

Univerzitet u Beogradu

Farmaceutski Fakultet

Marija D. Mihajlović

Ispitivanje prediktivnog i dijagnostičkog značaja
pojedinačnih i kombinovanih biomarkera lipidnog
statusa i inflamacije kod pacijenata sa
kolorektalnim karcinomom

Doktorska disertacija

Beograd, 2022

University of Belgrade

Faculty of Pharmacy

Marija D. Mihajlović

Investigation of predictive and diagnostic
significance of single and combined biomarkers of
lipid status and inflammation in patients with
colorectal cancer

Doctoral dissertation

Belgrade, 2022

Podaci o mentoru i komisiji za ocenu i odbranu doktorske disertacije

dr Aleksandra Zeljković, mentor

vanredni profesor

Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

dr Vesna Spasojević-Kalimanovska, predsednik komisije

redovni profesor u penziji

Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

dr Aleksandra Stefanović,

vanredni profesor

Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

dr Ana Ninić,

vanredni profesor

Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

dr Milan Jovanović,

docent Medicinskog fakulteta Vojnomedicinske akademije Univerziteta odbrane

u Beogradu

Datum odbrane: _____

Ova doktorska disertacija je urađena na Katedri za medicinsku biohemiju Farmaceutskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu, pod mentorstvom prof. dr Aleksandre Zeljković. Uzroci su sakupljeni na Klinici za opštu hirurgiju Vojnomedicinske akademije u Beogradu i u Opštoj bolnici „MediGroup“ u Beogradu. U toku izrade i pisanja ove doktorske disertacije sam imala veliku podršku i pomoć kolega, prijatelja i porodice kojima želim da se zahvalim.

Najiskrenije se zahvaljujem svojoj mentorki prof. dr Aleksandri Zeljković koja je utemeljila moj put u svet nauke i motivisala me da stalno napredujem. Zahvalna sam na svim savetima i sugestijama, stručnoj i organizacionoj podršci, idejama koje je nesebično delila sa mnom, kao i na poverenju i strpljenju koje je iskazala tokom izrade ove doktorske disertacije.

Veliku zahvalnost dugujem prof. dr Ani Ninić za sve korisne savete, strpljenje, veru, trud i rad pri realizaciji eksperimentalnog dela disertacije.

Posebno se zahvaljujem prof. dr Aleksandri Stefanović i prof. dr Jeleni Vekić, na razumevanju, motivaciji, bezrezervnoj podršci i pomoći tokom svih ovih godina našeg zajedničkog rada.

Najiskrenije se zahvaljujem prof. dr Bratislavu Trifunoviću, dr Dejanu Zeljkoviću i dr Milanu Jovanoviću na ukazanom poverenju i uspešno ostvarenoj saradnji.

Zahvalnost dugujem i prof. dr Jeleni Kotur Stevuljević i prof. dr Nataši Bogavac Stanojević koje su svojim stručnim savetima i podsticajem značajno doprinele izradi ove disertacije i pomogle moje sveukupno profesionalno usavršavanje.

Zahvaljujem se i prof. Aleksandri Topić, prof. emeritusu Slavici Spasić i prof. emeritusu Zorani Jelić Ivanović na svom stručnom znanju pruženom tokom studija.

Od srca se zahvaljujem prof. dr Vesni Spasojević-Kalimanovskoj na velikoj podršci i razumevanju koje mi je ukazala tokom svih ovih godina, podsticaju da se bavim naukom, kao i na pruženju prilici da postanem deo tima Katedre za medicinsku biohemiju.

Takođe, hvala svim profesorima, docentima i asistentima koji su me toplo prihvatili u prostorije laboratorije za hemostazu i hematologiju.

Veliko hvala svim zaposlenima na Katedri za medicinsku biohemiju, a posebno kolegi Mironu Sopiću koji je umnogome pomogao izradu disertaciju i uvek bio tu za sva moja pitanja, kolegicama Milici Miljković, Jeleni Munjas, Sandri Vladimirov, Tamari Gojković i Jasmini Ivanišević koje su mi svojim savetima i podrškom pomogle da prevaziđem i najteže prepreke. Posebno hvala mlađim kolegicama Azri, Jeleni, Tamari i obema Sanjama na zaraznom entuzijazmu za nauku, kreativnoj razmeni ideja, na velikoj podršci i lepom prijateljstvu. Hvala i našim tehničarima, Vesni i Marini na svakoj pomoći.

Na kraju, hvala mojim prijateljima, najpre mojoj Milici, za svo razumevanje i neizmernu podršku poslednjih godina. I naravno, najveću zahvalnost dugujem svim članovima moje porodice, mojim roditeljima, sestri Milici, bakama, deki i malom Bogdanu. Posebno sam zahvalna mom najdražem Vladi, za veru u moj trud, rad i neizmernu podršku u teškim trenucima. Stoga, ovu doktorsku disertaciju posvećujem vama, porodici, rodbini, prijateljima i dragim kolegama.

Sažetak

Ispitivanje prediktivnog i dijagnostičkog značaja pojedinačnih i kombinovanih biomarkera lipidnog statusa i inflamacije kod pacijenata sa kolorektalnim karcinomom

Nedostatak pouzdanih serumskih biomarkera je jedan od osnovnih problema u dijagnostici i proceni rizika za razvoj kolorektalnog karcinoma (*colorectal cancer*, CRC). Imajući u vidu da se razvoj malignih bolesti odlikuje kako promenama ćelijskog metabolizma, tako i izmenama imunog, oksidativnog i inflamatornog okruženja malignih ćelija, integrativni pristup, koji bi obuhvatio istovremeno određivanje više biomarkera tipičnih za navedena stanja, predstavlja obećavajuću strategiju u proceni rizika, skriningu i ranoj dijagnostici CRC.

U ovoj studiji je ispitivan potencijal pojedinačnih i kombinovanih biomarkera za dijagnostiku i predviđanje rizika za nastanak CRC. Istraživanje je obuhvatilo četiri aspekta preko kojih se stekao uvid u promene inflamatornog statusa, energetskog metabolizma i imune homeostaze pacijenata sa CRC. U te svrhe smo određivali plazmatske koncentracije insulinu sličnog faktora rasta 1 (IGF1) i holesterola sadržanog u lipoproteinima visoke gustine (HDL-h) kao indikatora metaboličkih promena, te rezistina i E-kadherina kao parametara inflamacije. Drugi aspekt je obuhvatio ispitivanje funkcionalnosti enzima uključenih u remodelovanje (lecitin-holesterol aciltransferaze, LCAT, holesterol-estar transfernog proteina, CETP) i antioksidativnu funkciju (paraoksonaze 1, PON-1) HDL čestica kao zajedničkog imenitelja energetskog metabolizma, redoks, imune i inflamatorne ravnoteže. Treći aspekt je činilo određivanje nivoa ekspresije gena uključenih u kontrolu inflamatornog procesa (gena rezistina i njegovog receptora, proteina udruženog sa adenilat ciklazom 1, CAP-1), imunog odgovora (gena faktora nekroze tumora α , TNF- α) i metaboličke homeostaze (gena adiponektinskih receptora, Adipor1 i Adipor2) u mononuklearnim ćelijama periferne krvi (PBMC). Konačno, četvrti aspekt predstavljala je procena genetske predispozicije pojedinca za razvoj karcinoma bazirana na ispitivanju prisustva polimorfizama pojedinačnih nukleotida gena od interesa (*IG1* rs2946834, *ADIPOQ* rs266729, *ADIPOR1* rs7539542, *ADIPOR1* rs1342387, *TNF- α* rs1800629, *RETN* rs1862513). Istraživanje je dopunjeno bioinformatičkom analizom *online* dostupnih transkriptomskih baza podataka.

U istraživanje je uključeno 126 pacijenata sa CRC sa Klinike za opštu hirurgiju Vojnomedicinske akademije u Beogradu, kao i 101 zdrava osoba koja je pristupila redovnom godišnjem lekarskom pregledu u Opštoj bolnici Medigroup u Beogradu. Ispitanici su anketirani, te su na taj način prikupljeni podaci o uzrastu, osnovnim antropometrijskim merama i životnim navikama. Rutinski biohemijski parametri su određeni na analizatoru ILAB 300+, korišćenjem standardnih enzimskih i kolorimetrijskih procedura. Aktivnosti LCAT i CETP su procenjene merenjem brzine stvaranja i prenosa holesterol estara. Paraoksonazna aktivnost PON-1 je određena spektrofotometrijski uz paraokson kao supstrat, dok je arilesterazna aktivnost određena metodom sa fenilacetatom. Lančana reakcija polimerizacije (*polymerase chain reaction*, PCR) je korišćena u svrhe genotipizacije ispitanika i procene nivoa ekspresije gena. Komercijalni ELISA testovi su korišćeni za određivanje plazmatskih koncentracija IGF1, E-kadherina, rezistina, kao i CETP. *In silico* istraživanje je bilo bazirano na analizi *online* dostupnih transkriptomskih setova podataka: GSE47756 i GSE44076, a uključivalo je određivanje nivoa

genskih ekspresija adiponektinskih receptora i TNF- α u monocitima periferne krvi zdravih ispitanika i osoba sa CRC (baza GSE47756), ali i u tumorskom tkivu, mukozi susednoj tumoru, odnosno potpuno zdravoj mukozi (GSE44076). *Gene set enrichment* analiza (GSEA) je korišćena za utvrđivanje povezanosti između ekspresije adiponektinskih receptora i genskih setova koji su uključeni u metaboličku, imunu i inflamatornu signalnu kaskadu.

Niže koncentracije HDL-h ($p < 0,001$) su uočene kod pacijenata sa CRC, zajedno sa sniženom aktivnošću LCAT ($p = 0,037$) i povišenom aktivnošću CETP ($p = 0,030$), a smanjenom masenom koncentracijom CETP ($p < 0,001$) u odnosu na zdrave ispitanike. Obe aktivnosti PON-1 su bile redukovane u karcinomu ($p = 0,030$ i $p < 0,001$). Dobijeni rezultati su ukazali na snižene nivoe genske ekspresije Adipor1 ($p < 0,001$), TNF- α ($p = 0,023$) i rezistina ($p < 0,001$), nepromenjene nivoe ekspresije Adipor2 ($p = 0,442$) i ushodno regulisane nivoe ekspresije CAP-1 ($p = 0,025$) u PBMC pacijenata sa CRC. Snižene koncentracije IGF1 ($p = 0,019$) zajedno sa povišenim koncentracijama E-kadherina ($p < 0,001$) i rezistina ($p < 0,001$) su uočene kod pacijenata sa CRC u odnosu na kontrolnu grupu. Nije bilo razlike u distribuciji genotipova definisanih prema polimorfizmu pojedinačnih nukleotida gena od interesa, između pacijenata sa CRC i zdravih osoba. Povezanost polimorfizama ciljnih gena sa odgovarajućim proteinima, odnosno nivouima ekspresije gena nije uočena ni u CRC ni u kontrolnoj grupi. Nasuprot tome, snižene koncentracije ukupnog holesterola ($p = 0,001$), holesterola sadržanog u lipoproteinima niske gustine ($p = 0,004$) i HDL-h ($p = 0,029$) su postojale kod nosilaca G alela polimorfizma *ADIPOR1* rs7539542 u grupi pacijenata sa CRC. *In silico* rezultati istraživanja su ukazali na slaganje nishodno regulisane genske ekspresije Adipor1 i nepromenjenih nivoua Adipor2, dobijenih u PBMC naših ispitanika, sa transkriptomskim obrascem ovih receptora uočeni u mukozi susednoj tumoru GSE44076 baze podataka. GSEA analiza je ukazala na moguću značajnu ulogu Adipor2 u metaboličkim promenama u malignom tkivu, kao i na potencijalnu zaštitnu funkciju Adipor1 u toku progresije tumora (GSE44076). U analizi GSE44756 baze podataka, Adipor1 se izdvojio kao metabolički aktivan receptor u monocitima, dok je istovremeno bio u pozitivnoj korelaciji i sa skupom gena vezanih za TNF- α NF- κ B signalnu kaskadu. Multimarkerski pristup u analizi prediktivnog potencijala ispitivanih parametara je izdvojio aktivnost CETP ($p = 0,025$), masenu koncentraciju CETP ($p < 0,001$), plazmatske koncentracije IGF1 ($p = 0,040$), E-kadherina ($p < 0,001$) i rezistina ($p = 0,019$) kao značajne nezavisne prediktore razvoja CRC.

Multimarkerski princip koji bi uključio ispitivanje plazmatskih koncentracija proteina, genske ekspresije i polimorfizama od značaja može da predstavlja osnov razvoja visoko osetljivih i specifičnih dijagnostičkih i prediktivnih alata za kompleksna oboljenja poput CRC.

