postoji asocijacija između G12A tipa mutacije (transverzija G u C) i niskog nivoa ekspresije proteina Ki-67 ($p=0,012$). Dobijeni rezultat sugerše da karcinomi rektuma sa ovim tipom mutacije gena *KRAS* poseduju nižu proliferativnu aktivnost, nego tumori sa mutacijama gde su detektovane izmene nukleotida G u T i G u C. Pored toga, u našoj studiji istovremeno prisustvo mutacije gena *KRAS* i povišene ekspresije proteina Ki-67 asocira sa nepovoljnim odgovorom na HRT ($p=0,051$), kao i češćom pojavom lokalnih recidiva i/ili metastaza ($p=0,079$). S obzirom da su uočene asocijacije statistički trendovi, potrebno ih je potvrditi na većem broju uzoraka. U radu autora Whoo i saradnika iz 2009. godine, uočen je povećan rizik za nastanak recidiva kod obolelih od adenokarcinoma pluća kod kojih su takođe istovremeno detektovane mutacije gena *KRAS* i povišena ekspresija proteina Ki-67. Pošto u većini studija koje su se bavile ispitivanjem prediktivne uloge proteina Ki-67 kod obolelih od KR nije utvrđen uticaj izmenjene ekspresije ovog faktora na odgovor na primenjenu HRT (Spolverato i sar., 2011), dobijeni rezultat, svakako treba dodatno proveriti.

Intezivna istraživanja molekularnih karakteristika KRK u poslednjoj dekadi su značajno doprinela evoluciji našeg razumevanja ovog tipa tumora od heterogene grupe oboljenja nejasne etiologije, sa varijabilnim kliničkim tokom, do preciznije definisanih molekularnih podtipova tumora debelog creva. Identifikacija ključnih molekularnih događaja i puteva prenosa signala koji su specifični za određeni podtip ili lokaciju tumora debelog creva bi doprinela kreiranju novih potencijalnih biomarkera, čiju kliničku primenu treba detaljno ispitati. Zbog toga su i brojne studije poslednjih godina fokusirane na pronalaženje novih prediktivnih i prognostičkih parametara, koji bi omogućili optimizaciju tretmana za svakog obolelog pojedinačno. Iako su utvrđene značajne asocijacije između određenih molekularnih događaja i standardnih kliničko-patoloških faktora kod KRK, za sada nijedan ispitivani molekularni parametar nije uvršten u TNM sistem dijagnostike karcinoma debelog creva (Inamura i sar., 2018).

Kao što je prethodno naglašeno, karcinome kolona i karcinome rektuma možemo posmatrati kao dva odvojena entiteta (Carethers, 2011, Schmoll i sar., 2012), koje odlikuje različit profil molekularnih promena (Kapiteijn i sar., 2001), a prisutne su i značajne razlike u metilacionim obrazcima pojedinih gena duž donjeg gastrointestinalnog trakta (Jo i sar., 2012). Iako za sada ne postoje molekularni prediktori odgovora KR na primenjenu HRT, definisanje potencijalnih metilacionih markera bi moglo da predvidi odgovor na HRT, što bi doprinelo daljoj individualizaciji tretmana (Williamson i sar., 2015). Međutim, klinička primena metilacionih markera zahteva pre svega usaglašenost u metodama za utvrđivanje metilacionog statusa gena, kao i utvrđivanje konsezena oko gena uključenih u CIMP fenotip kod KR i precizno definisanje uloge metilacije pojedinih gena u predikciji odgovora na terapiju. Pored toga, u cilju bolje stratifikacije obolelih u pogledu predikcije odgovora i prognoze bolesti, metilacione analize treba dopuniti i analizama onih molekularnih parametara za koje je već ustanovljeno da imaju prediktivnu ulogu u KRK, kao što je mutacioni status gena *KRAS*. Standardizacija primene postojećih biomarkera u

kombinaciji sa ispitivanjem novih potencijalnih genetičkih ili epigenetičkih molekularnih parametara pristup je koji vodi ka primeni personalizovane terapije KR u budućnosti.

Osnovna limitacija naše studije je relativno mali broj ispitanika uključenih u studiju. Proširenje analizirane grupe, kao i duži period praćenja, svakako bi pomoglo u proveru validnosti dobijenih statističkih trendova. Primena kvantitativnih metoda analize metilacionog statusa sa posledičnim efektom na nivo ekspresije analiziranih gena bi doprinela preciznijem definisanju epigenetičkih izmena kako u dijagnostici tako i u praćenju bolesnika sa karcinomom rektuma. Rezultati naše studije naročito ukazuju na značaj odabranih bioloških markera za precizniju karakterizaciju karcinoma rektuma različite lokalizacije. Istovremeno, imunohistohemijski detektabilni nivo ekspresije odabranih proteina treba dodatno proveriti drugim metodama za analizu proteina, naročito kod onih čiji je nivo ekspresije bio imunohistohemijski nedetektabilan.

Naši rezultati pokazali su da ispitivane promene u genima *p16INK4a*, *p14ARF* i *KRAS* pojedinačno gledano, nisu značajni prediktivni i prognostički faktori kod obolelih od KR u lokalno uznapredovalom stadijumu. Međutim, kombinovane analize metilacionih, odnosno mutacionog statusa ispitivanih gena i nivoi ekspresije odabranih proteina (EGFR, VEGF, Bcl-2, Ki-67), mogu imati potencijalni klinički značaj u identifikaciji podgrupa obolelih od KR, koje se međusobno razlikuju kako prema odgovoru na HRT, tako i prema toku i ishodu bolesti. Dobijeni rezultati su vredni pažnje i ukazuju na potrebu za daljim prospektivnim studijama sa dužim periodom praćenja obolelih, gde su pored ispitivanja promena u genima *p16INK4a*, *p14ARF* i *KRAS*, uključeni i dodatni geni čiji produkti regulišu ćelijske procese kao što su proliferacija, angiogenza i apoptoza.

6. ZAKLJUČCI

Na osnovu dobijenih rezultata mogu se izvesti sledeći zaključci:

1. Metilacija promotorskog regiona gena *p16INK4a* i *p14ARF* detektovana je u značajnom broju ispitanika obolelih od KR, što sugeriše da epigenetički mehanizmi regulacije genske ekspresije mogu imati važnu ulogu u patogenezi ovog tipa tumora.
2. Mutacije u genu *KRAS* detektovane su kod trećine ispitanika obolelih od KR. Najčešće detektovan tip mutacije u genu *KRAS* je transverzija G u T (G12V) na drugoj poziciji kodona 12, što je u skladu sa izloženošću region-specifičnim karcinogenima.
3. Nije detektovana statistički značajna asocijacija metilacije gena *p16INK4a*, odnosno gena *p14ARF* i ispitivanih kliničko-patoloških i imunohistohemijskih parametara kod obolelih od KR.
4. Mutacija gena *KRAS* je statistički značajno češće detektovana kod tumora lokalizovanih u srednjem rektumu, dok povezanost sa ostalim kliničko-patološkim i imunohistohemijskim parametrima nije detektovana. Kada je analiziran tip mutacija, prisustvo transverzije G u C (G12A) u 12. kodonu gena *KRAS* je statistički značajno povezano sa nižom ekspresijom proteina VEGF i Ki-67.
5. Pojedinačno gledano, metilacioni status gena *p16INK4a* nema prediktivni ni prognostički značaj kod obolelih od KR, ali u kombinaciji sa istovremeno povišenom ekspresijom VEGF faktora, metilacija gena *p16INK4a* je statistički značajno povezana sa nepovoljnim odgovorom na HRT i kraćim ukupnim preživljavanjem.
6. Metilacija gena *p16INK4a* je u kombinaciji sa nižom ekspresijom proteina VEGF i povišenom ekspresijom proteina EGFR statistički značajno povezana sa povoljnim odgovorom na HRT, dok je u kombinaciji sa povišenom ekspresijom proteina EGFR, nezavisno od statusa ekspresije proteina VEGF, metilacija gena *p16INK4a* statistički značajno povezana sa ređom pojavom lokalnih recidiva i/ili metastaza kod obolelih od KR.
7. Pojedinačno gledano, metilacioni status gena *p14ARF* nema prediktivni ni prognostički značaj kod obolelih od KR, ali u kombinaciji sa istovremeno povišenom ekspresijom proteina VEGF, metilacijom gena *p14ARF* statistički je značajno povezana sa nepovoljnim odgovorom na HRT, dok asocijacija sa ukupnim preživljavanjem nije utvrđena.
8. Mutacioni status gena *KRAS* zasebno posmatran nema prediktivni ni prognostički značaj kod obolelih od KR, ali u kombinaciji sa istovremeno povišenim nivoom ekspresije proteina VEGF i Bcl-2, prisustvo mutacija u genu *KRAS* je statistički značajno povezano sa nepovoljnim odgovorom na terapiju. U slučaju istovremenog prisustva mutacija u genu *KRAS* i povišene ekspresije proteina VEGF, utvrđena je i statistički značajna asocijacija sa agresivnijim tokom bolesti i kraćim ukupnim preživljavanjem.
9. Utvrđena je statistički značajna asocijacija transverzije G u C (G12A) u 12. kodonu gena *KRAS* sa povoljnim odgovorom na terapiju.
10. Istovremeno prisustvo metilacije gena *p14ARF* i mutacije gena *KRAS* je povezano sa značajno češćom pojavom lokalnih recidiva i/ili metastaza, odnosno agresivnijim tipom tumora.

11. Istovremeno prisustvo metilacije gena *p16INK4a* i *p14ARF* i mutacije u genu *KRAS* statistički je značajno povezano sa kraćim ukupnim preživljavanjem.
12. Predloženi model istovremene analize epigenetičkih (metilacija gena *p16INK4a* i *p14ARF*) i genetičkih promena (mutacije gena *KRAS*) i nivoa ekspresije odabranih proteina uključenih u procese neoplastične transformacije (EGFR, VEGF, Bcl-2 i Ki67) može imati prediktivni i prognostički značaj kod obolelih od KR.

7. LITERATURA

Aguirre A, Bardeesy N, Sinha M, Lopez L, Tuveson D, Horner J, et al. Activated Kras and Ink4a/Arf deficiency cooperate to produce metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma. *Gene Dev* 2003; 17: 3112-3126.

Amelio I, Melino G. The p53 family and the hypoxia-inducible factors (HIFs): determinants of cancer progression. *Trends Biochem Sci* 2015; 40: 425-434.

Amersi F, Agustin M, Ko CY. Colorectal cancer: epidemiology, risk factors, and health services. *Clin Colon Rectal Surg* 2005; 18: 133-140.

Andreyev HJ, Norman AR, Cunningham D, Oates JR, Clarke PA. Kirsten ras mutations in patients with colorectal cancer: the multicenter "RASCAL" study. *J Natl Cancer Inst* 1998; 90: 675-684.

Andreyev HJ, Norman AR, Cunningham D, Oates J, Dix BR, B. Iacopetta BJ, et al. Kirsten ras mutations in patients with colorectal cancer: the "RASCAL II" study. *Br J Cancer* 2001; 85: 692-696.

Aust DE, Baretton GB. Serrated polyps of the colon and rectum (hyperplastic polyps, sessile adenomas, traditional serrated adenomas, and mixed polyps)-proposal for diagnostic criteria. *Virchows Arch* 2010; 457: 291-297.

Ausubel FM. In: Wiley J and sons, editors. *Current Protocols in Molecular Biology* (New York) 1987; 211-223.

Azad N, Zahnow CA, Rudin CM, Baylin SB. The future of epigenetic therapy in solid tumours-lessons from the past. *Nat Rev Clin Oncol* 2013; 10: 256-266.

Azria D, Bibeau F, Barbier N, Zouhair A, Lemanski C, Rouanet P, et al. Prognostic impact of epidermal growth factor receptor (EGFR) expression on loco-regional recurrence after preoperative radiotherapy in rectal cancer. *BMC Cancer* 2005; 5: 62-71.

Badal V, Menendez S, Coomber D, Lane DP. Regulation of the p14ARF promoter by DNA methylation. *Cell Cycle* 2008; 7: 112-119.

Bader FG, Roblick UJ, Oevermann E, Bruch HP, Schwandner O. Radical surgery for early colorectal cancer--anachronism or oncologic necessity?. *Int J Colorectal Dis* 2008; 23: 401-407.

Bae JM, Kim JH, Cho NY, Kim TY, Kang GH. Prognostic implication of the CpG island methylator phenotype in colorectal cancers depends on tumour location. *Br J Cancer* 2013; 109: 1004-1012.