Ključne reči: HDL-h, LCAT, CETP, PON-1, IGF1, Adipor1, Adipor2, TNF- α , E-kadherin, rezistin, CAP-1, polimorfizam pojedinačnih nukleotida, multimarkerski pristup

Naučna oblast: Medicinske nauke- Farmacija

Uža naučna oblast: Medicinska biohemija

UDK broj:

Abstract

Investigation of predictive and diagnostic significance of single and combined biomarkers of lipid status and inflammation in patients with colorectal cancer

The lack of reliable serum biomarkers is among major problems linked to the diagnosis of colorectal cancer (CRC) and the risk assessment for the disease development. Given that the development of malignant diseases is characterized by changes in cellular metabolism and immune, oxidative and inflammatory environment of malignant cells, an integrative approach, which includes simultaneous determination of multiple biomarkers, represents a promising strategy for the risk evaluation, screening and early diagnosis of CRC.

In this study, capacities of single and combined biomarkers for diagnosing and predicting the risk of developing CRC were examined. The research included four approaches for the assessment of alterations of inflammatory status, energy metabolism and immune homeostasis in CRC patients. For these purposes, plasma concentrations of insulin-like growth factor 1 (IGF1) and high-density lipoprotein cholesterol (HDL-c) as indicators of metabolic changes were determined, while resistin and E-cadherin concentrations were used as indicators of inflammatory status. The second approach included testing the functionality of enzymes involved in remodeling (lecithin cholesterol acyltransferase, LCAT, cholesterol ester transfer protein, CETP) and antioxidative function (paraoxonase 1, PON-1) of HDL particle, which was appreciated as a common denominator of energy metabolism, redox, immune and inflammatory homeostasis. The third approach was to determine the levels of gene expressions involved in the control of the inflammatory processes (resistin and its receptor, adenylate cyclase-associated protein 1, CAP-1), immune response (tumor necrosis factor α , TNF- α) and metabolic homeostasis (adiponectin receptors, Adipor1 and Adipor2) in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs). Finally, the fourth approach was the assessment of an individual's genetic predisposition to develop CRC, which was based on the exploration of specific single nucleotide polymorphisms (SNPs): *IGF1* rs2946834, *ADIPOQ* rs266729, *ADIPOR1* rs7539542, *ADIPOR1* rs1342387, *TNF- α* rs1800629, *RETN* rs1862513. The research was further supplemented by a bioinformatics analysis of online available transcriptome databases.

The study included 126 patients with CRC from the Clinic for General Surgery of the Military Medical Academy in Belgrade, as well as 101 healthy individuals who attended the regular annual medical examination at the General Hospital Medigroup in Belgrade. The participants were interviewed, and data on age, basic anthropometric measurements and life habits were collected. Routine biochemical parameters were determined on ILAB 300+ analyzer, using standard enzymatic and colorimetric procedures. LCAT and CETP activities were assessed by measuring the rate of formation and transfer of cholesteryl esters. Paraoxonase activity of PON-1 was determined spectrophotometrically with paraoxone as a substrate, while arylesterase activity was determined by the phenylacetate method. Polymerase chain reaction (PCR) was used for genotyping and the assessment of gene expression levels. Commercial ELISA assays were used to determine plasma concentrations of IGF1, E-cadherin, resistin, and CETP. *In silico* study was based on the analysis of online available transcriptome data sets: GSE47756 and GSE44076, and included determination of adiponectin receptors (Adipor1 and Adipor2)

and TNF- α gene expression levels in peripheral blood monocytes of healthy subjects and CRC patients (GSE47756), but also in tumor tissue, tumor adjacent mucosa, and healthy mucosa (GSE44076). Gene set enrichment analysis (GSEA) was used to determine the association between adiponectin receptor expression and gene sets involved in the metabolic, immune, and inflammatory signaling cascades.

Lower concentrations of HDL-c ($p < 0.001$) were observed in patients with CRC, together with decreased LCAT activity ($p = 0.037$), increased CETP activity ($p = 0.030$), and decreased CETP mass concentration ($p < 0.001$) in comparison to healthy subjects. Both PON-1 activities were reduced in cancer ($p = 0.030$ and $p < 0.001$). The obtained results indicated decreased gene expression levels of Adipor1 ($p < 0.001$), TNF- α ($p = 0.023$), and resistin ($p < 0.001$), unchanged levels of Adipor2 gene expression ($p = 0.442$) and up-regulated CAP-1 gene expression ($p = 0.025$) in PBMCs of CRC patients. Decreased concentrations of IGF1 ($p = 0.019$) together with elevated concentrations of E-cadherin ($p < 0.001$) and resistin ($p < 0.001$) were observed in patients with CRC compared to the control group. There was no difference in the distribution of genotypes of the selected SNPs between CRC patients and healthy controls. The association of target gene polymorphisms with the corresponding proteins or gene expression levels was observed neither in CRC patients, nor in the control group. In contrast, decreased concentrations of total cholesterol ($p = 0.001$), low-density lipoprotein cholesterol ($p = 0.004$) and HDL-c ($p = 0.029$) were present in the carriers of G allele of *ADIPOR1* rs7539542 polymorphism in the group of patients with CRC. *In silico* results of our study indicated that the transcriptome pattern of adiponectin receptors in the tumor adjacent mucosa based on the GSE44076 database was in accordance with our results of down-regulated gene expression of Adipor1 and unchanged levels of Adipor2 in PBMC of CRC patients. GSEA analysis indicated a possible significant role of Adipor2 in metabolic changes in malignant tissue, as well as the potential protective function of Adipor1 during tumor progression (GSE44076). In the GSE44756 database analysis, Adipor1 was isolated as a metabolically active receptor in monocytes, while at the same time being positively correlated with a set of genes associated with the TNF- α NF- κ B signaling cascade. The multimarker approach in the analysis of the predictive potential of the examined parameters singled out CETP activity ($p = 0.025$), mass concentration of CETP ($p < 0.001$), concentrations of IGF1 ($p = 0.040$), E-cadherin ($p < 0.001$) and resistin ($p = 0.019$) as significant independent predictors of CRC development.

The multimarker approach, which involves the examination of plasma protein concentrations, gene expression and polymorphisms of interest, could represent the basis for the development of highly sensitive and specific diagnostic and predictive tools for complex diseases such as CRC.

Keywords: HDL-c, LCAT, CETP, PON-1, IGF1, Adipor1, Adipor2, TNF- α , E-cadherin, resistin, CAP-1, single nucleotide polymorphism, multimarker approach

Scientific field: Medical sciences - Pharmacy

Narrow scientific field: Medical biochemistry

UDC number:

Skraćenice u tekstu

CRC- karcinom kolorektuma (*Colorectal cancer*)

HNPCC- nasledni nepolipozni kolorektalni karcinom (*Hereditary nonpolyposis colorectal cancer*)

FAP- familijarna adenomatozna polipoza

MAP- MYH udružena polipoza

PJS- Peutz-Jegersov sindrom

TGF- β - transformišući faktor rasta β

CIN- hromozomska nestabilnost (*Chromosome instability*)

MSI- mikrosatelitska nestabilnost (*Microsatellite instability*)

MAPK- mitogenom aktivirana protein kinaza (*Mitogen-activated protein kinase*)

DNK- dezoksiribonukleinska kiselina

MMR- poremećaj u reparacionim mehanizmima DNK (*DNA mismatch repair system*)

GWAS- genomske studije asocijacije (*Genome wide association study*)

SNP- polimorfizam pojedinačnih nukleotida (*Single nucleotide polymorphism*)

ITM- indeks telesne mase

TNF- α - faktor nekroze tumora alfa (*Tumour Necrosis Factor alpha*)

IL- interleukin

IGF1-insulinu sličan faktor rasta 1 (*Insulin like growth factor 1*)

MPE-molekularna patološka epidemiologija

MDR- program redukcije multidimenzionalnosti (*Multidimensionality reduction program*)

FOBT- test na okultno krvarenje (*Fecal occult blood test*)

FDR- stopa lažno pozitivnih rezultata (*False discovery rate*)

EMT-epitelno-mezenhimalna tranzicija

PI3K-fosfatidil-inozitol 3 kinaza (*Phosphatidylinositol-3-kinase*)

TG-trigliceridi

LDL-h-holesterol sadržan u lipoproteinima niske gustine (*Low density lipoprotein cholesterol*)

ROS- reaktivne kiseonične vrste (*Reactive oxygene species*)

HDL-h-holesterol sadržan u lipoproteinima visoke gustine (*High density lipoprotein cholesterol*)

UH-ukupni holesterol

RTH-reverzni transport holesterola

Apo A1-apolipoprotein A1

ABCA1-ATP-vezujući kasetni transporter A1 (*ATP-binding cassette transporter A1*)

ABCG1-ATP-vezujući kasetni transporter G1 (*ATP-binding cassette transporter G1*)

LCAT-lecitin-holesterol aciltransferaza (*Lecithin-Cholesterol Acyltransferase*)

CETP-holesterol-estar transferni protein (*Cholesteryl ester transfer protein*)

PON-1-paraoksonaza 1

PAB-prooksidativni/antioksidativni balans

IGFBP-3-protein koji vezuje insulinu sličan faktor rasta 3 (*Insulin-like growth factor binding protein 3*)

IGF1R-IGF1 receptor

ERK-kinaza regulisana ekstracelularnom signalizacijom (*Extracellular signal-regulated kinase*)

EGFR- receptor za epidermalni faktor rasta (*Epidermal growth factor receptor*)

iRNK-informaciona ribonukleinska kiselina

Adipor1-adiponektinski receptor 1

Adipor2-adiponektinski receptor 2

AMPK-adenozin monofosfat-aktivirana protein kinaza (*AMP-activated protein kinase*)

PPAR- receptori aktivirani proliferatorom peroksizoma (*Peroxisome proliferator-activated receptor*)

IRS-supstrat za insulinski receptor

qPCR-kvantitativna lančana reakcija polimerizacije

STAT3-signalni transduktor i aktivator transkripcije 3 (*Signal transducer and activator of transcription 3*)

VEGF-vaskularni endotelni faktor rasta (*Vascular endothelial growth factor*)

JNK- c-Jun N-terminalne kinaze

NF-κB- nuklearni faktor kapa B (*Nuclear factor kappa B*)

mTOR- *mammalian target of rapamycin*

PBMC-mononuklearne ćelije periferne krvi (*Peripheral blood mononuclear cells*)

NK ćelije-prirodne ćelije ubice (*Natural killer cells*)

TNFR- receptor za faktor nekroze tumora alfa

CAP1- protein udružen sa adenilat ciklazom 1 (*Adenylyl cyclase-associated protein 1*)

PKA- protein kinaza A (*Protein kinase A*)

PPPM-prediktivna, preventivna i personalizovana medicina (*Predictive, Preventive and Personalized Medicine*)

SH-slobodan holesterol

ELISA- enzimski imunoesej (*enzyme linked immunosorbent assay*)

HRP-peroksidaza iz rena

uRNK-ukupna ribonukleinska kiselina

gDNK-genomska dezoksiribonukleinska kiselina

RT-reverzna transkripcija

cDNK-komplementarna DNK

dNTP-deoksiribonukleotid trifosfat

TF- kontrola bez reverzne transkriptaze (*Transcriptase free control*)

NTRT kontrola- kontrola reverzne transkripcije bez uzorka (*No template reverse transcription control*)

Ct-Prag ciklusa fluorescencije (*Cycle threshold*)

NTC- negativna kontrola PCR bez uzorka (*Non template control*)

GSEA-*Gene Set Enrichment Analysis*

ANOVA-analiza varijanse

PBM-monociti periferne krvi (*Peripheral blood monocytes*)

NES-normalizovani skor obogaćivanja (*Normalized Enrichment Score*)

CI- interval pouzdanosti (*Confidence interval*)

ANCOVA-analiza kovarijanse

ROC- *Receiver Operating Characteristics Curve*

AUC-površina ispod krive (*Area under the curve*)

TA-Tačnost testiranja (*Testing accuracy*)

CVC-konzistentnost u unakrsnoj validaciji (*Cross Validation Consistency*)

MDRPT-testiranje permutacija MDR modela (*MDR permutation testing*)

LD-neravnoteža vezanosti gena (*Linkage disequilibrium*)

Sadržaj

1. UVOD.....	1
1.1 Maligne bolesti.....	1
1.1.1 Kolorektalni karcinom	1
1.1.2 Patohistološki razvoj CRC i klasifikacija oboljenja.....	4
1.1.3 Faktori rizika za razvoj CRC	7
1.1.3.1 Nasledni faktori rizika	7
1.1.3.2 Egzogeni faktori rizika.....	10
1.1.4 Skrining i dijagnostika CRC	11
1.2 Biohemijske odlike CRC	13
1.2.1 Poremećaji energetskeg metabolizma u CRC.....	13
1.2.1.1 Poremećaji metabolizma lipida.....	13
1.2.1.2 Značaj lipidoma. Specifično lipidno profilisanje HDL čestica i povezanost sa rizikom za razvoj CRC.....	15
1.2.1.3 HDL čestica kao učesnik energetskeg metabolizma, inflamatornog i imunog odgovora i regulacije redok balansa.....	16
1.2.1.4 Povezanost dislipidemije i prooksidativno-antioksidativnog balansa u CRC.....	17
1.2.1.5 Metabolički efekti IGF1	18
1.2.1.6 Povezanost IGF1 i E-kadherina u CRC	20
1.2.1.7 Adipozno tkivo, adipocitokini i CRC	21
1.2.1.8 Metabolički efekti adiponektina	23
1.2.2 Poremećaji imuniteta i inflamacije	26
1.2.2.1 Adiponektin kao učesnik imune homeostaze.....	26
1.2.2.2 TNF- α kao medijator imunog odgovora i inflamacije.....	27
1.2.2.3 Uloga rezistina u inflamaciji i potencijalna povezanost sa razvojem CRC.....	30
2. Ciljevi istraživanja.....	33
3. Materijal i metode	35
3.1 Ispitanici.....	35
3.2 Metode.....	36
3.2.1 Osnovne biohemijske analize.....	36
3.2.2 Određivanje aktivnosti enzima LCAT i CETP.....	37
3.2.3 Parametri redoks statusa.....	37
3.2.4 Određivanje masene koncentracije CETP, IGF1, E-kadherina i rezistina.....	38
3.2.4.1 Određivanje masene koncentracije CETP.....	38
3.2.4.2 Određivanje masene koncentracije IGF1.....	39
3.2.4.3 Određivanje masene koncentracije E-kadherina.....	40
3.2.4.4 Određivanje masene koncentracije rezistina.....	41
3.2.5 Određivanje genske ekspresije i polimorfizama ciljnih gena.....	42
3.2.5.1 Izolacija mononuklearnih ćelija periferne krvi.....	42
3.2.5.2 Izolacija RNK.....	43
3.2.5.3 Izolacija DNK.....	44
3.2.5.4 Ispitivanje kvaliteta i integriteta izolovanih nukleinskih kiselina.....	45
3.2.5.5 Reverzna transkripcija.....	47
3.2.5.6 Kvantitativni PCR (qPCR).....	47
3.2.5.7 Metoda relativne standardne krive.....	48
3.2.5.8 Ispitivanje polimorfizama pojedinačnih nukleotida.....	52

3.3 Statistička obrada podataka.....	55
3.3.1 <i>In silico</i> analiza.....	55
3.3.2 Statistička analiza podataka dobijenih u istraživanju.....	55
3.3.3 MDR analiza.....	56
4.Rezultati.....	58
4.1 Osnovne antropometrijske karakteristike i biohemijski parametri učesnika u studiji..	58
4.1.1 Markeri oksidativnog stresa i specifičnog lipidnog profilisanja.....	59
4.1.2 Analiza korelacija između antropometrijskih i biohemijskih parametara, markera oksidativnog stresa i markera specifičnog lipidnog profilisanja.....	60
4.1.3 Ispitivanje dijagnostičkog značaja markera oksidativnog stresa i specifičnog lipidnog profilisanja.....	60
4.2 Ispitivanje značaja IGF1 i E-kadherina kao biomarkera CRC.....	64
4.2.1 Ispitivanje prediktivnog i dijagnostičkog značaja IGF1 i E-kadherina.....	69
4.2.2 Ispitivanje povezanosti SNP <i>IGF1</i> (rs2946834) i rizika za razvoj CRC.....	70
4.3 Ispitivanje markera adiponektinskog statusa i njihove povezanosti sa metaboličkim i imunološkim parametrima kod pacijenata sa CRC i u kontrolnoj grupi.....	72
4.3.1 Analiza korelacija između antropometrijskih i lipidnih parametara, adiponektinskih receptora i TNF- α	72
4.3.2 Ispitivanje povezanosti SNP <i>ADIPOQ</i> (rs266729) i rizika za razvoj CRC.....	73
4.3.3 Ispitivanje povezanosti SNP <i>ADIPOR1</i> (rs7539542) i rizika za razvoj CRC.....	75
4.3.4 Ispitivanje povezanosti SNP <i>TNF-α</i> (rs1800629) i rizika za razvoj CRC.....	77
4.3.5 Ispitivanje nezavisnog doprinosa polimorfni varijanti <i>ADIPOQ</i> i <i>ADIPOR1</i> promenama nivoa ekspresije gena TNF- α i koncentracija lipidnih markera.....	79
4.3.6 <i>In silico</i> analiza javno dostupnih baza transkriptomskih podataka, GSE44076 i GSE47756.....	80
4.4 Ispitivanje postojanja razlika u plazmatskim koncentracijama rezistina, nivoima genske ekspresije rezistina i CAP-1 kod pacijenata sa CRC i u kontrolnoj grupi.....	84
4.4.1 Analiza korelacija između antropometrijskih i lipidnih parametara, plazmatskih koncentracija rezistina i nivoa genske ekspresije rezistina i CAP-1.....	85
4.4.2 Ispitivanje prediktivnog i dijagnostičkog značaja koncentracije rezistina, iRNK rezistina i CAP-1.....	88
4.4.3 Ispitivanje povezanosti SNP <i>RETN</i> rs1862513 i rizika za razvoj CRC.....	90
4.4.4 Rezultati evaluacije gensko-genskih interakcija i interakcija gena sa faktorima spoljašnje sredine primenom MDR softvera.....	92
5. Diskusija	97
6. Zaključci	111
7. Literatura	113

1. UVOD

1.1 Maligne bolesti

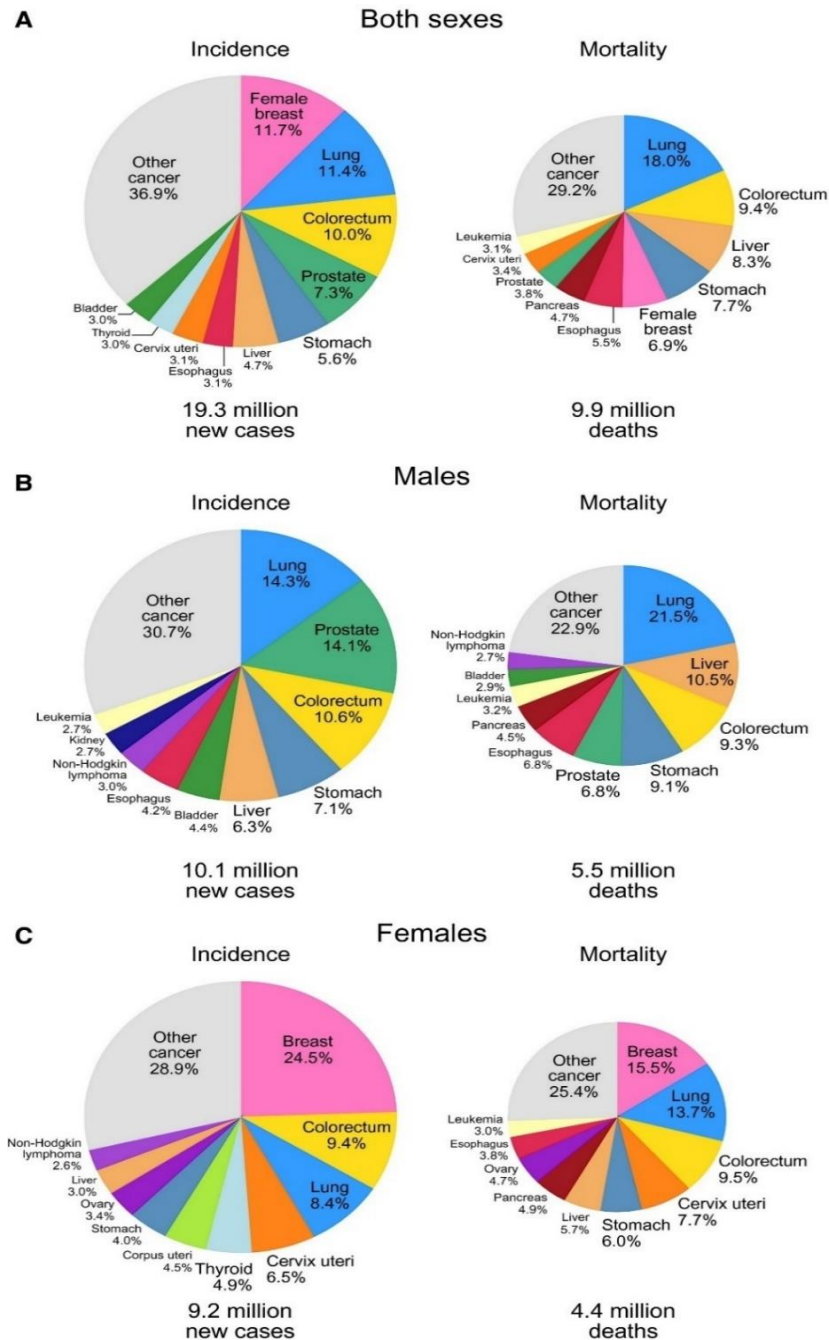
Maligne bolesti se nalaze među najvećim pretnjama globalnom zdravlju, ako se uzme u obzir njihova rastuća učestalost, relativno slaba efikasnost postojećih terapijskih modela i drastično smanjenje kvaliteta života obolelih. Prema izveštajima Svetske Zdravstvene Organizacije (*World Health Organization*, WHO), karcinom je bio prvi ili drugi uzročnik smrtnog ishoda u 112 od 183 zemalja kod osoba mlađih od 70 godina, dok se u preostale 23 zemlje nalazio na trećem ili četvrtom mestu [1]. Najnoviji GLOBOCAN podaci iz 2020. godine su pokazali da je od karcinoma obolelo 19,3 miliona novih slučajeva, a letalan ishod je nastupio kod 10 miliona obolelih (slika 1) [1]. Karcinom dojke je najčešće dijagnostikovana maligna bolest, nakon čega sledi karcinom pluća, dok se na trećem mestu nalazi karcinom kolorektuma (*Colorectal cancer*, CRC), (slika 1) [1]. Dostupni podaci pokazuju da je najsmrtonosniji malignitet karcinom pluća, no odmah za njim se izdvaja CRC (slika 1) [1].

1.1.1 Kolorektalni karcinom

CRC predstavlja skup morfoloških, histoloških i genetskih promena koje ispoljavaju svoj patološki potencijal nakon određenog vremenskog perioda [2]. Danas je poznato da CRC predstavlja malignitet visoke prevalence i multifaktorijalne etiologije [2]. Po učestalosti se nalazi na drugom mestu kod žena, nakon karcinoma dojke, dok je kod muškaraca na trećem mestu, posle karcinoma pluća i prostate (slika 1) [1]. CRC se smatra jednim od najjasnijih pokazatelja „tranzicije karcinoma“, s obzirom da njegova incidenca zamenjuje incidencu maligniteta uzrokovanih infektivnim bolestima u zemljama sa brzim ekonomskim razvojem, zajedno sa ostalim vrstama karcinoma pretežno vezanim za zapadni stil života [3]. Tranzicija karcinoma predstavlja epidemiološki pojam uveden kako bi se objasnio prelaz od dominantnih formi karcinoma povezanih sa infektivnim bolestima, ka karcinomima koji su povezani sa faktorima rizika koji su mahom neinfektivni i najčešće podstaknuti napredovanjem društva na socio-ekonomskoj lestvici. Naime, CRC je bio redak oblik maligniteta 50-tih godina prošlog veka, ali je sa vremenom postao dominantan tip karcinoma u zapadnim zemljama, te mu se danas pripisuje oko 10% globalne smrtnosti u vezi sa malignitetom [1, 4].