Barault L, Charon-Barra C, Jooste V, de la Vega MF, Martin L, Roignot P, et al. Hypermethylator phenotype in sporadic colon cancer: study on a population-based series of 582 cases. *Cancer Res* 2008; 68: 8541-8546.

Baylin SB, Esteller M, Rountree MR, Bachman KE, Schuebel K, Herman JG. Abberant patterns of DNA methylation, chromatin formation and gene expression in cancer. *Hum Mol Genet* 2001; 10: 687-692.

- Beddy D, Hyland JM, Winter DC, Lim C, White A, Moriarty M, et al. A simplified tumor regression grade correlates with survival in locally advanced rectal carcinoma treated with neoadjuvant chemoradiotherapy. *Ann Surg Oncol* 2008; 15: 3471-3477.
- Bedford MT, van Helden PD. Hypomethylation of DNA in pathological conditions of the human prostate. *Cancer Res* 1987; 47:5274-5276.
- Belinsky SA, Liechty KC, Gentry FD, Wolf HJ, Rogers J, Vu K, et al. Promoter hypermethylation of multiple genes in sputum precedes lung cancer incidence in a high-risk cohort. *Cancer Res* 2006; 66:3338-3344.
- Bengala C, Bettelli S, Bertolini F, Sartori G, Fontana A, Malavasi N, et al. Prognostic role of EGFR gene copy number and KRAS mutation in patients with locally advanced rectal cancer treated with preoperative chemoradiotherapy. *Br J Cancer* 2010; 103: 1019-1024.
- Bennecke M, Kriegl L, Bajbouj M, Retzlaff K, Robine S, Jung A et al. Ink4a/Arf and oncogene-induced senescence prevent tumor progression during alternative colorectal tumorigenesis. *Cancer Cell* 2010; 18: 135-146.
- Berkovich E, Lamed Y, Ginsberg D. E2F and Ras synergize in transcriptionally activating p14arf expression. *Cell Cycle* 2003; 2: 127-133.
- Bird AP. DNA methylation and the frequency of CpG in animal DNA. *Nucleic Acids Res* 1980; 8:1499-1504.
- Bird AP, Wolffe AP. Methylation induced repression-belts, braces, and chromatin. *Cell* 1999; 99: 451-454.
- Bird AP. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev* 2002; 16: 6-21.
- Bokemeyer C, Bondarenko I, Hartmann JT, de Braud F, Schuch G, Zubel A, et al. Efficacy according to biomarker status of cetuximab plus FOLFOX-4 as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: the OPUS study. *Ann Oncol* 2011; 22: 1535-1546.
- Boland CR, Thibodeau SN, Hamilton SR, Sidransky D, Eshleman JR, Burt RW, et al. A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: Development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res* 1998; 58: 5248-5257.
- Bonadona V, Bonaïti B, Olschwang S, Grandjouan S, Huiart L, Longy M et al. Cancer risks associated with germline mutations in MLH1, MSH2, and MSH6 genes in Lynch syndrome. *JAMA* 2011; 305: 2304-2310.
- Bos JL. Ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res* 1989; 49: 4682-4689.
- Bos JL, Rehmann H, Wittinghofer A. GEFs and GAPs: critical elements in the control of small G proteins. *Cell* 2007; 129: 865-877.
- Bosset JF, Collette L, Calais G, Mineur L, Maingon P, Radošević-Jelić Lj, et al. Chemotherapy with preoperative radiotherapy in rectal cancer. *N Engl J Med* 2006; 355: 1114-1123.
- Boutin AT, Liao WT, Wang M, Hwang SS, Karpinets TV, Cheung H, et al. Oncogenic Kras drives invasion and maintains metastases in colorectal cancer. *Genes Dev* 2017; 31: 370-382.

- Boyle P. Some recent developments in the epidemiology of colorectal cancer. In: Bleiberg H, Rougier PH, Wilke HJ, eds. Management of colorectal cancer. London: Martin Dunitz Ltd; 1998: 19-54.
- Boyum A. Separation of leucocytes from blood and bone marrow. *Scan J Clin Lab Invest* 1968; 21: 77, suppl. 97.
- Braicu C, Buse M, Busuioc C, Drula R, Gulei D, Raduly L, et al. A comprehensive review on MAPK: a promising therapeutic target in cancer. *Cancers (Basel)*. 2019; 11: 1618.
- Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 2018; 68: 394-424.
- Breen EC. VEGF in biological control. *J Cell Biochem* 2007; 102: 1358-67.
- Bringold F, Serrano M. Tumor suppressors and oncogenes in cellular senescence. *Exp Gerontol* 2000; 35: 317-329.
- Brown K, Buchmann A, Balmain A. Carcinogen-induced mutations in the mouse c-Ha-ras gene provide evidence of multiple pathways for tumor progression. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 538-542.
- Brown KGM, Solomon MJ. Progress and future direction in the management of advanced colorectal cancer. *Br J Surg* 2018; 105: 615-617.
- Brücher B, Geddert H, Langner C, Höfler H, Fink U, Siewert JR, Sarbia M. Hypermethylation of hMLH1, HPP1, p14ARF, p16INK4A and APC in primary adenocarcinomas of the small bowel. *In J Cancer* 2006; 119: 1298-1302.
- Buchholz TA, Davis DW, McConkey DJ, Symman FW, Valero V, Jhingran A, et al. Chemotherapy-induced apoptosis and Bcl-2 levels correlate with breast cancer response to chemotherapy. *Cancer J* 2003; 9: 33-41.
- Burri N, Shaw P, Bouzourene H, Sordat I, Sordat B, Gillet M, et al. Methylation silencing and mutations of the p14ARF and p16INK4 genes in colon cancer. *Lab Invest* 2001; 81: 217-229.
- Cadieux B, Ching TT, Vanden Berg SR, Costello JF. Genome-wide hypomethylation in human glioblastomas associated with specific copy number alteration, methylenetetrahydrofolate reductase allele status, and increased proliferation. *Cancer Res* 2006; 66: 8469-8476.
- Calbo J, Marotta M, Cascallo M, Roig JM, Gelpi JL, Fueyo J, et al. Adenovirus-mediated wt-p16 reintroduction induces cell cycle arrest or apoptosis in pancreatic cancer. *Cancer Gene Ther* 2001; 8: 740-750.
- Calva D, Howe JR. Hamartomatous polyposis syndromes. *Surg Clin North Am* 2008; 88: 779-817.
- Capella G, Cronauer-Mitra S, Pienado MA, Perucho M. Frequency and spectrum of mutations at codons 12 and 13 of the c-K-ras gene in human tumors. *Environ Health Perspect* 1991; 93: 125-131.
- Carethers JM. One colon lumen but two organs. *Gastroenterology* 2011; 141: 411-412.

- Cashen AF, Schiller GJ, O'Donnell MR, DiPersio JF. Multicenter, phase II study of decitabine for the first-line treatment of older patients with acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol* 2010; 28: 556-561.
- Cedar H, Bergman Y. Linking DNA methylation and histone modification: Patterns and paradigms. *Nat Rev Genet* 2009; 10: 295-304.
- Chaar I, Amara S, Elamine OE, Khiari M, Ounissi D, Khalfallah T, et al. Biological significance of promoter hypermethylation of p14/ARF gene: relationships to p53 mutational status in Tunisian population with colorectal carcinoma. *Tumour Biol* 2014; 35: 1439-1449.
- Chakravarti A, Winter K, Wu CL, Kaufman D, Hammond E, Parliament M, et al. Expression of the epidermal growth factor receptor and Her-2 are predictors of favorable outcome and reduced complete response rates, respectively, in patients with muscle-invasive bladder cancers treated by concurrent radiation and cisplatin-based chemotherapy: a report from the radiation therapy oncology group. *Int J Radiation Oncology Biol Phys* 2005; 62: 309-317.
- Chan AO, Broaddus RR, Houlihan PS, Issa JP, Hamilton SR, Rashid A. CpG island methylation in aberrant crypt foci of the colorectum. *Am J Pathol* 2002; 160: 1823-1830.
- Chen JH, Ozanne SE, Hales CN. Heterogeneity in premature senescence by oxidative stress correlates with differential DNA damage during the cell cycle. *DNA Repair (Amst)* 2005; 4: 1140-1148.
- Chin L, Pomerantz J, DePinho RA. The INK4a/ARF tumor suppressor: one gene-two products-two pathways. *Trends Biochem Sci* 1998; 23: 291-296.
- Chintala SK, Fueyo J, Gomez-Manzano C, Venkaiah B, Bjerkvig R, Yung WK, et al. Adenovirus-mediated p16/CDKN2 gene transfer suppresses glioma invasion in vitro. *Oncogene* 1997; 15: 2049-2057.
- Ciardiello F, Troiani T, Bianco R, Orditura M, Morgillo F, Martinelli E, et al. Interaction between the epidermal growth factor receptor (EGFR) and the vascular endothelial growth factor (VEGF) pathways: a rational approach for multi-target anticancer therapy. *Ann Oncol* 2006; 17: 109-114.
- Cisyk AL, Penner-Goeke S, Lichtensztejn Z, Nugent Z, Wightman RH, Singh H, K J McManus KJ. Characterizing the prevalence of chromosome instability in interval colorectal cancer. *Neoplasia* 2015; 17: 306-316.
- Collado M, Gil J, Efeyan A, Guerra C, Schuhmacher AJ, Barradas M, et al. Tumour biology: senescence in premalignant tumours. *Nature* 2005; 436: 642.
- Collado M, Blasco MA, Serrano M. Cellular senescence in cancer and aging. *Cell* 2007; 130: 223-233.
- Colussi D, Brandi G, Bazzoli F, Ricciardiello L. Molecular pathways involved in colorectal cancer: implications for disease behavior and prevention. *Int J Mol Sci* 2013; 14: 16365-16385.
- Condon LT, Ashman JN, Ell SR, Stafford ND, Greenman J, Cawkwell L. Overexpression of Bcl-2 in squamous cell carcinoma of the larynx: a marker of radioresistance. *Int J Cancer* 2002; 100: 472-475.

- Coulondre C, Miller JH, Farabaugh PJ, Gilbert W. Molecular basis of base substitution hotspots in *Escherichia coli*. *Nature* 1978; 274: 775-780.
- Cox AD, Fesik SW, Kimmelman AC, Luo J, Der CJ. Drugging the undruggable RAS: mission possible? *Nat Rev Drug Discov* 2014; 13: 828-851.
- Cui H, Onyango P, Brandenburg S, Wu Y, Hsieh CL, Feinberg AP. Loss of imprinting in colorectal cancer linked to hypomethylation of H19 and IGF2. *Cancer Res* 2002; 62: 6442-6446.
- Cunningham JM, Christensen ER, Tester DJ, Kim CY, Roche PC, Burgart LJ, et al. Hypermethylation of the hMLH1 promoter in colon cancer with microsatellite instability. *Cancer Res* 1998; 58: 3455-3460.
- Czabotar PE, Lessene G, Strasser A, Adams JM. Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2014; 15: 49-63.
- Dahlin AM, Palinqvist R, Henriksson ML, Jacobsson M, Eklöf V, Rutegård J, et al. The role of CpG island methylator phenotype in colorectal cancer prognosis depends on microsatellite instability screening status. *Clin Cancer Res* 2010; 16: 1845-1855.
- Davis D, Lahiri SS. Application of oncolytic viruses for cure of colorectal cancer. *Cancer Res J* 2015; 3:76-93.
- Davies JM, Trembath D, Deal AM, Funkhouser WK, Calvo BF, Finnegan T, et al. Phospho-ERK and AKT status, but not KRAS mutation status, are associated with outcomes in rectal cancer treated with chemoradiotherapy. *Radiat Oncol* 2011; 6: 114.
- De Campos-Lobato LF, Stocchi L, da Luz Moreira A, Kalady MF, Geisler D, Dietz D, et al. Downstaging without complete pathologic response after neoadjuvant treatment improves cancer outcomes for cIII but not cII rectal cancers. *Ann Surg Oncol* 2010; 17: 1758-1766.
- de Maat MF, van de Velde CJ, Benard A, Putter H, Morreau H, van Krieken JH, et al. Identification of a quantitative MINT locus methylation profile predicting local regional recurrence of rectal cancer. *Clin Cancer Res* 2010; 16: 2811-2818.
- De Rosa M, Pace U, Rega D, Costabile V, Duraturo F, Izzo P. Genetics, diagnosis and management of colorectal cancer (Review). *Oncol Rep* 2015; 34: 1087-96.
- De Stanchina E, McCurrach ME, Zindy F, Shieh SY, Ferbeyre G, Samuelson AV, et al. E1a signaling to p53 involves the p19(Arf) tumor suppressor. *Genes Dev* 1998; 12: 2434-2442.
- Derbel O, Wang Q, Desseigne F, Rivoire M, Meeus P, Peyrat P, et al. Impact of KRAS, BRAF and PI3KCA mutations in rectal carcinomas treated with neoadjuvant radiochemotherapy and surgery. *BMC Cancer* 2013; 13: 200.
- Dienstmann R, Vermeulen L, Guinney J, Kopetz S, Tejpar S, Tabernero J. Consensus molecular subtypes and the evolution of precision medicine in colorectal cancer. *Nat Rev Cancer* 2017; 17: 79-92.
- Doll R, Peto R. The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risk of cancer in the United States today. *Natl Canc Inst* 1981; 66: 1191-1308.
- Dominguez G, Silva J, Garcia JM, Silva JM, Rodriguez R, Munoz C, et al. Prevalence of aberrant methylation of p14ARF over p16INK4a in some human primary tumors. *Mut Res* 2003; 530:9-17.

- Drebin JA, Niederhuber JE. Cancer of the lower gastrointestinal tract. *Epidemiology and etiology*. In: Niederhuber JE, ed. *Current therapy in oncology*. St Louis: Mosby-Year Book Inc; 1993: 426-427.
- Duldulao MP, Lee W, Nelson RA, Li W, Chen Z, Kim J, et al. Mutations in specific codons of the KRAS oncogene are associated with variable resistance to neoadjuvant chemoradiation therapy in patients with rectal adenocarcinoma. *Ann Surg Oncol* 2013; 20: 2166-2171.
- East JE, Atkin WS, Bateman AC, Clark SK, Dolwani S, Ket SN, et al. British Society of Gastroenterology position statement on serrated polyps in the colon and rectum. *Gut* 2017; 66: 1181-1196.
- Ehrlich M. DNA methylation in cancer: too much, but also too little. *Oncogene* 2002; 21: 5400-5413.
- Elsaleh H, Joseph D, Grieu F, Zeps N, Spry N, Iacopetta B. Association of tumour site and sex with survival benefit from adjuvant chemotherapy in colorectal cancer. *Lancet* 2000; 355: 1745-1750.
- Esteller M, Tortola S, Toyota M, Capella G, Peinado MA, Baylin SB, et al. Hypermethylation-associated inactivation of p14(ARF) is independent of p16(INK4a) methylation and p53 mutational status. *Cancer Res* 2000; 60: 129-133.
- Esteller M, Corn PG, Baylin SB, Herman JG. A Gene Hypermethylation Profile of Human Cancer. *Cancer Res* 2001; 61: 3225-3229.
- Esteller M, Herman JG. Cancer as an epigenetic disease: DNA methylation and chromatin alterations in human tumors. *J Pathol* 2002; 196: 1-7.
- Esteller M. Epigenetics in cancer. *N Engl J Med* 2008; 358:1148-1159.
- Exner R, Pulverer W, Diem M, Spaller L, Woltering L, Schreiber M, et al. Potential of DNA methylation in rectal cancer as diagnostic and prognostic biomarkers. *Brit J Cancer*. 2015; 113: 1035-1045.
- Eymin B, Leduc C, Coll JL, Brambilla E, Gazzeri S. P14arf induces G2 arrest and apoptosis independently of p53 leading to regression of tumours established in nude mice. *Oncogene* 2003; 22: 1822-1835.
- Fahraeus R, Lane DP. The p16(INK4a) tumour suppressor protein inhibits alphavbeta3 integrin-mediated cell spreading on vitronectin by blocking PKC-dependent localization of alphavbeta3 to focal contacts. *EMBO J* 1999; 18: 2106-2118.
- Falls JG, Pulford DJ, Wylie AA, Jirtle RL. Genomic imprinting: implications for human disease. *Am J Pathol* 1999; 154: 635-647.
- Fan F, Wey JS, McCarty MF, Belcheva A, Liu W, Baueret TW, et al. Expression and function of vascular endothelial growth factor receptor-1 on human colorectal cancer cells. *Oncogene* 2005; 24: 2647-2653.
- Fazeli MS, Keramati MR. Rectal cancer: a review. *Med J Islam Repub Iran* 2015; 29: 171.
- Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990; 61: 759-767.

- Feinberg AP, Vogelstein B. Hypomethylation of ras oncogenes in primary human cancers. *Biochem Biophys Res Commun* 1983; 111:47-54.
- Feinberg AP. Cancer epigenetics takes center stage. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 392-394.
- Feinberg AP, Tycko B. The history of cancer epigenetics. *Nat Rev Cancer* 2004; 4:143-153.
- Figueras A, Arbos MA, Quiles MT, Viñals F, Germà JR, Capellà G. The impact of KRAS mutations on VEGF-A production and tumour vascular network. *BMC Cancer* 2013; 13: 125.
- Filion GJ, Zhenilo S, Salozhin S, Yamada D, Prokhortchouk E, Defossez PA. A family of human zinc finger proteins that bind methylated DNA and repress transcription. *Mol Cell Biol* 2006; 26: 169-181.
- Gaedcke J, Grade M, Jung K, Schirmer M, Jo P, Obermeyer C, et al. KRAS and BRAF mutations in patients with rectal cancer treated with preoperative chemoradiotherapy. *Radiother Oncol* 2010; 94: 76-81.
- Gaedcke J, Leha A, Claus R, Weichenhan D, Jung K, Kitz J, et al. Identification of a DNA methylation signature to predict disease-free survival in locally advanced rectal cancer. *Oncotarget* 2014; 5: 8123-8135.
- Garassino MC, Marabese M, Rusconi P, Rulli E, Martelli O, Farina G, et al. Different types of K-Ras mutations could affect drug sensitivity and tumour behaviour in non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol* 2011; 22: 235-237.
- Garcia-Aguilar J, Chen Z, Smith DD, Li W, Madoff RD, Cataldo P, et al. Identification of a biomarker profile associated with resistance to neoadjuvant chemoradiation therapy in rectal cancer. *Ann Surg* 2011; 254: 486-492.
- García-Flórez LJ, Gómez-Álvarez G, Frunza AM, Barneo-Serra L, Martínez-Alonso C, Fresno-Forcelledo MF. Predictive markers of response to neoadjuvant therapy in rectal cancer. *J Surg Res* 2015; 194(1): 120-126.
- Gardiner-Garden M, Frommer M. CpG islands in vertebrate genomes. *J Mol Biol* 1987; 196: 261-282.
- Giatromanolaki A, Sivridis E, Koukourakis MI. Angiogenesis in colorectal cancer: prognostic and therapeutic implications. *Am J Clin Oncol* 2006; 29: 408-417.
- Gideon P, John J, Frech M, Lautwein A, Clark R, Scheffler JE, et al. Mutational and kinetic analyses of the GTPase-activating protein (GAP)-p21 interaction: the C-terminal domain of GAP is not sufficient for full activity. *Mol Cell Biol* 1992; 12: 2050-2056.
- Giralt J, de las Heras M, Cerezo L, Eraso A, Hermosilla E, Velez D, et al. The expression of epidermal growth factor receptor results in a worse prognosis for patients with rectal cancer treated with preoperative radiotherapy: A multicenter, retrospective analysis. *Radiother Oncol* 2005; 74: 101-108.
- Giralt J, Navalpotro B, Hermosilla E, de Torres I, Espin E, Reyes V, et al. Prognostic significance of vascular endothelial growth factor and cyclooxygenase-2 in patients with rectal cancer treated with preoperative radiotherapy. *Oncology* 2007; 71: 312-319.

- Glasel JA. Validity of Nucleic Acid Purities Monitored by A260/A280 Absorbance Ratios. *Biotechniques* 1995; 18: 62-63.
- Glimelius B. Neo-adjuvant radiotherapy in rectal cancer. *World J Gastroenterol* 2013; 19: 8489-8501.
- Glockner SC, Dhir M, Yi JM, McGarvey KE, Van Neste L, Louwagie J, et al. Methylation of TFPI2 in stool DNA: a potential novel biomarker for the detection of colorectal cancer. *Cancer Res* 2009; 69: 4691-4699.
- Goel A, Arnold CN, Niedzwiecki D, Chang DK, Ricciardiello L, Carethers JM, et al. Characterization of sporadic colon cancer by patterns of genomic instability. *Cancer Res* 2003; 63: 1608-1614.
- Goelz SE, Vogelstein B, Hamilton SR, Feinberg AP. Hypomethylation of DNA from benign and malignant human colon neoplasms. *Science* 1985; 228: 187-190.
- Gore SD, Baylin S, Sugar E, Carraway H, Miller CB, Carducci M, et al. Combined DNA methyltransferase and histone deacetylase inhibition in the treatment of myeloid neoplasms. *Cancer Res* 2006; 66: 6361-6369.
- Goto T, Mizukami H, Shirahata A, Sakata M, Saito M, Ishibashi K, et al. Aberrant methylation of the p16 gene is frequently detected in advanced colorectal cancer. *Anticancer Res* 2009; 29: 275-277.
- Grady WM, Carethers JM. Genomic and epigenetic instability in colorectal cancer pathogenesis. *Gastroenterology* 2008; 135: 1079-1099.
- Grizzle W, Shibata D, Manne U, Myers R, Frost A. Molecular and histopathologic changes in the development of colorectal neoplasia. In: Srivastava S, Henson DE, Gazdar A, eds. *Molecular Pathology of Early Cancer*. Amsterdam: IOS press; 1999: 135-217.
- Grizzle WE, Manne U, Weiss HL, Jhala N, Talley L. Molecular staging of colorectal cancer in African-American and Caucasian patients using phenotypic expression of p53, Bcl-2, MUC-1 AND p27(kip-1). *Int J Cancer* 2002; 97: 403-409.
- Guinney J, Dienstmann R, Wang X, de Reynies A, Schlicker A, Sonesson C, et al. The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. *Nat Med* 2015; 21: 1350-1356.
- Guyot F, Faivre J, Manfredi S, Meny B, Bonithon-Kopp C, Bouvier AM. Time trends in the treatment and survival of recurrences from colorectal cancer. *Annals of oncology: official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 2005; 16: 756-761.
- Haga Y, Hiroshima K, Iyoda A, Shibuya K, Fumihiko Shimamura F, Iizasa T, et al. Ki-67 expression and prognosis for smokers with resected stage I non-small cell lung cancer. *Ann Thorac Surg* 2003; 75: 1727-1732.
- Hamilton J, Sato F, Greenwald B, Suntharalingam M, Krasna M, Edelman M, et al. Promoter methylation and response to chemotherapy and radiation in esophageal cancer. *Clin Gastroenterol H.* 2006; 4: 701-708.