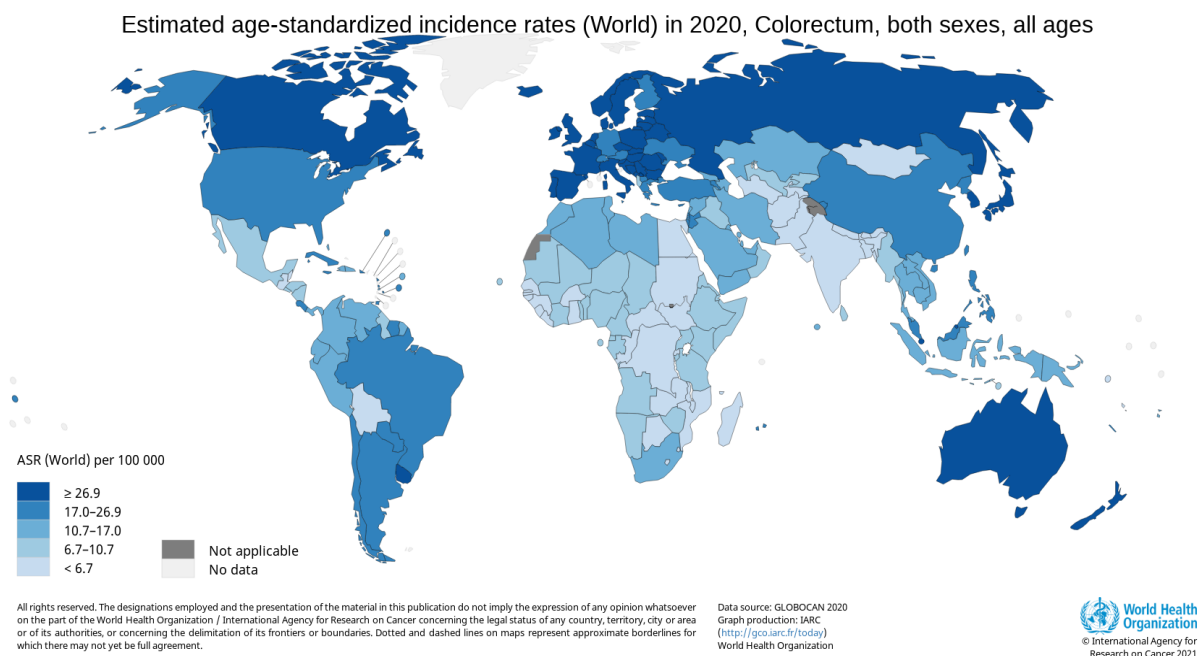
Prema statističkim podacima *Nacionalnog vodiča dobre kliničke prakse za dijagnostikovanje i lečenje raka kolona i rektuma*, učestalost smrtnog ishoda od CRC u srpskoj ženskoj populaciji se poklopa sa podacima na nivou Evrope (na trećem mestu) dok je na drugom mestu kod muškaraca, nakon karcinoma pluća [5]. Prema procenama Američkog instituta za istraživanje karcinoma, Srbija se nalazi među 25 zemalja na svetu sa najvišom incidencom CRC (stopa rasta standardizovana za godine na 100000 stanovnika za Srbiju iznosi 36,7) [6]. Kada je u pitanju podela po polovima, Srbija je na 8. mestu po stopi oboljevanja muškaraca, dok statistički ne zauzima visoku poziciju kada su u pitanju žene [6]. Još uvek nije sasvim jasno zašto postoji razlika u incidenci CRC u odnosu na pol. Ipak, iako postoji više nedoumica, uzrok se traži u polnim hormonima, a prvenstveno u zaštitnoj ulozi estrogena [7]. Ono što je

poznato jeste da rizik za razvoj CRC raste sa godinama. Većina pacijenata sa sporadičnim CRC je pretežno starosti preko 50 godina. Naime, 75% pacijenata sa rektalnim karcinomom i 80% pacijenata sa karcinomom kolona je bilo starije od 60 godina u trenutku postavljanja dijagnoze [4]. Međutim, iako se visoka incidenca CRC vezuje prevashodno za stariju populaciju, danas se u Srbiji uočava porast broja obolelih i među osobama mlađim od 40 godina [5].



Slika 1. Distribucija slučajeva i smrtnih ishoda za 10 najčešćih karcinoma u 2020. godini za (A) Oba pola (B) Muškarce i (C) Žene. Preuzeto sa sajta GLOBOCAN 2020.

Kao što je već spomenuto, karakteristično je da se ovaj tip karcinoma dovodi u blisku vezu sa socioekonomskim statusom [3]. Naime, dok se kod zemalja u razvoju uočava porast u trendu oboljevanja, taj trend je stabilniji u razvijenim zemljama, mada je incidenca i dalje visoka. Smatra se da je razlog stabilnog ili čak opadajućeg trenda u pojedinim zemljama rana detekcija karcinoma i uklanjanje prekanceroznih polipa [3]. Nishodni trend je uočen u visoko razvijenim zemljama kao što su SAD, Australija, Novi Zeland, zapadni delovi Evrope (Francuska, Nemačka, Španija), Japan kao i pojedine zemlje istočne Evrope i to upravo zahvaljujući poboljšanim dijagnostičkim procedurama, prevenciji, redukovanim faktorima rizika i zdravijoj ishrani (slika 2) [8]. Nasuprot tome, ekonomski rast u siromašnim zemljama i zemljama u razvoju je rezultovao promenom obrazaca ishrane, odnosno povećanim unosom masti, šećera i namirnica životinjskog porekla, te je porast incidence CRC u ovim zemljama očigledan [3].

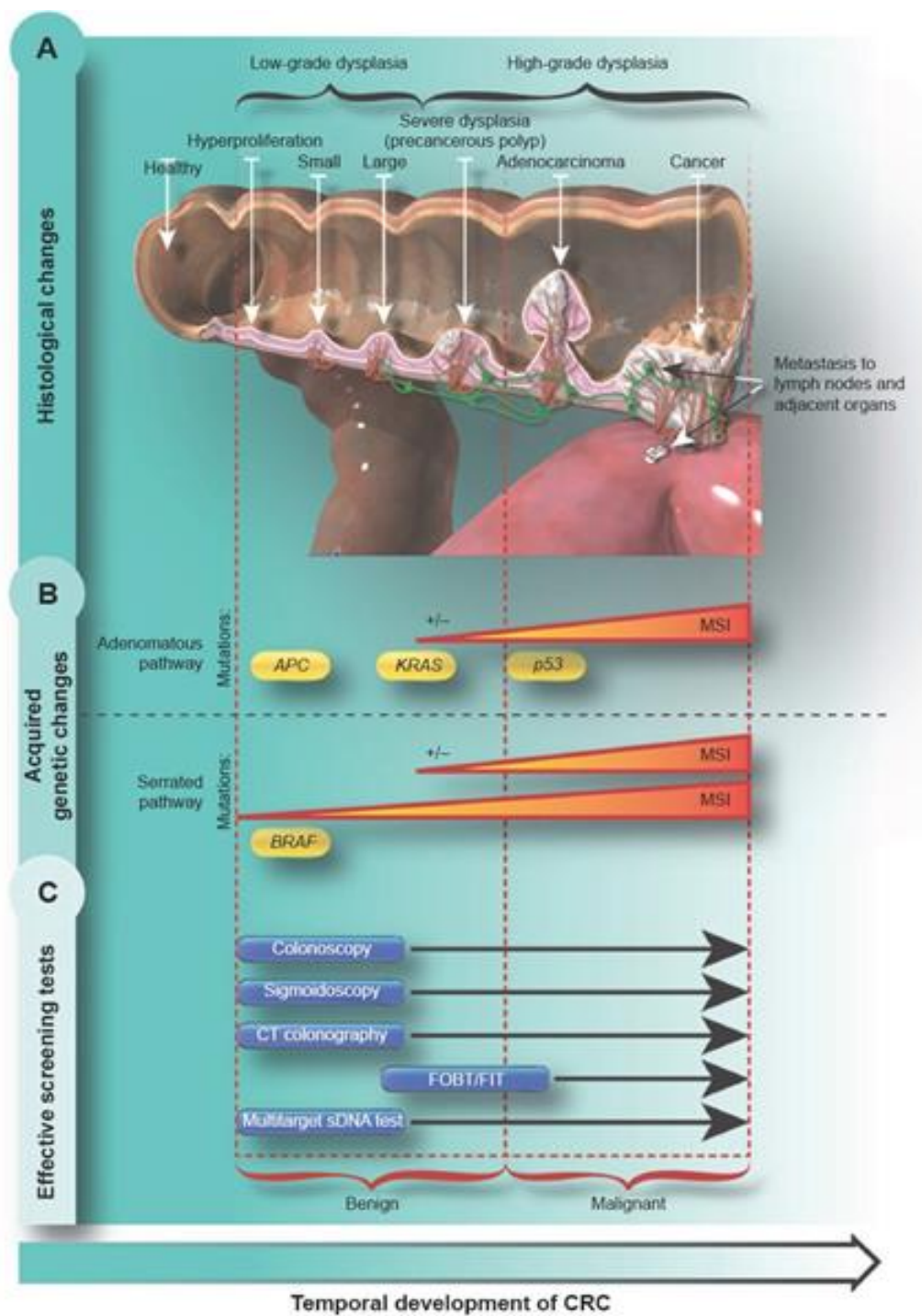


Slika 2. Stopa incidence standardizovana za godine, 2020. godine, CRC, oba pola

Preuzeto sa sajta: Internacionalne agencije za istraživanje karcinoma. WHO

1.1.2 Patohistološki razvoj CRC i klasifikacija oboljenja

Za CRC je karakteristična spora progresija, kao i to da ovaj tip tumora generalno ne pokazuje simptome dok ne dostigne veličinu od nekoliko cm, kada počinje da ometa crevnu pasažu, te dovodi do grčeva u stomaku, bolova ili krvarenja [2]. Normalna crevna mukoza se sastoji od tri glavna elementa: epitela (glatka površina i kripte), lamine proprije (*lamina propria*) i muskularne mukoze (*muscularis mucosae*) [9]. U najranijim fazama razvoja ovog karcinoma dolazi do ne-kancerogene proliferacije mukoznih epitelnih ćelija, čiji rast može trajati 10-20 godina pre nego što postanu maligne [10]. Najpoznatija forma ove proliferacije se naziva „polip“ [10]. Postoje dva glavna tipa polipa sa malignim potencijalom: adenomi i sesilni nazubljeni polipi (*sessile serrated polyps*) [2]. Generalno, većina adenoma ima tubularnu histologiju sa malim, okruglim, atipičnim ćelijama koje obično imaju dugačku filamentoznu građu, na patološkim izveštajima naznačenu kao prisustvo vila ili tubulovila [2]. Suprotno tome, sesilni nazubljeni polipi su ravni, sa nazubljenim, testerastim površinama [2]. Samo oko 10% adenoma progredira ka invazivnom karcinomu - adenokarcinomu [10], ali oko 96% svih dijagnostikovanih slučajeva CRC su adenokarcinomi [10]. Kako se odvija proliferacija polipa, njihova veličina se menja, dok se genetske i epigenetske promene tokom vremena akumuliraju, što je reflektovano citološkom i histološkom displazijom (slika 3) [2]. U "klasičnom" modelu razvoja CRC, većina karcinoma nastaje iz polipa poreklom iz izmenjenih ćelija kripte koje sledstveno evoluiraju u rane adenome (<1 cm u veličini, sa histološkim prisustvom tubula ili tubulovila). Ovi adenomi dalje progrediraju do uznapredovalog adenoma (veličine >1cm, sa histološkim prisustvom vila), pre konačnog razvoja u CRC [4]. Ukoliko maligno izmenjene ćelije prodru kroz muskularni mukozni sloj u submukozu, potvrđuje se razvoj invazivnog karcinoma [11]. Sama lamina proprija ima ograničenu mrežu limfnih i krvnih sudova, te invazija lamine proprije ne nosi sa sobom rizik za pojavu metastaza. Međutim kada neoplazma prodre u submukozu, ona dospeva u region bogat limfnim i krvnim sudovima, te rizik za metastaziranje postaje realna klinička pretnja [11]. U slučaju da se ovakvi tumori ne uklone, razvijaju sposobnost da invadiraju susedno tkivo i da rastu van zida kolona ili rektuma [2]. Pored uobičajenih adenoma i nazubljenih polipa, hiperplastični polipi, ravni adenomi, hamartomatozni i inflamatorni polipi takođe nose sa sobom određeni, ali značajno niži maligni potencijal [9].



Slika 3. Razvoj CRC i skrining metoda. A) Histološke promene u CRC; B) stečene genetske promene u CRC; C) skrining testovi u CRC. Vremenski tok razvoja CRC je prikazan sleva udesno

Preuzeto iz: Simon K. Colorectal cancer development and advances in screening. Clinical interventions in aging. 2016; 11:967.

U dijagnostičke i prognostičke svrhe je razvijeno više klasifikacionih sistema za CRC. Klasifikacija po Djuku (*Dukes staging classification*) predstavlja anatomske tipove klasifikacije, koji se primarno zasniva na stepenu tumorske infiltracije u zid creva i prisustvu, ili odsustvu metastaza u limfnim čvorovima. Tako su slučajevi kod kojih je karcinom bio ograničen na epitel kolona ili rektuma klasifikovani kao A stadijum, oni kod kojih se kancer proširio na dublje slojeve zida creva (*tunica muscularis*) su predstavljali B stadijum, dok su slučajevi kod kojih su postojale metastaze u regionalnim limfnim čvorovima klasifikovani kao C stadijum bolesti [12].

Tokom godina je ova klasifikacija modifikovana, te je uključila uvođenje C1 i C2 stadijuma, te dodatak stadijuma D klasifikaciji koji je upućivao na prisustvo bolesti sa metastazama na jetri, plućima, kostima i drugim organima [13]. Astler Koler (*Astler-Coller*) klasifikacija predstavlja savremeniju verziju klasifikacije po Djuku. Zapravo, izvršena je podklasifikacija B i C stadijuma u B1 i B2, te C1 i C2 [14]. B1 stadijum označava lezije koje su zahvatile mišićni sloj, ali ne prolaze kroz njega, dok je B2 specifičan za tumor koji prolazi i mišićni sloj. C stadijumi su bili definisani kao zahvaćenost limfnih čvorova i predstavljali su dodatak B1, B2 klasifikaciji [14]. Na kraju je formiran TNM (*Tumor-Node-Metastasis*) klasifikacioni sistem koji je postao jedan od najšire korišćenih sistema za klasifikaciju CRC i većine gastrointestinalnih karcinoma [14]. U TNM sistemu, T reflektuje dubinu zida creva koja je infiltrirana primarnim tumorom, N se odnosi na regionalne limfne čvorove, dok se oznaka M odnosi na prisustvo udaljenih metastaza [14]. U ovom sistemu takođe postoje nivoi podklasifikacije: T0 (bez dokaza o primarnom tumoru), Tis (karcinom *in situ*, ili mukozni karcinom), T1 (invazija tumora u submukozu), T2 (mišićni sloj invadiran tumorom), T3 (subserozni sloj invadiran, bez učešća organa) T4 (visceralni peritoneum perforiran tumorom "T4a", ili invadirani susedni organi "T4b") [14]. Sa druge strane, N stadijum obuhvata N0 (bez učešća limfnih čvorova), N1 (zahvaćenost jednog regionalnog limfnog čvora "N1a", ili zahvaćenost 2-3 limfna čvora "N1b") i N2 (zahvaćenost 4-6 limfnih čvorova "N2a", ili 7 i više zahvaćenih regionalnih limfnih čvorova "N2b"). M klasifikacioni sistem podrazumeva M0 stadijum, gde nije detektovano udaljeno širenje tumora i M1 koji ukazuje na prisustvo udaljenih metastaza [14]. TNM sistem klasifikacije se smatra posebno uspešnim, jer je njime načinjen pokušaj da se istovremeno obuhvate klinički i patohistološki podaci, što je od velikog značaja za izbor adekvatne terapijske procedure, kao i za prognozu toka i ishoda bolesti [13].

Osim definisanja stadijuma, za dijagnozu i tretman CRC značajno je pravilno klasifikovati gradus tumora. U ovom smislu se razlikuju tri nivoa: niži gradus se odnosi na tip tumora kod kojeg su ćelije dobro diferencirane, sa dobro oformljenim tubulima i najmanje nuklearnih polimorfizama i mitozama. Ove ćelije nisu tipične, ali izgledaju i organizovane su kao i normalne ćelije. Karcinomi niskog gradusa imaju tendenciju da rastu sporije i manja je verovatnoća diseminacije [15].

Kod karcinoma visokog gradusa maligne ćelije su slabo diferencirane ili nediferencirane. Ove ćelije ne izgledaju kao normalne i drugačije su organizovane, sa povremenim žlezdastim strukturama, pleomorfizmom i veoma učestalim mitozama [15]. Karcinomi višeg gradusa imaju tendenciju da rastu

brže i da se značajno brže šire. Između ova dva stepena se nalazi i srednji gradus koji je karakterističan za srednje diferenciran tumor.

1.1.3 Faktori rizika za razvoj CRC

Mnogi faktori rizika se mogu smatrati značajnim za razvoj CRC, uključujući nepromenljive genetske faktore i promenljive, faktore sredine [16]. Neki od predloženih modela za predikciju rizika za razvoj CRC uključuju porodičnu istoriju, gene u vezi sa povećanim rizikom za razvoj karcinoma, faktore okoline kao i životni stil pojedinca [17]. Poznavanje uticaja ovih faktora na razvoj bolesti je važno kako bi se kontrolisalo opterećenje bolešću, sprovođenjem populacionih preventivnih inicijativa [16]. Praksa je takođe pokazala da postoji pojačana potreba za stratifikacijom rizika i personalizovanim pristupom pacijentu [18]. Prema tome, razvoj novih terapijskih i dijagnostičkih strategija zahteva dobro poznavanje etioloških odlika CRC.

1.1.3.1 Nasledni faktori rizika

Statističke procene pokazuju da rizik za nastanak CRC tokom života osobe koja živi tipičnim “zapadnim stilom” iznosi 3-5%, ali je značajno istaći da se ovaj rizik udvostručava kod osoba sa srodnicima u prvom stepenu kod kojih je dijagnoza postavljena između 50-70. godine života, ili se čak utrostručuje ukoliko je bolest kod srodnika nastupila pre 50. godine [4]. Može se reći da je pozitivna porodična anamneza značajna u 25% pacijenata sa CRC, dok se kod preostalih 75% razvija sporadična forma bolesti [15]. Prema tome, manji procenat slučajeva CRC se vezuje za naslednu predispoziciju, bez obzira što bolest generalno ima izraženu naslednu komponentu. Posebno značajne genske forme bolesti predstavljaju nasledni nepolipozni kolorektalni karcinom (*hereditary nonpolyposis colorectal cancer*, HNPCC), Lynch-ov sindrom, familijarna adenomatozna polipoza (FAP), MYH (*MUTYH*, mut Y homolog) udružena polipoza (MAP), Peutz-Jegersov sindrom (PJS) i juvenilna polipoza [15,19].

Lynch-ov sindrom (jedna od formi HNPCC) predstavlja skup međusobno povezanih karakteristika koje se javljaju u ranoj životnoj dobi, sa autozomno dominantnim tipom nasleđivanja, većom sklonošću ka razvoju promena na desnom kolonu i 80% rizika za razvoj CRC [19]. Interval između skrininga osoba sa povećanim rizikom od HNPCC bi trebalo da bude kraći u odnosu na opštu populaciju, s obzirom da karcinom može da se razvije u periodu od 42 meseca od rutinskog pregleda. Klinički skrining bi trebalo da uključuje kolonoskopiju na svake dve godine, s početkom između 20-25. godine i jednom godišnje nakon 40. godine starosti [20].

FAP se takođe nasleđuje autozomno dominantno i nastaje kao posledica mutacija u *adenomatous polyposis coli* (*APC*) genu [21]. Smatra se da formiranje polipa počinje još u periodu detinjstva i rane adolescencije [21]. Kako se na stotine polipa razvija tako rano, procenjuje se da FAP nosi 100% rizika za razvoj CRC [20]. U proseku CRC se kod ovih pojedinaca razvija oko 39. godine života [22]. Karakteristično je i da je stepen polipoze kolona u tesnoj vezi sa mestom mutacije u *APC* genu [22].

Dodatno, pokazano je da ovi pacijenti imaju povećan rizik za razvoj drugih formi karcinoma, pre svega želuca i tankog creva [22].

MAP predstavlja specifičnu mutaciju *MYH* gena koja dovodi do razvoja bolesti u uzrastu od 20-50 godina starosti [21]. *Missense* ili *nonsense* mutacije *MYH* gena su povezane sa multiplim kolorektalnim adenomatoznim polipima [19]. Bolest prati autozomno-recesivni obrazac nasleđivanja [21]. Dve najčešće mutacije su Y165C i G382D, kojima pripada preko 80% svih uočenih mutacija [19]. Kao klinički dijagnostički kriterijum se koristi genetsko testiranje, posebno kod osoba koje imaju više od 10 adenomatoznih promena, ali bez identifikovanih mutacija u *APC* genu [22].

PJS, sa druge strane, predstavlja najčešći uzročnik hamartomatoznih polipa koji nisu karcinogeni, ali mogu da se razviju u karcinome digestivnog trakta, karcinom dojke i CRC [21]. Jedina mutacija koja je do sada identifikovana u vezi sa za PJS se nalazi u genu za serin/treonin kinazu 11, odnosno *LKB1* genu [23].

Juvenilni polipozni sindrom takođe započinje sa hamartomatoznim polipima, ali se razlikuje od PJS po tome što u polipima dominira stroma, postoje cistični prostori i obiluje laminom proprijom kojoj nedostaje glatka mišićna struktura [21]. Kod porodica sa ovim sindromom identifikovana su dva gena čije izmene dovode do narušavanja signalne transdukcije transformišućeg faktora rasta β (TGF- β): *BMPRIA* i *SMAD4* [24]. Bolest se odlikuje ranom pojavom (još u periodu dojenja) i simptomima poput gastrointestinalnog krvarenja, invazivnosti, rektalnog prolapsa i enteropatije koja dovodi do gubitka proteina [24].

Genetski poremećaji koji najviše doprinose razvoju CRC su hromozomska nestabilnost (*chromosome instability*, CIN), mutacije u tumor supresorima i protoonkogenima, mikrosatelitska nestabilnost (*microsatellite instability*, MSI), kao i epigenetske promene poput hipermetilacije.

CIN se javlja u oko 65-70% slučajeva sporadičnog CRC [25]. CIN se uglavnom odnosi na ubrzano gubljenje celih ili velikih delova hromozoma [25]. U širem smislu se može smatrati strukturnim ili brojčanim poremećajem [21]. Brojčani CIN se dešava kao posledica poremećaja puteva uključenih u segregaciju hromozoma, njihovu transmisiju, regulaciju mitotičkih kontrolnih tačaka, te vezivanja kinetohora za mikrotubule [26]. Sa druge strane, strukturni CIN se najčešće vezuje za tzv. reaktivne hromozome, koji nakon inicijalnog razdvajanja ostaju povezani tzv. "prekid-fuzija mostom" (*breakage-fusion-bridge*), te dolazi do neželjenih genetskih rearanžmana [21]. CIN se dovodi u vezu sa promenama na genima značajnim za razvoj CRC poput *APC*, *KRAS*, *PI3K* i *TP53* [27].

APC gen je poznati tumor supresor. Promene u ćelijskim nivoima produkta *APC* gena se nalaze u osnovi većine kolorektalnih adenokarcinoma. Ovaj protein je posebno značajan zbog interakcije sa β -kateninom koji predstavlja komponentu Wnt signalnog puta. U slučaju stimulacije Wnt- β -katenin signalne kaskade aktivira se transkripcija gena poput *Ciklin D1*, *MYC*, *EphrinB* i promoviše ćelijska proliferacija. Mutacije na nivou *APC* gena dovode do stvaranja nefunkcionalnog proteina, što rezultuje

nemogućnošću inaktivacije β -katenina sa posledičnim uticajem na ćelijsku adheziju, ćelijsku migraciju i citoskelet [26].

KRAS predstavlja onkogen odgovoran za sintezu istoimenog proteina regulisanog tirozin-kinaza receptorom koji aktivira signalni put mitogenom aktivirane protein kinaze (*mitogen-activated protein kinase*, *MAPK*), te je uključen u ćelijsko preživljavanje i vodi ka snažnoj promociji ćelijskog rasta i proliferacije. Pokazano je da mutacije u *KRAS* genu povećavaju viabilnost ćelija karcinoma u nepovoljnim uslovima [28].

TP53 mutacije su identifikovane u preko 50% slučajeva CRC. Mutacije su uglavnom lokalizovane na egzonima 5-8. Produkt *TP53* tumor-supresor gena, p53, je transkripcioni aktivator specifičnih sekvenci koji ima brojne uloge u regulaciji ćelijskog ciklusa i apoptozi. Inaktivirajuće mutacije u *TP53* predstavljaju kasni događaj tokom tranzicije adenoma u karcinom [29].

Ispitivanje MSI najčešće predstavlja skrining tehniku za procenu Lynchovog sindroma, nastalog usled poremećaja u reparacionim mehanizmima dezoksiribonukleinske kiseline (DNK), (*DNA mismatch repair system*, *MMR*) [21]. Mikrosateliti su normalni segmenti DNK sa ponavljajućim nukleotidima [21]. Promene u broju ponavljajućih nukleotida (inercije i delecije nukleotida) zapravo predstavljaju glavnu odliku mikrosatelitske nestabilnosti [30]. Upravo te ponavljajuće sekvence su ono što čini DNK osetljivom na greške tokom replikacije [30]. Somatska inaktivacija *MMR* gena je nađena u oko 15% sporadičnih slučajeva CRC [30]. Mnogi geni podležu mikrosatelitskoj nestabilnosti, uključujući one odgovorne za sintezu proteina značajnih za reparaciju DNK (*RAD50*, *MSH2*, *MSH3*, *MSH6*, *MLH1*, *BLM*, *PMS2*), apoptozu (*APAF1*, *BAX*, *BCL10*, *Caspase-5*), prenos signala (*TGF β RII*, *ACTRII*, *IGFIIR*, *WISP-3*), kontrolu ćelijskog ciklusa (*PTEN*, *RIZ*) i transkripcione faktore (*TCF-4*) [21]. Inaktivacija oba alela, *MSH2* ili *MLH1*, kao najznačajnijih za razvoj fenotipa sa visokom mikrosatelitskom nestabilnošću se dešava na više načina [29]. Jedan od njih je *gubitak heterozigotnosti* koji je obično udružen sa tačkastim mutacijama u *MSH2* ili *MLH1* genu, dok je drugi vezan za epigenetske promene, posebno kada je u pitanju *MLH1* gen koji može biti utišan hipermetilacijom CpG ostrvaca u promotoru [29].