- Harada H, Nakagawa K, Iwata S, Saito M, Kumon Y, Sakaki S et al. Restoration of wild-type p16 down-regulates vascular endothelial growth factor expression and inhibits angiogenesis in human gliomas. *Cancer Res* 1999; 59: 3783-3789.
- Hata AN, Yeo A, Faber AC, Lifshits E, Chen Z, Cheng KA, et al. Failure to induce apoptosis via BCL-2 family proteins underlies lack of efficacy of combined MEK and PI3K inhibitors for KRAS-mutant lung cancers. *Cancer Res* 2014; 74: 3146-3156.
- Hawkins N, Norrie M, Cheong K, Mokany E, Ku SL, Meagher A, et al. CpG island methylation in sporadic colorectal cancers and its relationship to microsatellite instability. *Gastroenterology* 2002; 122: 1376-1387.
- Hegi ME, Liu L, Herman JG, Stupp R, Wick W, Weller M, et al. Correlation of O6-methylguanine methyltransferase (MGMT) promoter methylation with clinical outcomes in glioblastoma and clinical strategies to modulate MGMT activity. *J Clin Oncol* 2008; 26: 4189-4199.
- Hellebrekers DM, Lentjes MH, van den Bosch SM, Melotte V, Wouters KAD, Daenen KLJ, et al. GATA4 and GATA5 are potential tumor suppressors and biomarkers in colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2009; 15: 3990-3997.
- Hemming AW, Davis NL, Klufftinger A, Robinson B, Quenville NF, Liseman B, et al. Prognostic markers of colorectal cancer: An evaluation of DNA content, epidermal growth factor receptor, and Ki-67. *J Surg Oncol* 1992; 51: 147-152.
- Herman JG, Graff JR, Myohanen S, Nelkin BD, Baylin SB. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 9821-9826.
- Herman JG, Baylin SB. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N Engl J Med* 2003; 349: 2042-2054.
- Hibi K, Nakayama H, Koike M, Kasai Y, Ito K, Akiyama S, et al. Colorectal cancers with both p16 and p14 methylation show invasive characteristics. *Jpn J Cancer Res* 2002; 93: 883-887.
- Hibi K, Nakao A. Lymph node metastasis is infrequent in patients with highly-methylated colorectal cancer. *Anticancer Res* 2006; 26: 55-58.
- Hiort O, Wodtke A, Struve D, Zollner A, Sinnecker GH. Detection of point mutations in the androgen receptor gene using non-isotopic single strand conformation polymorphism analysis. *Hum Mol Genet* 1994; 3: 1163-1166.
- Huang Q, Li S, Cheng P, Deng M, He X, Wang Z, et al. High expression of anti-apoptotic protein Bcl-2 is a good prognostic factor in colorectal cancer: Result of a meta-analysis. *World J Gastroenterol* 2017; 23: 5018-5033.
- Huerta S, Hrom J, Gao X, Saha D, Anthony T, Reinhart H, Kapur P. Tissue microarray constructs to predict a response to chemoradiation in rectal cancer. *Dig Liver Dis* 2010; 42: 679-684.
- Iino H, Simms L, Young J, Arnold J, Winship I, Webb S, et al. DNA microsatellite instability and mismatch repair protein loss in adenomas presenting in hereditary non-polyposis colorectal cancer. *Gut* 2000; 47: 37-42.
- Illingworth RS, Bird AP. CpG islands-'a rough guide'. *FEBS Letters* 2009; 583: 1713-1720.

- Imai K, Yamamoto H. Carcinogenesis and microsatellite instability: The interrelationship between genetics and epigenetics. *Carcinogenesis* 2008; 29: 673-80.
- Imai K, Yamamoto H. Carcinogenesis and microsatellite instability in colorectal cancer patients from Brazil. *Mol Biol Rep* 2010; 6: 301-310.
- Inamura K. Colorectal cancers: an update on their molecular pathology. *Cancers* 2018; 10: 26.
- Issa JP. CpG island methylator phenotype in cancer. *Nat Rev Cancer* 2004; 4: 988-993.
- Issa JP, Kantarjian HM. Targeting DNA methylation. *Clin Cancer Res* 2009; 15: 3938-3946.
- Izumi D, Toden S, Ureta E, Ishimoto T, Baba H, Goel A, et al. TIAM1 promotes chemoresistance and tumor invasiveness in colorectal cancer. *Cell Death Dis* 2019; 10: 267.
- Jakob C, Liersch T, Meyer W, Becker H, Baretton GB, Austet DE, et al. Predictive value of Ki67 and p53 in locally advanced rectal cancer: correlation with thymidylate synthase and histopathological tumor regression after neoadjuvant 5-FU-based chemoradiotherapy. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 1060-1066.
- Jascur T, Boland CR. Structure and function of the components of the human DNA mismatch repair system. *Int J Cancer* 2005; 119: 2030-2035.
- Jia M, Jansen L, Walter V, Tagscherer K, Roth W, Herpel E. No association of CpG island methylator phenotype and colorectal cancer survival: Population-based study. *Br J Cancer* 2016; 115: 1359-1366.
- Jiang W, Wang PG, Zhan Y, Zhang D. Prognostic value of p16 promoter hypermethylation in colorectal cancer: a meta-analysis. *Cancer Invest* 2014; 32: 43-52.
- Jo P, Jung K, Grade M, Conradi L-C, Wolff H, Kitz J, et al. CpG island methylator phenotype infers a poor disease-free survival in locally advanced rectal cancer. *Surgery* 2012; 151: 564-570.
- Jones PL, Veenstra GJ, Wade PA, Vermaak D, Kass SU, Landsberger N, et al. Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. *Nat Genet* 1998; 19: 187-191.
- Kacem S, Feil R. Chromatin mechanisms in genomic imprinting. *Mamm Genome* 2009; 20: 544-556.
- Kafri T, Ariel M, Mrandeis M, Shemer R, Urven L, McCarrey J, et al. Developmental patterns of gene-specific DNA methylation in the mouse embryo and germ line. *Genes Dev* 1992; 6: 705-714.
- Kaminskas E, Farrell A, Abraham S, Baird A, Hsieh L-S, Leeet S-L, et al. Approval summary: azacitidine for treatment of myelodysplastic syndrome subtypes. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 3604-3608.
- Kaneda A, Yagi K. Two groups of DNA methylation markers to classify colorectal cancer into three epigenotypes. *Cancer Sci* 2011; 102: 18-24.
- Kang MY, Lee BB, Ji YI, Jung EH, Chun HK, Song SY, et al. Association of interindividual differences in p14ARF promoter methylation with single nucleotide polymorphism in primary colorectal cancer. *Cancer* 2008; 112: 1699-1707.

- Kang SM, Maeda K, Onoda N, Chung YS, Nakata B, Nishiguchi Y, Sowa M. Combined analysis of p53 and vascular endothelial growth factor expression in colorectal carcinoma for determination of tumor vascularity and liver metastasis. *Int J Cancer* 1997; 74: 502-507.
- Kapiteijn E, Liefers GJ, Los LC, Kranenbarg EK, Hermans J, Tollenaar RA, et al. Mechanisms of oncogenesis in colon versus rectal cancer. *J Pathol* 2001; 195:171-178.
- Karagkounis G, Kalady MF. Molecular biology: are we getting any closer to providing clinically useful information? *Clin Colon Rectal Surg* 2017; 30: 415-422.
- Karapetis CS, Khambata-Ford S, Jonker DJ, O'Callaghan CJ, Tu D, Tebbutt NC, et al. K-ras mutations and benefit from cetuximab in advanced colorectal cancer. *N Engl J Med* 2008; 359: 1757-1765.
- Kariya S, Ogawa Y, Yoshida S, Yabuki M, Imajo Y, Utsumi K. X-irradiation enhances the expression of Bcl-2 in HL-60 cells: the resulting effects on apoptosis and radiosensitivity. *Int J Mol Med* 1999; 3: 145-152.
- Kataoka M, Wiehle S, Spitz F, Schumacher G, Roth JA, Cristiano RJ. Down-regulation of bcl-2 is associated with p16INK4-mediated apoptosis in non-small cell lung cancer cells. *Oncogene* 2000; 19: 1589-1595.
- Katsuda K, Kataoka M, Uno F, Murakami T, Kondo T, Roth JA, et al. Activation of caspase-3 and cleavage of Rb are associated with p16-mediated apoptosis in human non-small cell lung cancer cells. *Oncogene* 2002; 21: 2108-2113.
- Kawagishi H, Nakamura H, Maruyama M, Mizutani S, Sugimoto K, Takagi M. ARF suppresses tumor angiogenesis through translational control of VEGFA mRNA. *Cancer Res* 2010; 70: 4749-4758.
- Kekelidze M, D'Errico L, Pansini M, Tyndall A, Hohmann J. Colorectal cancer: current imaging methods and future perspectives for the diagnosis, staging and therapeutic response evaluation. *World J Gastroenterol* 2013; 19: 8502-8514.
- Kerber RA, Neklason DW, Samowitz WS, Burt RW. Frequency of familial colon cancer and hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) in a large population database. *Fam Cancer* 2005; 4: 239-44.
- Kim JC, Choi JS, Roh SA, Cho DH, Kim TW, Kim YS. Promoter methylation of specific genes is associated with the phenotype and progression of colorectal adenocarcinomas. *Ann Surg Oncol* 2010; 17: 1767-1776.
- Kim JS, Kim JM, Li S, Yoon WH, Song KS, Kim KH, et al. Epidermal growth factor receptor as a predictor of tumor downstaging in locally advanced rectal cancer patients treated with preoperative chemoradiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2006; 66: 195-200.
- Kim Y, Giuliano A, Hatch KD, Schneider A, Nour MA, Dallal GE, et al. Global DNA hypomethylation increases progressively in cervical dysplasia and carcinoma. *Cancer* 1994; 74: 893-899.
- Kino K, Sugiyama H. Possible cause of G•C→C•G transversion mutation by guanine oxidation product, imidazolone. *Chem Biol* 2001; 8: 369-378.

- Kirkin V, Joos S, Zörnig M. The role of Bcl-2 family members in tumorigenesis. *Biochim Biophys Acta* 2004; 1644: 229-249.
- Klose RJ, Bird AP. Genomic DNA methylation: The mark and its mediators. *Trends Biochem Sci* 2006; 31: 89-97.
- Knudsen ES, Wang JY. Targeting the RB-pathway in cancer therapy. *Clin Cancer Res* 2010; 16:1094-1099.
- Kobayashi T, Wang J, Al-Ahmadie H, Abate-Shen C. ARF regulates the stability of p16 protein via RING-dependent proteasome degradation. *Mol Cancer Res* 2013; 11: 828-833.
- Kohonen-Corish MR, Tseung J, Chan C, Currey N, Dent OF, Clarke S, et al. KRAS mutations and CDKN2A promoter methylation show an interactive adverse effect on survival and predict recurrence of rectal cancer. *Int J Cancer* 2014; 134: 2820-2828.
- Kokelaar RF, Evans MD, Davies M, Harris DA, Beynon J. Locally advanced rectal cancer: management challenges. *Onco Targets Ther* 2016; 9: 6265-6272.
- Kokelaar R, Jones H, Beynon J, Evans M, Harris D. Meta-analysis of the prognostic value of CpG island methylator phenotype in rectal cancer. *Int J Colorectal Dis* 2018; 33: 995-1000.
- Konstantinidou G, Ramadori G, Torti F, Kangasniemi K, Ramirez RE, Cai Y, et al. RHOA-FAK is a required signaling axis for the maintenance of KRAS-driven lung adenocarcinomas. *Cancer Discovery* 2013; 3: 444-457.
- Kornmann M, Staib L, Wiegel T, Kron M, Henne-Bruns D, Link KH, et al. Long-term results of 2 adjuvant trials reveal differences in chemosensitivity and the pattern of metastases between colon cancer and rectal cancer. *Clin Colorectal Cancer* 2013; 12: 54-61.
- Kotsinas A, Papanagnou P, Evangelou K, Trigas GC, Kostourou V, Townsend P, Gorgoulis VG. ARF: A versatile DNA damage response ally at the crossroads of development and tumorigenesis. *Front Genet* 2014; 5: 236.
- Krishnamurthy J, Torrice C, Ramsey MR, Kovalev GI, Al-Regaiey K, Su L, et al. Ink4a/Arf expression is a biomarker of aging. *J Clin Invest* 2004; 114: 1299-1307.
- Krtolica K, Krajnović M, Ušaj-Knežević S, Babić D, Jovanović D, Dimitrijević B. Comethylation of p16 and MGMT genes in colorectal carcinoma: correlation with clinicopathological features and prognostic value. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 1187-1194.
- Kurkjian C, Kummar S, Murgu AJ. DNA methylation: Its role in cancer development and therapy. *Curr Probl Cancer* 2008; 32: 187-235.
- Laird PW. The power and the promise of DNA methylation markers. *Nat Rev Cancer* 2003; 3: 253-266.
- Lane DP. Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature* 1992; 358: 15-16.
- Lee JU, Hosotani R, Wada M, Doi R, Kosiba T, Fujimoto K, et al. Role of Bcl-2 family proteins (Bax, Bcl-2 and Bcl-X) on cellular susceptibility to radiation in pancreatic cancer cells. *Eur J Cancer* 1999; 5: 1374-1380.