Epigenetske izmene se dešavaju u polipima i u sadejstvu sa genskim mutacijama povećavaju mogućnost progresije polipa u karcinom [4]. Metilacija DNK zahvata regione bogate CG parovima (CpG ostrvca), koji su obično lokalizovani u 5' regionu gena i može rezultovati utišavanjem gena, bilo posrednim uticajem na vezivanje transkripcionih faktora, ili kroz promene u strukturi hromatina [4]. U ćelijama karcinoma, CpG ostrvca u različitim tumor-supresor genima su visoko metilovana, što rezultuje represijom njihove transkripcije [21].

Zahvaljujući “*genome wide association*” (GWAS) studijama izvršena je identifikacija 25 lokusa povezanih sa rizikom za razvoj CRC [31]. Ove varijante su se uglavnom nalazile u okviru ili neposrednoj blizini gena vezanih za reparaciju DNK, TGF- β ili MYC signalizaciju [31]. Naime, novija studija na evropskoj populaciji je pokazala povezanost 79 polimorfizama pojedinačnih nukleotida (*single*

nucleotide polymorphism; SNP) sa rizikom za nastanak CRC [32]. Generalno se smatra da prisustvo više rizičnih SNP varijanti doprinosi genetskoj osnovi za razvoj CRC, no sa relativno niskim učešćem od 5 do 10%, što ostavlja prostora za razvoj istraživanja u ovom smeru [31]. U sklopu ovakvih istraživanja treba istaći i značaj interakcija među samim genima, kao i interakcija gena sa faktorima spoljašnje sredine [33, 34]. Prema tome, dalja ispitivanja SNP koji bi mogli biti povezani sa razvojem CRC svakako pružaju dodatni doprinos rasvetljavanju, inače komplikovane, genetske osnove CRC.

1.1.3.2 Egzogeni faktori rizika

Danas je poznato da životne navike pojedinca značajno modifikuju rizik za nastanak malignih bolesti, uključujući CRC. Studije su pokazale da osobe koje praktikuju redovnu fizičku aktivnost imaju za 25% manje šanse za razvoj CRC [10]. Nasuprot tome, sedentarni stil života povećava rizik za čak 50% [10]. Pokazano je da porast u indeksu telesne mase (ITM) za jednu jedinicu uvećava šanse za razvoj CRC za 2-3% [4]. Jedan od značajnijih faktora rizika za razvoj ove vrste karcinoma je način ishrane, s obzirom da je tesno povezan kako sa gojaznošću, tako i sa pojavom dislipidemije. Osim toga, određene dijetarne navike mogu da promovišu intestinalnu inflamaciju, modifikuju intestinalnu mikrofloru, podstiču imuni odgovor, te na taj način da pospeše rast polipa i njihovu konverziju u karcinom [10]. Adipozno tkivo osoba sa prekomernom težinom je sklono ka povećanom oslobađanju različitih citokina (leptina, rezistina, faktora nekroze tumora alfa (TNF- α), interleukina 1 (IL-1), IL-6, IL-7 i IL-8), koji ostvaruju mitogene efekte na epitelne ćelije, inhibiraju apoptozu, promovišu oksidativni stres, suprimiraju imuni odgovor i remete fiziološku funkciju insulinu sličnog faktora rasta 1 (IGF1) [16]. Navedene činjenice govore u prilog hipotezi o povezanosti disfunkcije adipoznog tkiva i nastanka i progresije CRC [16]. Dodatno je pokazano da rizik za razvoj CRC može da poraste za 17% za svakih 100 g unesenog crvenog mesa, odnosno za 18% kada je u pitanju 50 g obrađenog mesa. Smatra se da su heterociklični amini, policiklični aromatični ugljovodonici i N-nitroso jedinjenja, koja mogu nastati tokom obrade mesa na visokim temperaturama i otvorenoj vatri, odgovorni za potencijalne prokancerogene efekte crvenog mesa [16]. Nasuprot tome, ishrana obogaćena kalcijumom, vlaknima, vitaminom D, kao i voćem i povrćem deluje protektivno i smanjuje incidencu pojave CRC [10, 16].

Jedan od faktora rizika za razvoj CRC je i duvanski dim. U prilog tome govori studija koja je pokazala vezu između pušenja 20 ili više cigareta dnevno i dvostrukog rizika za MSI+ tumore u odnosu na nepušače [35]. Više istraživanja je, pored MSI, pušenje povezalo i sa većim rizikom za razvoj metilacionog fenotipa CpG ostrvaca i *BRAF* mutacija, kao i *KRAS*- *wild* tipa CRC [36]. Dodatno čvrsti dokazi se mogu naći i kada je u pitanju veza između CRC i konzumiranja alkoholnih pića. U poređenju sa osobama koje ne konzumiraju, ili povremenom konzumiraju alkoholna pića, umereno korišćenje alkohola (>1–4 piće po danu) je rezultovalo uvećanjem rizika za CRC za 21%, dok je kod učestale konzumacije alkohola (≥ 4 pića po danu) taj rizik bio uvećan za čak 52% [37].

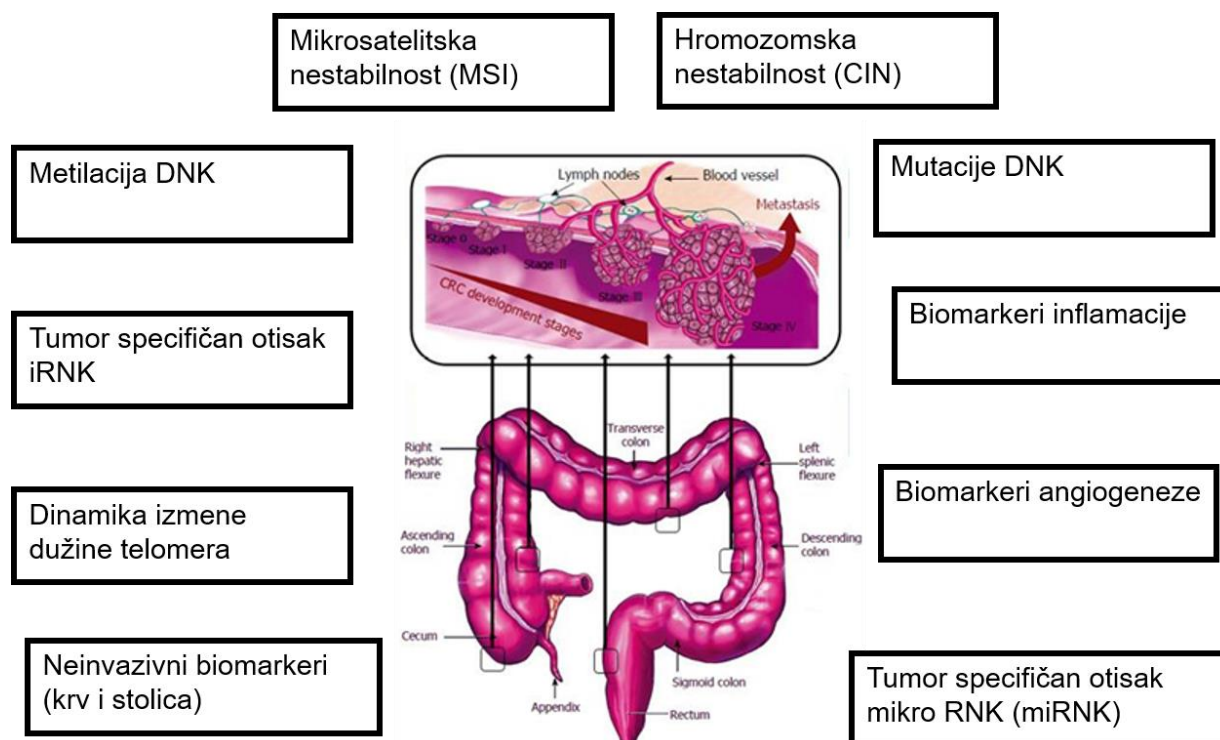
Shodno svemu navedenom, smatra se da se oko 16-71% slučajeva nastanka CRC može pripisati promenljivim faktorima rizika [4]. Težnja ka poboljšanju prevencije i tretmana multifaktorskih bolesti

poput CRC su dovele do razvoja novog polja medicine - molekularne patološke epidemiologije (MPE), koja se bavi izučavanjem korelacija spoljašnjih i unutrašnjih faktora rizika za nastanak bolesti, istovremeno procenjujući molekularne karakteristike tumora i njegove progresije [4]. I dok se na polju MPE pojavljuju nove poddiscipline kao što su: imuno-MPE, farmako-MPE, mikrobiom-MPE, posebno obećavajućom se smatra GWAS-MPE [38, 39]. U određenom smislu, prethodnicom GWAS-MPE se može smatrati ispitivanje gensko-genskih interakcija, kao i interakcija urođenih činilaca- polimorfnih varijanti gena i faktora okoline. Za evaluaciju spomenutih interakcija razvijen je softverski paket: program redukcije multidimenzionalnosti (*multidimensionality reduction program, MDR*) [40]. Gensko-genske interakcije, kao i interakcije gena i faktora spoljašnje sredine, se smatraju važnim činiocima patogeneze CRC, s obzirom da modifikuju podložnost pojedinca ka razvoju karcinoma. Stoga, ispitivanjem ovih interakcija se može kompletirati sveobuhvatna procena rizika za CRC.

1.1.4 Skrining i dijagnostika CRC

Kako stopa petogodišnjeg preživljavanja iznosi 90% za pacijente sa lokalizovanom bolešću, a samo 13,1% za pacijente sa metastazama, jasan je značaj skrininga i rane dijagnostike CRC [2]. Kolonoskopija sa polipektomijom predstavlja dijagnostički zlatni standard, pa samim tim i metodu izbora za smanjenje incidence CRC [20, 41]. Troškovi masovnog skrininga u većini zemalja još uvek nisu opravdani, s obzirom na cenu same kolonoskopije i neadekvatan obuhvat pacijenata ovim vidom dijagnostike [1]. Shodno tome, manje invazivni testovi poput gvajak testa i imunotestova iz stolice, imaju bolji odnos troškova i koristi za pacijenta, pogotovo kada su u pitanju zemlje u razvoju [1]. Studije su pokazale da redukcija mortaliteta izazvanog CRC primenom FOBT (*fecal occult blood test*) testa kao jedne od skrining metoda iznosi 16% [20]. Sa druge strane stopa lažno pozitivnih rezultata (*false discovery rate, FDR*) dobijena primenom FOBT je 80%, što je pre svega uzrokovano neadekvatnom pripremom pacijenata za test [20]. Nedovoljna specifičnost i osetljivost su karakteristične i za ostale skrining metode, poput imunotestova iz stolice, analize DNK dobijene iz intestinalnih ćelija nađenih u stolici, pojedinih *imaging* tehnika, pa čak i u slučaju serumskih biomarkera CEA i CA 19-9, koji su danas sastavni deo rutinske laboratorijske prakse [20, 42]. Ipak, sprovedene ankete govore u prilog tome da bi se ispitanici uvek radije opredelili za neinvazivne metode skrininga/dijagnostike [43]. Sama kolonoskopija može biti praćena komplikacijama poput krvarenja nakon uklanjanja polipa, perforacijama i kardiopulmonalnim poremećajima, što dodatno ističe potrebu za razvojem novih, neinvazivnih biomarkera [44].

Savremena multidisciplinarna istraživanja pokazuju da se klinička upotrebna vrednost biomarkera može povećati multimarkerskim pristupom dijagnostici i prognostici [45]. Multimarkerski pristup podrazumeva povezivanje niza parametara, koji su indikatori promena u različitim biohemijskim procesima značajnim za karcinogenezu, kao i sveobuhvatnu analizu svakog od selektovanih markera sa više različitih aspekata (genska ekspresija, plazmatska koncentracija, strukturna i funkcionalna svojstva). Pravilan izbor serije biomarkera se vrši oslanjajući se na njihovu srodnost, međusobnu povezanost, kao i na njihov značaj u toku aktivacije višestrukih mehanizama karcinogeneze. Genetski činioci, inflamatorni medijatori i pokazatelji narušenih metaboličkih procesa se izdvajaju u etiopatogenezi CRC [46], pa se može pretpostaviti da bi panel genetskih, inflamatornih i metaboličkih parametara mogao imati adekvatan prediktivni i dijagnostički potencijal. Novija istraživanja o višestepenom razvoju karcinoma ukazuju i na ulogu tumorske mikrookoline, odnosno imunih ćelija, kako u pogoršanju, tako i u regresiji bolesti [47]. Heterogenost poremećaja imunog sistema u sklopu patogeneze CRC predstavlja važno polje istraživanja s ciljem razvoja imunomodulatorne terapije i dijagnostičkih testova [47]. Shodno tome, pokazatelje izmenjenog imunog odgovora treba razmotriti kao potencijalne komponente u okviru multimarkerskog pristupa dijagnostici i prognostici [48]. Imajući u vidu karakteristike karcinoma, jasno je da bi multiparametarski pristup mogao postići značajno višu dijagnostičku i prognostičku efikasnost u odnosu na trenutno dostupne pojedinačne biomarkere. Klasteri biomarkera predloženih za skrining CRC su prikazani na slici 4.



Slika 4. Ćelijski i molekularni markeri povezani sa razvojem različitih formi CRC

Preuzeto uz adaptaciju iz: Aghagolzadeh P, Radpour R. New trends in molecular and cellular biomarker discovery for colorectal cancer. World J Gastroenterol 2016; 22(25): 5678-5693

1.2 Biohemijske odlike CRC

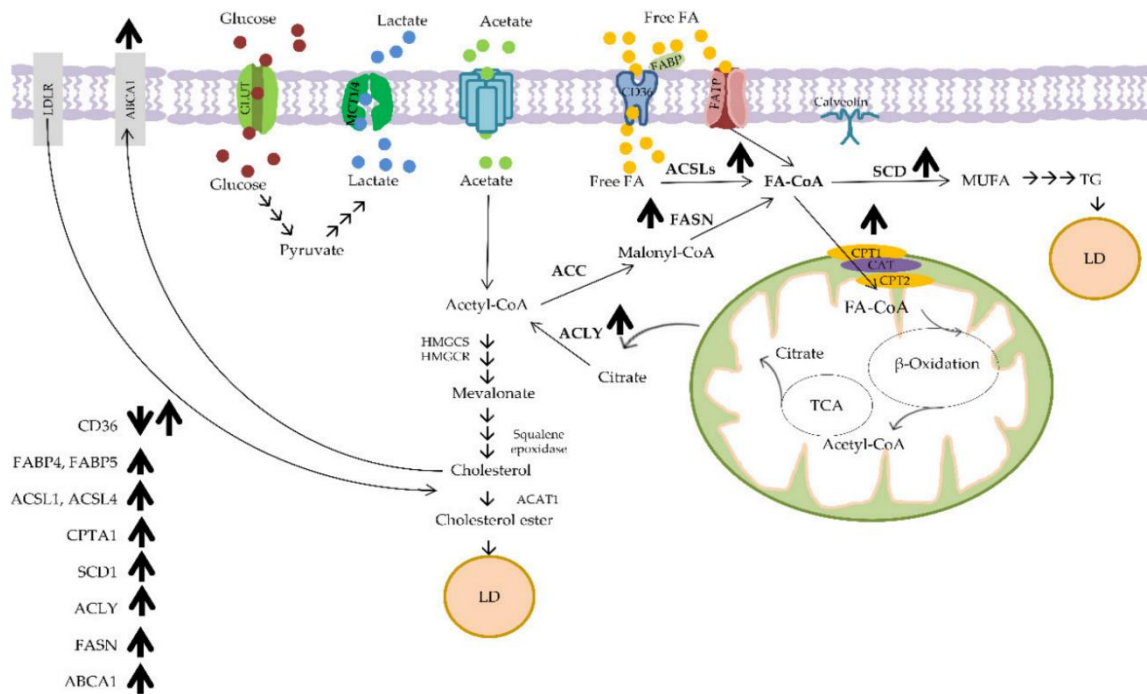
Kao što je poznato, viabilnost tumora zavisi od više biohemijskih karakteristika maligno izmenjenog tkiva. Za maligne bolesti je karakteristična deregulacija ćelijskih energetske izvora, kao i inflamacija posredovana tumorom. Smatra se da lučenje proinflammatory medijatora pospešuje oslobađanje faktora rasta tumora i faktora angiogeneze. Takođe, tipična karakteristika malignih tumora je izbegavanje imunog odgovora, odnosno imunosupresija u tumorskoj mikrookolini koja se postiže lučenjem citokina od strane malignih ćelija. Koristeći nestabilnosti u genomu i mutacije u DNK-reparacionim mehanizmima, tumor nishodno reguliše inhibitore različitih faktora rasta i njihovih receptora, te samim tim pospešuje sopstveni razvoj [4, 49]. Replikativnu besmrtnost dostiže inhibicijom mehanizama koji indukuju apoptozu, uz pojačanu aktivnost telomeraza, te tako tumor izbegava, kako apoptotske medijatore, tako i ostale vidove ćelijske smrti (nekrozu). Na kraju, treba navesti i remodelovanje ekstracelularnog matriksa, odnosno epitelno-mezenhimalnu tranziciju (EMT), koja tumoru omogućava invazivnost i povećava mogućnost razvoja metastaza [4, 49]. U slučaju CRC, poseban akcenat se može staviti na poremećaje imuniteta i inflamatornog odgovora, EMT, kao i na narušenu lipidnu homeostazu, inače blisko povezanu sa poremećajima redoks balansa.

1.2.1 Poremećaji energetskog metabolizma u CRC

1.2.1.1 Poremećaji metabolizma lipida

Danas je potvrđeno da mnogi od prethodno navedenih, kako naslednih, tako i promenljivih činilaca razvoja CRC, izazivaju poremećaje energetskog metabolizma [50]. Tokom procesa maligne transformacije, dešavaju se brojne metaboličke adaptacije, što kao odgovor na izmene u tumorskoj mikrookolini, što kao posledica povećanih bioenergetskih zahteva ćelija [50]. Pored poznatog Warburgovog efekta, odnosno hipoksičnih uslova u tumoru nastalih usled disproporcije između rasta tkiva i dostupnosti kiseonika, metabolički fenotip malignih ćelija CRC odlikuju još i pojačana glutaminoliza, povećana sinteza masnih kiselina, ali i holesterola (metabolizam lipida u CRC je prikazan na slici 5) [51]. Studije koje su analizirale koncentracije holesterola kod pacijenata sa CRC su dale oprečne rezultate. Dok su neke ukazivale na povišenu koncentraciju holesterola kao faktor rizika za razvoj maligniteta, ostale su isticale značaj sniženih koncentracija ovog analita kao markera subkliničkog razvoja tumora [52, 53]. Pojedina istraživanja su pokazala da egzogeni holesterol može da aktivira Hedgehog, fosfatidil-inozitol 3 kinaze (PI3K)/Akt i Wnt/ β -katenin signalne kaskade, tj. one kaskade koje su poznate po svojoj povezanosti sa ćelijskom diferencijacijom i proliferacijom [54]. Dodatno, smatra se da maligne ćelije, osim što koriste holesterol kao gradivnu komponentu ćelijske membrane, preko odgovarajućih metaboličkih puteva dovode i do stvaranja metabolita koji su neposredno uključeni u rast i metastaziranje tumora [55]. Zaključci su suprotstavljeni i kada se govori o povezanosti CRC sa nivoima triglicerida (TG) i holesterola sadržanog u lipoproteinima niske gustine (*low density lipoprotein*; LDL-h). Naime, grupa istraživača je ukazala na vezu između povišenih koncentracija LDL-h i progresije CRC putem povećane produkcije reaktivnih kiseoničnih vrsta (*reactive oxygen species, ROS*) [56]. Chenxi

Xie i sar. su takođe istakli značaj visokih koncentracija LDL-h i TG za predikciju pojave polipa [57], dok su, nasuprot tome, Hong i sar. [58] ukazali na obrnutu relaciju između koncentracija LDL-h i limfovaskularne invazije tumora. Ipak, ono što treba istaći, jeste da su u većini studija koncentracije holesterola sadržane u lipoproteinima visoke gustine (*high density lipoprotein cholesterol*; HDL-h) kod pacijenata sa CRC konzistentno snižene [59, 60]. Bez obzira na literaturnu neusaglašenost kada je u pitanju osnovni lipidni profil pacijenata sa CRC, skorašnja meta-analiza je pokazala da visoke koncentracije ukupnog holesterola (UH) i TG, zajedno sa niskim koncentracijama HDL-h, predstavljaju determinante povišenog rizika za razvoj CRC [60]. Takođe, Park i sar. su predložili *scoring* sistem za predikciju napredovanja neoplazmi CRC, koji je uključivao koncentracije TG i HDL-h [61]. Određivanje osnovnog lipidnog statusa se smatra i dalje osnovnim elementom procene rizika za razvoj CRC, no svakako bi bilo korisno ovim markerima pridodati parametre specifičnog lipidnog profilisanja, kako bi se dobio sveobuhvatniji, integrativni pristup koji bi uključio i funkcionalnost lipoproteinskih čestica.



Slika 5. Narušeni metabolizam lipida u CRC. Deregulisana aktivnost enzima koji učestvuju u lipogenezi i oksidaciji masnih kiselina je predstavljena sa ↑ što implicira ushodnu regulaciju, ↓ nishodnu regulaciju i sa ↓↑ što označava nishodnu regulaciju u ranim fazama karcinogeneze, odnosno ushodnu regulaciju u kasnijem metastatskom karcinomu.

Preuzeto iz: Nenkov M, Ma Y, Gaßler N, Chen Y. Metabolic Reprogramming of Colorectal Cancer Cells and the Microenvironment: Implication for Therapy. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021; 22:6262.

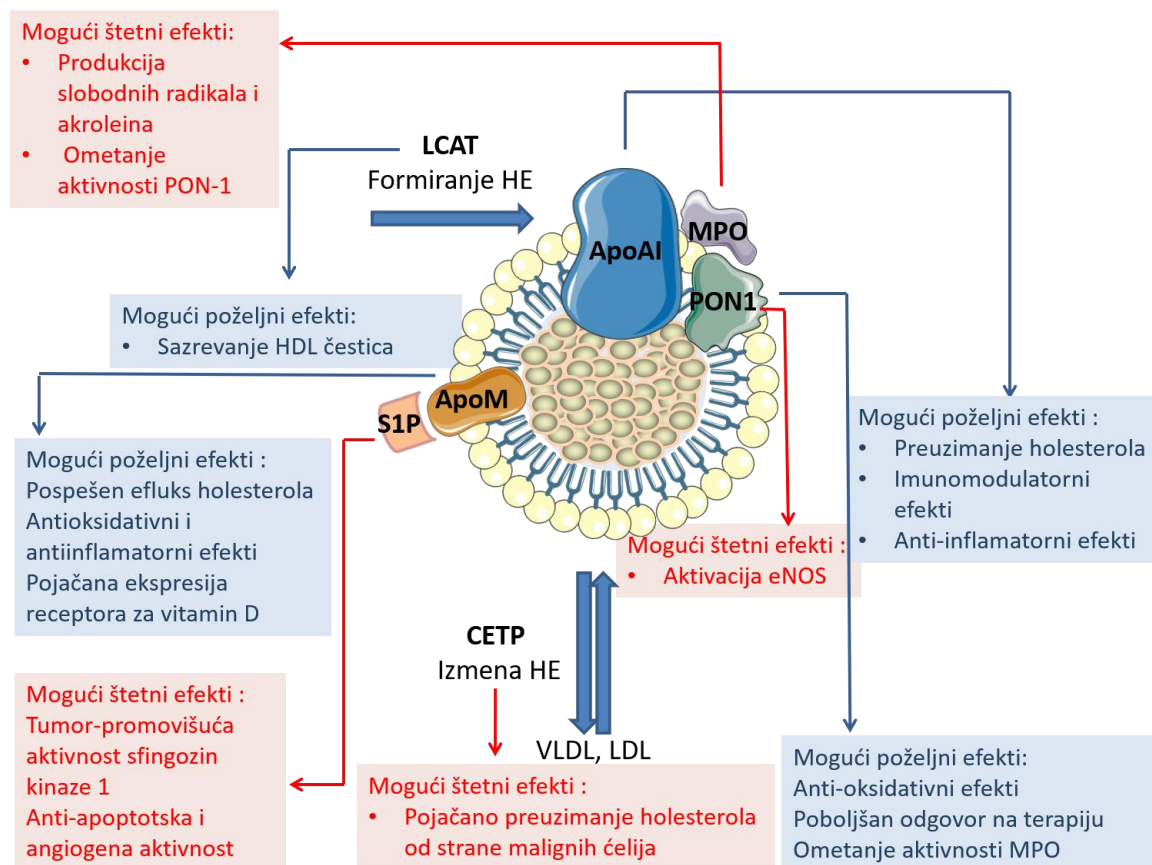
1.2.1.2 Značaj lipidoma. Specifično lipidno profilisanje HDL čestica i povezanost sa rizikom za razvoj CRC