- Lee M, Sup Han W, Kyoung Kim O, Hee Sung S, Sun Cho M, Lee SN, et al. Prognostic value of p16INK4a and p14ARF gene hypermethylation in human colon cancer. *Pathol Res Pract* 2006; 202: 415-424.
- Lemmon MA, Schlessinger J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 2010; 141: 1117-1134.
- Li H, Zhang J, Tong JHM, Chan AWH, Yu J, Kang W, To KF. Targeting the Oncogenic p53 Mutants in Colorectal Cancer and Other Solid Tumors. *Int J Mol Sci* 2019; 20: 5999.
- Li FY, Lai MD. Colorectal cancer, one entity or three. *J Zhejiang Univ Sci B* 2009; 10: 219-229.
- Li L, Lu Y. Inhibition of hypoxia-induced cell motility by p16 in MDA-MB-231 breast cancer cells. *J Cancer* 2010; 1: 126-135.
- Li S, Kim JS, Kim JM, Cho MJ, Yoon WH, Song KS, et al. Epidermal growth factor receptor as a prognostic factor in locally advanced rectal-cancer patients treated with preoperative chemoradiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2006; 65: 705-712.
- Lin CH, Hsieh SY, Sheen IS, Lee WC, Chen TC, Shyu WC, et al. Genome-wide hypomethylation in hepatocellular carcinogenesis. *Cancer Res* 2001; 61: 4238-4243.
- Lin LC, Lee HH, Hwang WS, Li CF, Huang CT, Que J, et al. p53 and p27 as predictors of clinical outcome for rectal-cancer patients receiving neoadjuvant therapy. *Surg Oncol* 2006; 15: 211-216.
- Lind GE, Thorstensen L, Lovig T, Meling GI, Hamelin R, Rognum TO, et al. A CpG island hypermethylation profile of primary colorectal carcinomas and colon cancer cell lines. *Mol Cancer* 2004; 3: 28.
- Liu P, Wang Y, Li X. Targeting the untargetable KRAS in cancer therapy. *Acta Pharm Sinica B* 2019; 9: 871-879.
- Lossos IS, Morgensztern D. Prognostic biomarkers in diffuse large B-cell lymphoma. *J Clin Oncol* 2006; 24: 995-1007.
- Lu Y, Zhang X, Zhang J. Inhibition of breast tumor cell growth by ectopic expression of p16/INK4A via combined effects of cell cycle arrest, senescence and apoptotic induction, and angiogenesis inhibition. *J Cancer* 2012; 3: 333-344.
- Luna-Pérez P, Segura J, Alvarado I, Labastida S, Santiago-Payán H, Quintero A. Specific c-K-ras gene mutations as a tumor-response marker in locally advanced rectal cancer treated with preoperative chemoradiotherapy. *Ann Surg Oncol* 2000; 7: 727-731.
- Martin ST, Heneghan HM, Winter DC. Systematic review and meta-analysis of outcomes following pathological complete response to neoadjuvant chemoradiotherapy for rectal cancer. *Br J Surg* 2012; 99: 918-928.
- Mayer A, Takimoto M, Fritz E, Schellander G, Kofler K, Ludwig H. The prognostic significance of proliferating cell nuclear antigen, epidermal growth factor receptor, and mdr gene expression in colorectal cancer. *Cancer* 1993; 71: 2454-2460.
- McGrath JP, Capon DJ, Smith DH, Chen EY, Seeburg PH, Goeddel DV, et al. Structure and organization of the human Ki-ras proto-oncogene and a related processed pseudogene. *Nature* 1983; 304: 501-506.

- Middleton G, Cunningham D. Current option in the management of gastrointestinal cancer. *Ann Oncol* 1995; 6(Supl. 1): S17-S26.
- Milgrom SA, García-Aguilar J. Molecular biomarkers as predictors of response to neoadjuvant chemoradiation therapy in rectal cancer. *Semin Colon Rectal Surg* 2013; 119-124.
- Miller MS, Miller LD. RAS mutations and oncogenesis: not all RAS mutations are created equally. *Front Genet* 2011; 2:100.
- Miyashita T, Reed JC. Bcl-2 oncoprotein blocks chemotherapy-induced apoptosis in a human leukemia cell line. *Blood* 1993; 81: 151-157.
- Modesitt SC, Ramirez P, Zu Z, Bodurka-Bevers D, Gershenson D, Wolf JK. In vitro and in vivo adenovirus-mediated p53 and p16 tumor suppressor therapy in ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 2001; 7: 1765-1772.
- Molinari C, Casadio V, Foca F, Zingaretti C, Giannini M, Avanzolini A, et al. Gene methylation in rectal cancer: Predictive marker of response to chemoradiotherapy? *J Cell Physiol* 2013; 228: 2343-2349.
- Moral M, Fdez-Aceñero MJ, Cuberes R, Suárez A. Factors influencing prognosis after neo-adjuvant chemoradiation therapy for rectal carcinoma. *Acta Chir Belg* 2009; 109: 345-51.
- Morán A, Ortega P, de Juan C, Fernández-Marcelo T, Frías C, Sánchez-Pernaute A, et al. Differential colorectal carcinogenesis: Molecular basis and clinical relevance. *World J Gastrointest Oncol* 2010; 2:151-158.
- Mulero-Navarro S, Esteller M. Epigenetic biomarkers for human cancer: the time is now. *Crit Rev Oncol Hematol* 2008; 68: 1-11.
- Mulyawan I. Role of Ki67 protein in colorectal cancer. *Int J Res Medical Sci* 2018; 7: 647-651.
- Muto T, Bussey HJ, Morson BC. The evolution of cancer of the colon and rectum. *Cancer* 1975; 36(6): 2251-2270.
- National Cancer Comprehensive Network. Colorectal cancer. (Online) Version 3; 2015. Dostupno na URL: <http://www.NCCN.org>
- Nikolić I. Prediktivni faktori tumorskog odgovora na preoperativnu NR hemioterapiju i radioterapiju kod bolesnika sa karcinomom rektuma u stajumu B2 i C. Doktorska disertacija, Medicinski fakultet Univerziteta u Novom Sadu, 2011.
- Ng JM, Yu J. Promoter hypermethylation of tumour suppressor genes as potential biomarkers in colorectal cancer. *Int J Mol Sci* 2015; 16(2): 2472-2496.
- O'Brien MJ, Winawer SJ, Zauber AG, Gottlieb LS, Sternberg SS, Diaz B, et al. The national polyps study. *Gastroenterology* 1990; 98: 371-379.
- Okamoto K, Zaanán A, Kawakami H, Huang S, Sinicrope F. Reversal of mutant KRAS-mediated apoptosis resistance by concurrent Noxa/Bik induction and Bcl-2/Bcl-xL Antagonism in Colon Cancer Cells. *Mol Cancer Res* 2015; 13: 659-669.
- Okano M, Xie S, Li E. Cloning and characterization of a family of novel mammalian DNA (cytosine-5) methyltransferases. *Nat Genet* 1998; 19: 219-220.

- Ozenne P, Eymin B, Brambilla E, Gazzeri S. The ARF tumor suppressor: Structure, functions and status in cancer. *Int J Cancer* 2010; 127: 2239-2247.
- Palmero I, Pantoja C, Serrano M. P19arf links the tumour suppressor p53 to Ras. *Nature* 1998; 395: 125-126.
- Palmisano WA, Divine KK, Saccomanno G, Gilliland FD, Baylin SB, Herman JG, Belinsky SA, et al. Predicting lung cancer by detecting aberrant promoter methylation in sputum. *Cancer Res* 2000; 60: 5954-5958.
- Parisi T, Pollice A, Di Cristofano A, Calabro V, La Mantia G. Transcriptional regulation of the human tumor suppressor p14ARF by e2f1, e2f2, e2f3, and sp1-like factors. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 291: 1138-1145.
- Passegue E, Wagner EF. JunB suppresses cell proliferation by transcriptional activation of p16(INK4a) expression. *EMBO J* 2000; 19: 2969-2979.
- Pei XH, Xiong Y. Biochemical and cellular mechanisms of mammalian CDK inhibitors: a few unresolved issues. *Oncogene* 2005; 24: 2787-2795.
- Peltomari P. Deficient DNA mismatch repair: A common etiologic factor for colon cancer. *Hum Mol Genet* 2001; 10: 735-740.
- Peurala E, Koivunen P, Haapasaari K-M, Bloigu R, Jukkola-Vuorinen A. The prognostic significance and value of cyclin D1, CDK4 and p16 in human breast cancer. *Breast Cancer Res* 2013;15: R5.
- Pomerantz J, Schreiber-Agus N, Liégeois NJ, Silverman A, Alland L, Chin L, et al. The Ink4a tumor suppressor gene product, p19Arf, interacts with MDM2 and neutralizes MDM2's inhibition of p53. *Cell* 1998; 92: 713-723.
- Popescu NC, Amsbaugh SC, Di Paolo JA. Chromosomal localization of three human ras genes by in situ molecular hybridization. *Somatic Cell Mol Genet* 1985; 11: 149-155.
- Poulsen ML, Bisgaard ML. MUTYH Associated Polyposis (MAP). *Curr Genomics* 2008; 9: 420-435.
- Prior IA, Lewis PD, Mattos C. A comprehensive survey of Ras mutations in cancer. *Cancer Res* 2012; 72: 2457-2467.
- Pylayeva-Gupta Y, Grabocka E, Bar-Sagi D. Ras oncogenes: weaving a tumorigenic web. *Nat Rev Cancer* 2011; 11: 761-774.
- Quelle DE, Zindy F, Ashmun RA, Sherr CJ. Alternative reading frames of the INK4a tumor suppressor gene encode two unrelated proteins capable of inducing cell cycle arrest. *Cell* 1995; 83: 993-1000.
- Quesnel B, Fenaux P. P15INK4b gene methylation and myelodysplastic syndromes. *Leuk Lymphoma* 1999; 35: 437-443.
- Rak J, Mitsushashi Y, Bayko L, Filmus J, Shirasawa S, Sasazuki T, et al., Mutant ras oncogenes upregulate VEGF/VPF expression: implications for induction and inhibition of tumor angiogenesis. *Cancer Res* 1995; 55: 4575-4580.

- Rantanen S, Monni O, Joensuu H, Franssila K, Knuutila S. Causes and consequences of bcl2 overexpression in diffuse large B-cell lymphoma. *Leuk Lymphoma* 2001; 42: 1089-1098.
- Rawla P, Sunkara T, Barsouk A. Epidemiology of colorectal cancer: incidence, mortality, survival, and risk factors. *Gastroenterology Rev* 2019; 14: 89-103.
- Ricciardiello L, Ahnen DJ, Lynch PM. Chemoprevention of hereditary colon cancers: time for new strategies. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2016; 13: 352-361.
- Richter I, Dvořák J, Urbanec M, Bluml A, Čermáková E, Bartoš J, Petera P. The prognostic significance of tumor epidermal growth factor receptor (EGFR) expression change after neoadjuvant chemoradiation in patients with rectal adenocarcinoma. *Contemp Oncol (Pozn)* 2015; 19: 48-53.
- Rigs AD, Pfeifer GP. X-chromosome inactivation and cell memory. *Trends Genet* 1992; 8: 169-173.
- Roberts PJ, Der CJ. Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer. *Oncogene* 2007; 26: 3291-3310.
- Rocco J, Sidransky D. p16(MTS-1/CDKN2/INK4a) in cancer progression. *Exp Cell Res* 2001; 264: 42-55.
- Rodel C, Martus P, Papadoupoulos T, Fuzesi L, Klimpfinger M, Fietkau R, et al. Prognostic significance of tumor regression after preoperative chemoradiotherapy for rectal cancer. *J Clin Oncol* 2005; 23: 8688-8696.
- Romagosa C, Simonetti S, López-Vicente L, Mazo A, Leonart M, Castellvi J, et al. p16Ink4a overexpression in cancer: a tumor suppressor gene associated with senescence and high-grade tumors. *Oncogene* 2011; 30: 2087-2097.
- Ruas M, Gregory F, Jones R, Poolman R, Starborg M, Rowe J, et al. CDK4 and CDK6 delay senescence by kinase-dependent and p16INK4a-independent mechanisms. *Mol Cell Biol* 2007; 27: 4273-4282.
- Sadanandam A, Lyssiotis CA, Homicsko K, Collisson EA, Gibb WJ, Wullschleger S, et al. A colorectal cancer classification system that associates cellular phenotype and responses to therapy. *Nat Med* 2013; 19: 619-625.
- Samowitz WS, Albertsen H, Herrick J, Levin TR, Sweeney C, Murtaugh MA, et al. Evaluation of a large, population-based sample supports a CpG island methylator phenotype in colon cancer. *Gastroenterology* 2005; 129: 837-845.
- Sasai N, Defossez PA. Many paths to one goal? The proteins that recognize methylated DNA in eukaryotes. *Int J Dev Biol* 2009; 53: 323-334.
- Sauer R, Becker H, Hohenberger W, Rödel C, Wittekind C, Fietkau R, et al. Preoperative versus postoperative chemoradiotherapy for rectal cancer. *N Engl J Med* 2004; 351: 1731-1740.
- Scheffzek K, Ahmadian MR, Kabsch W, Wiesmuller L, Lautwein A, Schmitz F, et al. The Ras-RasGAP complex: structural basis for GTPase activation and its loss in oncogenic Ras mutants. *Science* 1997; 277: 333-338.

Schlessinger J. Receptor tyrosine kinases: legacy of the first two decades. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2014; 6: a008912.

Schmoll HJ, Van Cutsem E, Stein A, Valentini V, Glimelius B, Haustermans K, et al. ESMO Consensus Guidelines for management of patients with colon and rectal cancer. A personalized approach to clinical decision making. *Ann Oncol* 2012; 23: 2479-2516.

Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: From the known and the unknown. *J Cell Physiol* 2000; 182: 311-322.

Schubbert S, Shannon K, Bollag G. Hyperactive Ras in developmental disorders and cancer. *Nat Rev Cancer* 2007; 7: 295-308.

Schubert KE, Chen W, Cope L, Glöckner SC, Suzuki H, Yi JM, et al. Comparing the DNA methylome with gene mutations in human colorectal cancer. *PLoS Genet* 2007; 3: 1709-1723.

Serra R, Fang M, Park S, Hutchinson L, Green M. A KRAS-directed transcriptional silencing pathway that mediates the CpG island methylator phenotype. *Elife* 2014; 3: e02313.

Serrano M. The tumor suppressor protein p16INK4a. *Exp Cell Res* 1997; 237: 7-13.

Sharma S, Kelly TK, Jones PA. Epigenetics in cancer. *Carcinogenesis* 2010; 31: 27-36.

Sharpless NE. INK4a/ARF: A multifunctional tumor suppressor locus. *Mutat Res* 2005; 576: 22-38.

Shen L, Kondo Y, Hamilton SR, Rashid A, Issa JP. P14 methylation in human colon cancer is associated with microsatellite instability and wild-type p53. *Gastroenterology* 2003; 124: 626-633.

Shen L, Catalano PJ, Benson AB, O'Dwyer P, Hamilton SR, Issa JP. Association between DNA methylation and shortened survival in patients with advanced colorectal cancer treated with 5-fluorouracil based chemotherapy. *Clin Cancer Res* 2007^a; 13: 6093-6098.

Shen L, Toyota M, Kondo Y, Lin E, Zhang L, Guo Y, et al. Integrated genetic and epigenetic analysis identifies three different subclasses of colon cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007^b; 104: 18654-18659.

Sherr CJ, Roberts JM. CDK inhibitors: Positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev* 1999; 13: 1501-1512.

Sherr CJ. Divorcing arf and p53: An unsettled case. *Nat Rev Cancer* 2006; 6: 663-667.

Sideris M, Moorhead J, Diaz-Cano S, Bjarnason I, Haji A, Papagrigroriadis S. Kras mutant status, p16 and beta-catenin expression may predict local recurrence in patients who underwent transanal endoscopic microsurgery (tems) for stage i rectal cancer. *Anticancer Res* 2016; 36: 5315-5324.

Sideris M, Moorhead J, Diaz-Cano S, Haji A, Papagrigroriadis S. KRAS mutant status may be associated with distant recurrence in early-stage rectal cancer. *Anticancer Res* 2017; 37: 1349-1357.

Siegel R, Desantis C, Jemal A. Colorectal cancer statistics. *Cancer J Clin* 2014; 64: 104- 117.

Singh H, Longo DL, Chabner BA. Improving prospects for targeting RAS. *J Clin Oncol* 2015; 33: 3650-3659.

Soufir N, Daya-Grosjean L, de La Salmonière P, Moles JP, Dubertret L, Sarasin A, Basset-Seguin N. Association between INK4a-ARF and p53 mutations in skin carcinomas of xeroderma pigmentosum patients. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92: 1841-1847.

Spano JP, Fagard R, Soria JC, Rixe O, Khayat D, Milano G. Epidermal growth factor receptor signaling in colorectal cancer: preclinical data and therapeutic perspectives. *Ann Oncol* 2005; 16: 189-194.

Spolverato G, Pucciarelli S, Bertorelle R, De Rossi A, Nitti D. Predictive factors of the response of rectal cancer to neoadjuvant radiochemotherapy. *Cancers (Basel)* 2011; 3: 2176-2194.

Stanojević B, Džodic R, Saenko V, Milovanović Z, Pupić G, O. Živković, et al. Mutational and clinico-pathological analysis of papillary thyroid carcinoma in Serbia, *Endocr J* 2011; 58: 381-393.

Steelman LS, Pohnert SC, Shelton JG, Franklin RA, Bertrand FE, McCubrey JA. JAK/STAT, Raf/MEK/ERK, PI3K/Akt and BCR-ABL in cell cycle progression and leukemogenesis. *Leukemia* 2004; 18: 189-218.

Stewart SL, Wike JM, Kato I, Lewis DR, Michaud F. A population-based study of colorectal cancer histology in the United States, 1998-2001. *Cancer* 2006; 107: 1128-1041.

Stimson L, Wood V, Khan O, Fotheringham S, La Thangue NB. HDAC inhibitor-based therapies and haematological malignancy. *Ann Oncol* 2009; 20: 1293-1302.

Stipa F, Chessin DB, Shia J, Paty PB, Weiser M, Temple LK, et al. A pathologic complete response of rectal cancer to preoperative combined-modality therapy results in improved oncological outcome compared with those who achieve no downstaging on the basis of preoperative endorectal ultrasonography. *Ann Surg Oncol* 2006; 13: 1047-1053.

Stott FJ, Bates S, James MC, McConnell BB, Starborg M, Brookes S, et al. The alternative product from the human CDKN2a locus, p14(Arf), participates in a regulatory feedback loop with p53 and mdm2. *EMBO J* 1998; 17: 5001-5014.

Stryker SJ, Wolf BG, Culp CE, Libbe SD, Ilstrup DM, MacCarty RL. Natural history of untreated colonic polyps. *Gastroenterology* 1987; 93: 1009-1013.

Takai D, Jones PA. Comprehensive analysis of CpG islands in human chromosomes 21 and 22. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 3740-3745.

Takeuchi H, Ozawa S, Shih C-H, Ando N, Kitagawa Y, Ueda M, Kitajima M. Loss of p16INK4a expression is associated with vascular endothelial growth factor expression in squamous cell carcinoma of the esophagus. *Int J Cancer J Int Du Cancer* 2004; 109: 483-490.

Terry PD, Miller AB, Rohan TE. Prospective cohort study of cigarette smoking and colorectal cancer risk in women. *Int J Cancer* 2002; 99: 480-483.

Thanikachalam K, Khan G. Colorectal cancer and nutrition. *Nutrients*. 2019; 11: 164.

Theodoropoulos GE, Lazaris AC, Theodoropoulos VE, Papatheodosiou K, Gazouli M, Bramis J, et al. Hypoxia, angiogenesis and apoptosis markers in locally advanced rectal cancer. *Int J Colorectal Dis* 2006; 21: 248-257.

Toiyama Y, Inoue Y, Saigusa S, Okugawa Y, Yokoe T, Tanaka K, et al. Gene expression profiles of epidermal growth factor receptor, vascular endothelial growth factor and hypoxia-inducible factor-1

with special reference to local responsiveness to neoadjuvant chemoradiotherapy and disease recurrence after rectal cancer surgery. *Clin Oncol* 2010; 22: 272-280.

Topova L, Hellmich G, Puffer E, Schubert C, Christen N, Boldt T, et al. Prognostic value of tumor response to neoadjuvant therapy in rectal carcinoma. *Dis Colon Rectum* 2011; 54: 401-411.

Tost J. DNA Methylation: an introduction to the biology and the disease-associated changes of a promising biomarker. *Mol Biotechnol* 2010; 44: 71-81.

Toyota M, Ahuja N, Ohe-Toyota M, Herman J, Baylin S, Issa JP. CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 8681-8686.

Toyota M, Suzuki H, Yamashita T, Hirata K, Imai K, Tokino T, Shinomura Y. Cancer epigenomics: Implications of DNA methylation in personalized cancer therapy. *Cancer Sci* 2009; 100: 787-791.

Toyota M, Suzuki H. Epigenetic drivers of genetic alterations. *Adv Genet* 2010; 70: 309-323.

Trzeciak L, Hennig E, Kolodziejcki J, Nowacki M, Ostrowski J. Mutations, methylation and expression of CDKN2a/p16 gene in colorectal cancer and normal colonic mucosa. *Cancer Lett* 2001; 163: 17-23.

Tsai H-C, Baylin S. Cancer epigenetics: linking basic biology to clinical medicine. *Cell Res* 2011; 21: 502-517.

Uhrbom L, Dai C, Celestino JC, Rosenblum MK, Fuller GN, Holland EC. Ink4a-Arf loss cooperates with KRas activation in astrocytes and neural progenitors to generate glioblastomas of various morphologies depending on activated Akt *Cancer Res* 2002; 62: 5551-5558.

Urošević N, Krtolica K, Škaro-Milić A, Knežević-Ušaj S, Đujić A. Prevalence of G-to-T transversions among K-ras oncogene mutations in human colorectal tumors in Yugoslavia. *Int J Cancer* 1993; 54: 249-254.

Ushijima T. Detection and interpretation of altered methylation patterns in cancer cells. *Nat Rev Cancer* 2005; 5: 223-231.

Van Cutsem E, Lang I, Folprecht G, Nowacki M, Cascinu S, Shchepotin I, et al. Cetuximab plus FOLFIRI in the treatment of metastatic colorectal cancer (mCRC): the influence of KRAS and BRAF biomarkers on outcome: updated data from the CRYSTAL trial. *American Society of Clinical Oncology 2010 Gastrointestinal Cancers Symposium (GCS)*. 2010; Abstract No. 281.

van der Sijp MP, Bastiaannet E, Mesker WE, van der Geest LG, Breugom AJ, Steup WH, Differences between colon and rectal cancer in complications, short-term survival and recurrences. *Int J Colorectal Dis* 2016; 10: 1683-1691.

Van Krieken JHJM, Jung A, Kirchner T, Seruca R, Bosman FT, Quirke P, et al. KRAS mutation testing for predicting response to anti-EGFR therapy for colorectal carcinoma: proposal for an European quality assurance program. *Virchows Arch* 2008; 453: 417-431.

Vecchio FM, Valentini V, Minsky BD, Padula GD, Venkatraman ES, Balducci M, et al. The relationship of pathologic tumor regression grade (TRG) and outcomes after preoperative therapy in rectal cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2005; 62: 752-760.

- Veganzones-de-Castro S, Rafael-Fernández S, Vidaurreta-Lázaro M, Orden V, Mediero-Valeros B, Fernández C, Maestro-de las Casas ML. p16 gene methylation in colorectal cancer patients with long-term follow-up. *Revista Española De Enfermedades Dig* 2012; 104: 111-117.
- Velho S, Moutinho C, Cirnes L, Albuquerque C, Hamelin R, Schmitt F, et al. BRAF, KRAS and PIK3CA mutations in colorectal serrated polyps and cancer: primary or secondary genetic events in colorectal carcinogenesis?-*BMC Cancer* 2008; 8:255.
- Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, et al. Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Eng J Med* 1988; 319: 525-532.
- Vousden KH, Bos JL, Marshall CJ, Phillips DH. Mutations activating human c-Ha-ras1 protooncogene (HRAS1) induced by chemical carcinogens and depurination. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83: 1222-1226.
- Wade PA, Gogonne A, Jones PL, Ballestar E, Aubry F, Wolffe AP. Mi-2 complex couples DNA methylation to chromatin remodelling and histone deacetylation. *Nat Genet* 1999; 23: 62-66.
- Wang JY, Wang YH, Jao SW, Lu CY, Kuo CH, Hu HM et al. Molecular mechanisms underlying the tumorigenesis of colorectal adenomas: correlation to activated K-ras oncogene. *Oncol Rep* 2006; 16: 1245-1252.
- Ward RL, Cheong K, Ku SL, Meagher A, O'Connor T, Hawkins NJ. Adverse prognostic effect of methylation in colorectal cancer is reversed by microsatellite instability. *J Clin Oncol* 2003; 21: 3729-3736.
- Wasylishen AR, Lozano G. Attenuating the p53 pathway in human cancers: many means to the same end. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2016; 6: a026211.
- Weber JD, Jeffers JR, Rehg JE, Randle DH, Lozano G, Roussel MF, et al. P53-independent functions of the p19ARF tumor suppressor. *Genes Dev* 2000; 14: 2358-2365.
- Wei EK, Giovannucci E, Wu K, Rosner B, Fuchs CS, Willett WC, et al. Comparison of risk factors for colon and rectal cancer. *Int J Cancer* 2004; 108: 433-442.
- Wheeler JM, Warren BF, Mortensen NJ, Ekanyaka N, Kulacoglu H, Jones AC, et al. Quantification of histologic regression of rectal cancer after irradiation: a proposal for a modified staging system. *Dis Colon Rectum* 2002; 45: 1051-1056.
- Williamson JS, Harris DA, Beynon J, Jenkins GJ. Review of the development of DNA methylation as a marker of response to neoadjuvant therapy and outcomes in rectal cancer. *Clin Epigenetics* 2015; 7: 70.
- Winder T, Lenz HJ. Molecular predictive and prognostic markers in colon cancer. *Cancer Treat Rev* 2010; 36: 550-556.
- Wong MP, Cheung N, Yuen ST, Leung SY, Chung LP. Vascular endothelial growth factor is up-regulated in the early pre-malignant stage of colorectal tumour progression. *Int J Cancer* 1999; 81: 845-850.
- Woo T, Okudela K, Yazawa T, Wada N, Ogawa N, Ishiwa N, et al. Prognostic value of KRAS mutations and Ki-67 expression in stage I lung adenocarcinomas. *Lung Cancer* 2009; 65: 355-362.

- Xing X, Cai W, Shi H, Wang Y, Li M, Jiao J, et al. The prognostic value of CDKN2A hypermethylation in colorectal cancer: a meta-analysis. *Br J Cancer* 2013; 108: 2542-2548.
- Yamauchi M, Morikawa T, Kuchiba A, Imamura Y, Qian ZR, Nishihara R, et al. Assessment of colorectal cancer molecular features along bowel subsites challenges the conception of distinct dichotomy of proximal versus distal colorectum. *Gut* 2012; 61: 847-854.
- Yang J, Liu X, Bhalla K, Kim CN, Ibrado AM, Cai J, et al. Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science* 1997; 275: 1129-1132.
- Yarden Y, Pines G. The ERBB network: at last, cancer therapy meets systems biology. *Nat Rev Cancer* 2012; 12: 553-563.
- Yashiro M, Carethers JM, Laghi L, Saito K, Slezak P, Jaramillo E, et al. Genetic pathways in the evolution of morphologically distinct colorectal neoplasms. *Cancer Res* 2001; 61: 2676-2683.
- Yoo CB, Jones PA. Epigenetic therapy of cancer: past, present and future. *Nat Rev Drug Discov* 2006; 5: 37-50.
- Yu J, Lee SH, Jeung TS, Chang H. Expression of vascular endothelial growth factor as a predictor of complete response for preoperative chemoradiotherapy in rectal cancer. *Medicine (Baltimore)* 2019; 98: e16190.
- Zaanan A, Okamoto K, Kawakami H, Khazaie K, Huang S, Sinicrope F. The mutant KRAS gene up-regulates BCL-XL protein via STAT3 to confer apoptosis resistance that is reversed by BIM protein induction and BCL-XL antagonism. *J Biol Chem*. 2015; 290: 23838-23849.
- Zakhari S. Alcohol metabolism and epigenetics changes. *Alcohol Res* 2013; 35: 6-16.
- Zamzami N, Brenner C, Marzo I, Susin SA, Kroemer G. Subcellular and submitochondrial mode of action of Bcl-2-like oncoproteins. *Oncogene* 1998; 16: 2265-2282.
- Zeestraten EC, Kuppen PJ, van de Velde CJ, Marijnen CA. Prediction in rectal cancer. *Semin Radiat Oncol* 2012; 22: 175-183.
- Zhang B, Wang J, Wang X, Zhu J, Liu Q, Shi Z, et al. Proteogenomic characterization of human colon and rectal cancer. *Nature* 2014; 513: 382-387.
- Zhang X, Gaspard JP, Chung DC. Regulation of vascular endothelial growth factor by the Wnt and K-ras pathways in colonic neoplasia. *Cancer Res* 2001; 61: 6050-6054.
- Zheng S, Chen P, McMillan A, Lafuente A, Lafuente MJ, Ballesta A, et al. Correlations of partial and extensive methylation at the p14(ARF) locus with reduced mRNA expression in colorectal cancer cell lines and clinicopathological features in primary tumors. *Carcinogenesis* 2000; 21: 2057-2064.
- Zindy F, Eischen CM, Randle DH, Kamijo T, Cleveland JL, Sherr CJ, Roussel MF. Myc signaling via the ARF tumor suppressor regulates p53-dependent apoptosis and immortalization. *Genes Dev* 1998; 12: 2424-2433.
- Zlobec I, Steele R, Compton CC. VEGF as a predictive marker of rectal tumor response to preoperative radiotherapy. *Cancer* 2005; 104: 2517-2521.

Zlobec I, Vuong T, Compton CC, Lugli A, Michel R P, Hayashi S, Jass JR. Combined analysis of VEGF and EGFR predicts complete tumour response in rectal cancer treated with preoperative radiotherapy. *Br J Cancer* 2008; 98: 450-456.

8. PRILOZI

Prilog 1.

Tabela 1. Povezanost istovremeno izmenjene metilacije gena *p16INK4a* i *p14ARF* sa kliničko-patološkim i imunohistohemijskim parametrima

Kliničko-patološki i imunohistohemijski parametri	Metilacioni status gena <i>p16INK4a</i> i <i>p14ARF</i>		P
	<i>p16m/p14m, p16m/p14n, p16n/p14m</i>	<i>p16n/p14n</i>	
Starost (god. median)	65,568±8,697	62,381±8,207	0,177
Pol			
Muškarci	24/37 (64,9%)	13/37 (35,1%)	0,882
Žene	13/21 (61,9%)	8/21 (38,1%)	
Lokalizacija tumora			
Donji (≤ 7 cm)	10/13 (76,9%)	3/13 (23,1%)	0,372
Gornji (> 7 cm)	10/14 (71,4%)	4/14 (28,6%)	
Srednji (<7>)	17/30 (56,7%)	13/30 (43,3%)	
TNM stadijum			
TNM II	13/21 (61,9%)	8/21 (38,1%)	0,953
TNM III	24/37 (64,9%)	13/37 (35,1%)	
Ekspresija EGFR			
Niska (< 25%)	23/40 (57,5%)	17/40 (42,5%)	0,359
Visoka (≥ 25%)	12/16 (75%)	4/16 (25%)	
Ekspresija VEGF			
Niska (< 10%)	20/29 (69%)	9/29 (31%)	0,448
Visoka (≥ 10%)	15/27 (55,6%)	12/27 (44,4%)	
Ekspresija Bcl-2			
Niska (< 10%)	26/39 (66,7%)	13/39 (33,3%)	0,499
Visoka (≥ 10%)	9/17 (52,9%)	8/17 (47,1%)	
Ekspresija Ki-67			
Niska (< 10%)	8/15 (53,3%)	7/15 (46,7%)	0,585
Visoka (≥ 10%)	27/41 (65,9%)	14/41 (34,1%)	
Odgovor na HRT			
Povoljan (KO/PO)	20/29 (69%)	9/29 (31%)	0,585
Nepovoljan (SS/PB)	17/29 (58,6%)	12/29 (41,4%)	
Lokalni recidivi/metastaze			
Da	16/24 (66,7%)	8/24 (33,3%)	0,965
Ne	21/33 (63,6%)	12/33 (36,4%)	
Smrtni ishod			
Da	9/13 (69,2%)	4/13 (30,8%)	1,000
Ne	28/44 (63,6%)	16/44 (36,4%)	
Mutacioni status gena <i>KRAS</i>			
mutiran	12/21 (57,1%)	9/21 (42,9%)	0,610
wt	25/37 (67,6%)	12/37 (32,4%)	

HRT-hemioradioterapija; KO-kompletan odgovor; PO-parcijalni odgovor; SS-stacionarno stanje; PB-progresija bolesti; m-metilovani; n-nemetilovani; p-verovatnoća statističke značajnosti je ispitivana Studentovim t-testom, Fišerovim egzaktnim testom i Pirsonovim χ^2 -testom.

Tabela 2. Povezanost istovremeno izmenjene metilacije gena *p16INK4a* i *p14ARF* sa kliničko-patološkim i imunohistohemijskim parametrima

Kliničko-patološki i imunohistohemijski parametri	Metilacioni status gena <i>p16INK4a</i> i <i>p14ARF</i>		p
	<i>p16m/p14m</i>	<i>p16n/p14n</i>	
Starost (god. median)	64,636±8,936	64,362±8,606	0,479
Pol			
Muškarci	8/21 (38,1%)	13/21 (61,9%)	0,703
Žene	3/11 (27,3%)	8/11 (72,7%)	
Lokalizacija tumora			
Donji (≤ 7 cm)	2/5 (40%)	3/5 (60%)	0,845
Gornji (> 7 cm)	3/7 (42,9%)	4/7 (57,1%)	
Srednji (<7>)	6/19 (31,6%)	13/19 (68,4%)	
TNM stadijum			
TNM II	5/13 (38,5%)	8/13 (61,5%)	0,721
TNM III	6/19 (31,6%)	13/19 (68,4%)	
Ekspresija EGFR			
Niska (< 25%)	7/24 (29,2%)	17/24 (70,8%)	0,397
Visoka (≥ 25%)	4/8 (50%)	4/8 (50%)	
Ekspresija VEGF			
Niska (< 10%)	6/15 (40%)	9/15 (60%)	0,798
Visoka (≥ 10%)	5/17 (29,4%)	12/17 (70,6%)	
Ekspresija Bcl-2			
Niska (< 10%)	8/21 (38,1%)	13/21 (61,9%)	0,703
Visoka (≥ 10%)	3/11 (27,3%)	8/11 (72,7%)	
Ekspresija Ki-67			
Niska (< 10%)	1/8 (12,5%)	7/8 (87,5%)	0,209
Visoka (≥ 10%)	10/24 (41,7%)	14/24 (58,3%)	
Odgovor na HRT			
Povoljan (KO/PO)	5/14 (35,7%)	9/14 (64,3%)	1,000
Nepovoljan (SS/PB)	6/18 (33,3%)	12/18 (66,7%)	
Lokalni recidivi/metastaze			
Da	5/13 (38,5%)	8/13 (61,5%)	1,000
Ne	6/18 (33,3%)	12/18 (66,7%)	
Smrtni ishod			
Da	9/25 (36%)	16/25 (64%)	1,000
Ne	2/6 (33,3%)	4/6 (61,5%)	
Mutacioni status gena <i>KRAS</i>			
mutiran	4/13 (30,8%)	9/13 (69,2%)	1,000
wt	7/19 (36,8%)	12/19 (63,2%)	

HRT-hemioradioterapija; KO-kompletan odgovor; PO-parcijalni odgovor; SS-stacionarno stanje; PB- progresija bolesti; m-metilovani; n-nemetilovani; p-verovatnoća statističke značajnosti je ispitivana Studentovim t-testom, Fišerovim egzaktnim testom i Pirsonovim χ^2 -testom.

Prilog 2.

Tabela 1. Istovremeno izmenjen metilacioni status gena *p16INK4a* i različit nivo ekspresije proteinskih markera u asocijaciji sa odgovorom na HRT

Metilacioni status gena <i>p16INK4a</i> /Ekspresija imunohistohemijskih parametara	Odgovor na HRT		P
	Povoljan (KO/PO)	Nepovoljan (SS/PB)	
<i>p16m</i> /EGFRv ostale tri grupe	7/10 (70%) 23/48 (47,9%)	3/10 (30%) 25/48 (52,1%)	0,301
<i>p16m</i> /VEGFv ostale tri grupe	1/10 (10%) 29/48 (60,4%)	9/10 (90%) 19/48 (39,6%)	0,005
<i>p16m</i> /Bcl-2v ostale tri grupe	2/6 (33,3%) 28/52 (53,8%)	4/6 (66,7%) 24/52 (46,2%)	0,415
<i>p16m</i> /Ki-67v ostale tri grupe	19/36 (52,8%) 11/22 (50%)	17/36 (47,2%) 11/22 (50%)	0,948

HRT-hemioradioterapija; KO-kompletan odgovor; PO-parcijalni odgovor; SS-stacionarno stanje; PB-progresija bolesti; m-metilovan; v-visok nivo ekspresije; p-verovatnoća statističke značajnosti je ispitivana Fišerovim egzaktnim testom i Pirsonovim χ^2 -testom.

Tabela 2. Istovremeno izmenjen metilacioni status gena *p16INK4a* i različit nivo ekspresije proteinskih markera u asocijaciji sa pojavom lokalnih recidiva i/ili metastaza

Metilacioni status gena <i>p16INK4a</i> /Ekspresija imunohistohemijskih parametara	Lokalni recidivi i/ili metastaze		P
	Prisutne	Odsutne	
<i>p16m</i> /EGFRv ostale tri grupe	1/10 (10%) 25/47 (53,2%)	9/10 (90%) 22/47 (46,8%)	0,038
<i>p16m</i> /VEGFv ostale tri grupe	7/10 (70%) 16/47 (34%)	3/10 (30%) 31/47 (66%)	0,072
<i>p16m</i> /Bcl-2v ostale tri grupe	4/7 (57,1%) 18/50 (36%)	3/7 (42,9%) 32/50 (64%)	0,106
<i>p16m</i> /Ki-67v ostale tri grupe	9/23 (39,1%) 14/34 (41,2%)	14/23 (60,9%) 20/34 (58,2%)	0,904

m-metilovan; v-visok nivo ekspresije; p-verovatnoća statističke značajnosti je ispitivana Fišerovim egzaktnim testom i Pirsonovim χ^2 -testom.

Tabela 3. Istovremeno izmenjen metilacioni status gena *p16INK4a* i različit nivo ekspresije proteinskih markera u asocijaciji sa krajnjim ishodom bolesti

Metilacioni status gena <i>p16INK4a</i> /Ekspresija imunohistohemijskih parametara	Smrtni ishod		p
	Da	Ne	
<i>p16m</i> /EGFRv ostale tri grupe	1/10 (10%) 11/47 (23,4%)	9/10 (90%) 36/47 (76,6%)	0,671
<i>p16m</i> /VEGFv ostale tri grupe	5/10 (50%) 7/47 (14,9%)	5/10 (50%) 40/47 (85,1%)	0,026
<i>p16m</i> /Bcl-2v ostale tri grupe	3/6 (50%) 9/51 (17,6%)	3/6 (50%) 42/51 (82,4%)	0,101
<i>p16m</i> /Ki-67v ostale tri grupe	5/22 (22,7%) 7/35 (20%)	17/22 (77,3%) 28/35 (80%)	1,000

m-metilovan; v-visok nivo ekspresije; p-verovatnoća statističke značajnosti je ispitivana Fišerovim egzaktnim testom i Pirsonovim χ^2 -testom.

Prilog 3.

Tabela 1. Istovremeno izmenjen metilacioni status gena *p14ARF* i različit nivo ekspresije proteinskih markera u asocijaciji sa odgovorom na HRT

Metilacioni status gena <i>p14ARF</i> /Ekspresija imunohistohemijskih parametara	Odgovor na HRT		p
	Povoljan (KO/PO)	Nepovoljan (SS/PB)	
<i>p14m</i> /EGFRv ostale tri grupe	4/7 (57,1%) 25/49 (51%)	3/7 (42,9%) 24/49 (49%)	1,000
<i>p14m</i> /VEGFv ostale tri grupe	2/10 (20%) 27/46 (58,7%)	8/10 (80%) 19/46 (41,3%)	0,038
<i>p14m</i> /Bcl-2v ostale tri grupe	3/6 (50%) 26/50 (52%)	3/6 (50%) 24/50 (48%)	1,000
<i>p14m</i> /Ki-67v ostale tri grupe	6/16 (37,5%) 23/40 (57,5%)	10/16 (62,5%) 17/40 (42,5%)	0,290

HRT-hemioradioterapija; KO-kompletan odgovor; PO-parcijalni odgovor; SS-stacionarno stanje; PB-progresija bolesti; m-metilovan; v-visok nivo ekspresije; p-verovatnoća statističke značajnosti je ispitivana Fišerovim egzaktnim testom i Pirsonovim χ^2 -testom.

Tabela 2. Istovremeno izmenjen metilacioni status gena *p14ARF* i različit nivo ekspresije proteinskih markera u asocijaciji sa pojavom lokalnih recidiva i/ili metastaza

Metilacioni status gena <i>p14ARF</i> /Ekspresija imunohistohemijskih parametara	Lokalni recidivi i/ili metastaze		p
	Prisutne	Odsutne	
<i>p14m</i> /EGFRv ostale tri grupe	3/7 (42,9%) 20/48 (41,7%)	4/7 (57,1%) 28/48 (58,3%)	1.000
<i>p14m</i> /VEGFv ostale tri grupe	7/10 (70%) 16/45 (35,6%)	3/10 (30%) 29/45 (64,4%)	0,075
<i>p14m</i> /Bcl-2v ostale tri grupe	4/6 (66,7%) 19/49 (38,8%)	2/6 (33,3%) 30/49 (61,2%)	0,223
<i>p14m</i> /Ki-67v ostale tri grupe	9/16 (56,2%) 14/39 (35,9%)	7/16 (43,8%) 25/39 (64,1%)	0,276

m-metilovan; v-visok nivo ekspresije; p-verovatnoća statističke značajnosti je ispitivana Fišerovim egzaktnim testom i Pirsonovim χ^2 -testom.

Tabela 3. Istovremeno izmenjen metilacioni status gena *p14ARF* i različit nivo ekspresije proteinskih markera u asocijaciji sa krajnjim ishodom bolesti

Metilacioni status gena <i>p14ARF</i> /Ekspresija imunohistohemijskih parametara	Smrtni ishod		p
	Da	Ne	
<i>p14m</i> /EGFR _v ostale tri grupe	2/7 (28,6%) 10/48 (20,8%)	5/7 (71,4%) 38/48 (79,2%)	0,639
<i>p14m</i> /VEGF _v ostale tri grupe	3/10 (30%) 9/45 (20%)	7/10 (70%) 36/45 (80%)	0,673
<i>p14m</i> /Bcl-2 _v ostale tri grupe	2/6 (33,3%) 10/49 (20,4%)	4/6 (66,7%) 39/49 (79,6%)	0,602
<i>p14m</i> /Ki-67 _v ostale tri grupe	4/16 (25%) 8/39 (20,5%)	14/16 (75%) 31/39 (79,5%)	0,730

m-metilovan; v-visok nivo ekspresije; p-verovatnoća statističke značajnosti je ispitivana Fišerovim egzaktnim testom i Pirsonovim χ^2 -testom.

Prilog 4.

Tabela 1. Istovremeno izmenjen mutacioni status gena KRAS i različit nivo ekspresije proteinskih markera u asocijaciji sa odgovorom na HRT

Mutacioni status gena KRAS /Ekspresija imunohistohemijjskih parametara	Odgovor na HRT		P
	Povoljan (KO/PO)	Nepovoljan (SS/PB)	
KRASm/EGFRv ostale tri grupe	5/7 (71,4%) 27/54 (50%)	2/7 (28,6%) 27/54 (50%)	0,429
KRASm/VEGFv ostale tri grupe	0/13 (0%) 31/48 (64,6%)	13/13 (100%) 17/48 (35,4%)	<0,001
KRASm/Bcl-2v ostale tri grupe	1/8 (12,5%) 31/53 (58,5%)	7/8 (87,5%) 22/53 (41,5%)	0,022
KRASm/Ki-67v ostale tri grupe	5/17 (29,4%) 26/44 (59,1%)	12/17(70,6%) 18/44 (40,9%)	0,051

HRT-hemioradioterapija; KO-kompletan odgovor; PO-parcijalni odgovor; SS-stacionarno stanje; PB-progresija bolesti; m-metilovan; v-visok nivo ekspresije; p-verovatnoća statističke značajnosti je ispitivana Fišerovim egzaktnim testom i Pirsonovim χ^2 -testom.

Tabela 2. Istovremeno izmenjen mutacioni status gena KRAS i različit nivo ekspresije proteinskih markera u asocijaciji sa pojavom lokalnih recidiva i/ili metastaza

Metilacioni status gena KRAS /Ekspresija imunohistohemijjskih parametara	Lokalni recidivi i/ili metastaze		P
	Prisutne	Odsutne	
KRASm/EGFRv ostale tri grupe	3/7 (42,9%) 20/48 (%)	4/7 (57,1%) 28/48 (%)	1.000
KRASm/VEGFv ostale tri grupe	10/13 (76,9%) 13/47 (27,7%)	3/13 (23,1%) 34/47 (72,3%)	0,003
KRASm/Bcl-2v ostale tri grupe	5/8 (62,5%) 18/52 (34,6%)	3/8 (37,5%) 34/52 (65,4%)	0,240
KRASm/Ki-67v ostale tri grupe	10/17 (58,8%) 13/43 (30,2%)	7/17 (41,2%) 30/43 (69,8%)	0,079

m-metilovan; v-visok nivo ekspresije; p-verovatnoća statističke značajnosti je ispitivana Fišerovim egzaktnim testom i Pirsonovim χ^2 -testom.

Tabela 3. Istovremeno izmenjen mutacioni status gena KRAS i različit nivo ekspresije proteinskih markera u asocijaciji sa krajnjim ishodom bolesti

Metilacioni status gena KRAS /Ekspresija imunohistohemijskih parametara	Smrtni ishod		p
	Da	Ne	
KRASm/EGFRv ostale tri grupe	1/7 (14,3%) 11/53 (20,3%)	6/7 (85,7%) 42/53 (79,2%)	1,000
KRASm/VEGFv ostale tri grupe	5/13 (38,5%) 7/47 (14,9%)	8/13 (61,5%) 40/47 (85,1%)	0,110
KRASm/Bcl-2v ostale tri grupe	2/8 (25%) 10/52 (19,2%)	6/8 (75%) 42/52 (80,8%)	0,655
KRASm/Ki-67v ostale tri grupe	5/17 (29,4%) 7/43 (16,3%)	12/17 (70,6%) 36/43 (83,7%)	0,293

m-metilovan; v-visok nivo ekspresije; p-verovatnoća statističke značajnosti je ispitivana Fišerovim egzaktnim testom i Pirsonovim χ^2 -testom.

STRUČNA BIOGRAFIJA

Bojana Kožik rođena je 08.02.1986. godine u Rumi, gde je završila osnovnu i srednju školu. Diplomirala je 06.07.2012. godine, na Biološkom fakultetu, Univerziteta u Beogradu, (studijska grupa-Molekularna biologija i fiziologija), odbranom diplomskog rada pod naslovom „*Detekcija B-raf gena i mutacije V600E kod humanih kolorektalnih kancera*“, pod mentorstvom dr Koviljke Krtolice-Žikić, naučnog savetnika Instituta za nuklearne nauke „Vinča“, u Beogradu.

Školske 2012/2013 godine upisala je doktorske studije na Biološkom fakultetu, Univerziteta u Beogradu, modul-Molekularna biologija eukariota.

U periodu od 2012. do 2014. god. angažovana kao istraživač pripravnik u Laboratoriji za radiobiologiju i molekularnu genetiku, Instituta za nuklearne nauke „Vinča“, u Beogradu. Od 01.01.2014. zaposlena je u Laboratoriji za radiobiologiju i molekularnu genetiku, Instituta za nuklearne nauke „Vinča“, u Beogradu. U zvanje istraživač-saradnik je izabrana 2018. godine.

Do sada je publikovala 2 rada iz uže naučne oblasti i 5 saopštenja u zbornicima sa naučnih skupova. Trenutno je angažovana na projektu „Molekularne determinante za dizajn tumor markera“ (br. 173049), Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja, Republike Srbije.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Бојана Кожик

број индекса Б3022/2012

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

“Метилациони статус *p16INK4a* и *p14ARF* тумор-супресор гена и присуство мутација *KRAS* онкогена у корелацији са одговором на преоперативну хемиоррадиотерапију у локално унапредовалом карциному ректума човека”

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, 24.07.2020.

Бојана Кожик

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Бојана Кожик

Број индекса Б3022/2012

Студијски програм Молекуларна биологија

Наслов рада “Метилациони статус *p16INK4a* и *p14ARF* тумор-супресор гена и присуство мутација *KRAS* онкогена у корелацији са одговором на преоперативну хемиорадиотерапију у локално узнапредовалом карциному ректума човека”

Ментор др Милена Крајновић

Потписани/а 

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда

У Београду, 24.07.2020.



Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

“Метилациони статус *p16INK4a* и *p14ARF* тумор-супресор гена и присуство мутација *KRAS* онкогена у корелацији са одговором на преоперативну хемиоррадиотерапију у локално унапредовалом карциному ректума човека”

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, 24.07.2020.



1. Ауторство - Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољава се умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољава се умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољава се умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. Ауторство – без прераде. Дозвољава се умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољава се умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.