Savremena istraživanja strukturnih i funkcionalnih svojstava lipida u humanom organizmu dovela su do uvođenja pojma lipidoma, koji u biomedicinskom kontekstu podrazumeva sveukupni lipidni status, enzime, receptore i pripadajuće signalne puteve, te zauzima važno mesto u regulaciji brojnih metaboličkih procesa, skladištenju energije, proliferaciji ćelija i programiranoj ćelijskoj smrti [62]. Istraživanjem lipidoma dobija se uvid u poremećaje inače delikatno regulisane ravnoteže lipida. Specifično lipidno profilisanje se može smatrati posebno značajnim kada se radi o HDL česticama, s obzirom da one predstavljaju glavnu komponentu reverznog transporta holesterola (RTH) [63]. Dva enzima uključena u RTH su primarno odgovorna za proces sazrevanja i funkcionalnost HDL čestica [64, 65]. Do sazrevanja HDL dolazi tako što nascentna, diskoidna čestica preuzima slobodan holesterol iz ekstrahepatičnih ćelija [63]. Prvi korak u ovom procesu jeste sinteza glavne proteinske komponente HDL, apolipoproteina A1 (ApoA1), u jetri i intestinumu i njegov prelazak u plazmu. Preuzimanje lipidnog sadržaja se dešava interakcijom sa ATP-vezujućim kasetnim transporterom A1 (*ATP-binding cassette transporter A1*, ABCA1), pri čemu dolazi do formiranja nascentne diskoidalne HDL čestice [63]. Takođe, HDL može da preuzme holesterol preko interakcije sa ATP-vezujućim kasetnim transporterom klase G1 (*ATP-binding cassette transporter G1*, ABCG1) [63]. U sledećem koraku se slobodan holesterol esterifikuje lecitin-holesterol aciltransferazom (LCAT) [64], te sledstvenim pakovanjem estara holesterola u jezgro, HDL čestica počinje da poprima sferičan oblik. Zrele HDL čestice, pomoću holesterol-estar transfernog protein (CETP) dalje učestvuju u bidirekcionoj razmeni estara holesterola za TG sa LDL i drugih lipoproteina bogatih TG [65]. HDL na taj način ostvaruje svoju antiaterogenu ulogu.

Prema meta analizama randomizovanih kontrolisanih studija, porast u koncentraciji HDL-h za 10mg/dL redukuje rizik za pojavu karcinoma za 36% [66]. Studije su ukazale i na činjenicu da pacijenti sa razvijenijom, agresivnijom i slabo diferenciranom formom gastrointestinalnog tumora, tumora kolona i rektuma (gradusi III i IV) imaju niže koncentracije HDL-h u odnosu na pacijente sa nerazvijenim, srednje diferenciranim karcinomom [67]. Zhang i sar. [68] su takođe ukazali na povišene koncentracije HDL-h u kancerogenom tkivu, u odnosu na parakancerogeno tkivo pacijenata sa CRC, dok su u studiji Healy i sar. [69], serumske koncentracije HDL-h bile značajno povezane sa uznapredovalom bolešću, odnosno sa metastazama na limfnim čvorovima. Niske preoperativne koncentracije HDL-h su uočene kod pacijenata sa II i III stadijumom CRC, te su bile u vezi sa lošijom stopom preživljavanja [70]. Dodatno, grupa autora [71] je pokazala značajnu vezu između visokog odnosa UH/HDL-h sa prisustvom *KRAS* mutacija u slučaju rektosigmoidnog karcinoma, tako da je HDL-h predložen i kao prediktor odgovora na terapiju. Sumirano, svi ovi podaci ukazuju na značaj ispitivanja strukturnih i funkcionalnih svojstava HDL u CRC.

1.2.1.3 HDL čestica kao učesnik energetskeg metabolizma, inflamatornog i imunog odgovora i regulacije redoks balansa

Pojam funkcionalnost HDL se odnosi na sposobnost ovih čestica da vrše određene funkcije u energetskeg metabolizmu, imunom i inflamatornom odgovoru, da učestvuju u održavanju redoks ravnoteže, endotelne homeostaze i ostvarivanju različitih ćelijskih funkcija (slika 6) [72]. HDL je najkompleksniji lipoprotein, budući da u njegov sastav ulazi preko 100 različitih proteina, kao i različite lipidne komponente, te su njegove uloge u organizmu mnogobrojne [73]. Naime studije su ukazale na imunomodulatorna i anti-inflamatorna svojstva ApoA1, kao najzastupljenije proteinske komponente HDL [74]. Dodatno, pokazano je da koncentracije HDL-h koreliraju sa imunim markerima poput CD3 i CD8 u malignom tkivu kod pacijenata sa CRC, što navodi na pretpostavku da su nivoi ApoA1, zajedno sa HDL-h povezani sa povećanom regrutacijom T ćelija i sledstvenim antitumorskim imunim odgovorom [70]. S druge strane je pokazano da ovaj lipoprotein sprečava konverziju makrofaga u proinflamatorni M1 fenotip, na taj način ublažavajući proinflamatorni milje koji je tipičan za aterosklerozu, ali i za karcinom [75]. Dodatno, istaknuta je i uloga enzima povezanih sa HDL česticama, a pre svega paraoksonaze 1 (PON-1) i mijeloperoksidaze, u održavanju redoks balansa u CRC [76, 77]. Zapravo, opservaciona studija je pokazala da QQ i LL fenotipovi, u okviru Q192R i L55M polimorfizama PON-1, imaju veću prevalencu među pacijentima sa razvijenim karcinomom [78]. Ovo nadalje implicira značaj genetskih varijanti PON-1 za razvoj CRC, odnosno ističe značaj naslednih karakteristika u vezi sa kvalitetom i kvantitetom HDL čestica kod pacijenata sa CRC. Prema tome, može se slobodno reći da uloga HDL u CRC prevazilazi RTH.



Slika 6. Konsistuenti funkcionalnosti HDL i njihova pretpostavljena uloga u razvoju CRC. apoM-apolipoprotein M; HE-holesterol estri; eNOS-endotelna azot-monoksid sintaza, MPO-mijeloperoksidaza; PON-1-paraoksonaza 1; Sphk1-sfingozin kinaza 1; VLDL-lipoproteini veoma niske gustine (*very low density lipoprotein*)

1.2.1.4 Povezanost dislipidemije i poremećaja prooksidativno-antioksidativnog balansa u CRC

Nepovoljan lipidni status je često udružen sa neravnotežom u odnosu prooksidanasa i antioksidanasa. ROS i reaktivne azotne vrste, poput hidrogen peroksida, hidroksilnog radikala, superoksidnog anjona i peroksintrita, predstavljaju produkte nepotpune redukcije kiseonika kao nuspojave normalnog energetskeg metabolizma [79]. Izvori oksidativnog stresa mogu biti endogeni, poput mitohondrija, citohroma P450, peroksidoma, ili aktivacije inflamatornog odgovora, ali mogu biti i egzogenog porekla [79]. Poznato je da reaktivne vrste kiseonika uzrokuju oštećenja ćelijskih membrana, oštećenje DNK i peroksidaciju lipida [80, 81], što rezultira uvećanim rizikom za pojavu malignih bolesti [82, 83]. ROS su povezivane i sa MSI u CRC, kao i sa epigenetskim modifikacijama [79]. Glavna intracelularna oštećenja DNK uzorkovana ROS su jedno- ili dvolančani prekidi, kao i inače učestale genetske mutacije u CRC: *TP53*, *KRAS*, *APC*, *BRAF* [84]. Ranije objavljena studija je ukazala na povišen nivo markera oksidativnog stresa kod pacijenata sa CRC. Povišeni nivoi karbonilnih proteina,

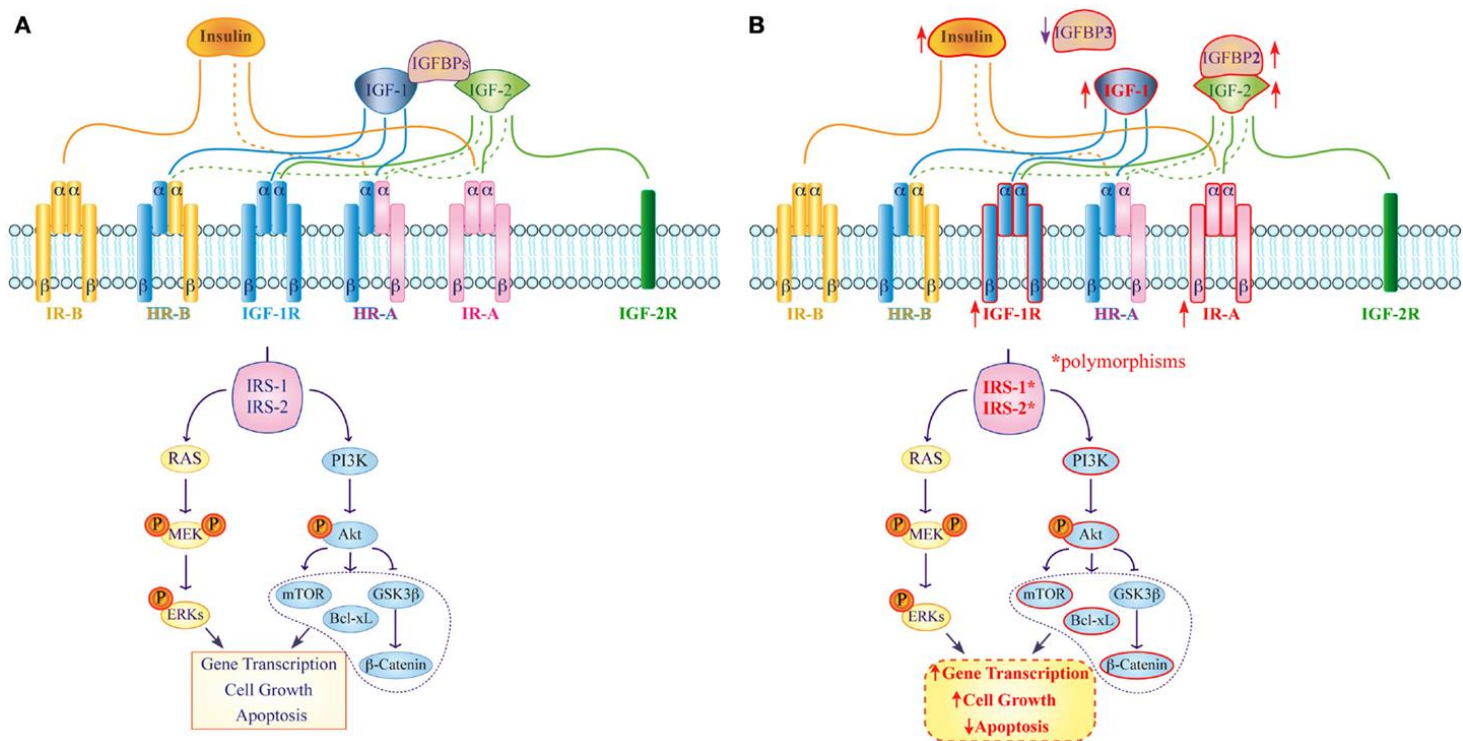
uznapredovalih proizvoda oksidacije proteina i serumskog 8-hidroksideoksiguanozina su uočeni kod pacijenata sa CRC, dok je aktivnost antioksidativnih enzima superoksid dizmutaze, katalaze i glutation peroksidaze bila snižena, baš kao i koncentracija vitamina C i vitamina E [85]. Iako su do sada brojni molekuli bili predloženi kao markeri povišenog oksidativnog stresa i oslabljene antioksidativne zaštite, istovremeno merenje svih prooksidanasa i antioksidanasa u sklopu prooksidativnog/antioksidativnog balansa (PAB) bi moglo pružiti kompletniju informaciju o redoks statusu pojedinca [86], te bi ovaj parametar bio koristan u cilju procene rizika za nastanak CRC.

Antioksidativni odbrambeni sistem sadrži mnoštvo različitih jedinjenja, uključujući i HDL čestice. HDL je jedinstven među lipoproteinima jer sadrži više molekula uključenih u antioksidativnu zaštitu, dok se glavnim nosiocem njegovog antioksidativnog potencijala smatra enzim PON-1 [87]. Enzim PON-1 je klasifikovan kao laktonaza, s obzirom da lipofilni laktoni predstavljaju njegov primarni supstrat [88]. Dodatno, PON-1 svojom esteraznom aktivnošću degradira organofosfatne ksenobiotike poput paraoksona, fenilacetata i nervnih agenasa [88]. Antioksidativna svojstva HDL se ostvaruju preko PON-1 posredovane inaktivacije oksidovanih holesterol estara i fosfolipida, poput holesteril-linoleat hidroperoksida, lipoproteinskih peroksida i hidroperoksida linolne kiseline [89]. Zapravo laktonazna katalitička aktivnost je ono što omogućava PON-1 da degradira lipidne peroksidge u ćeliji i cirkulišućim lipoproteinima [88]. Prema tome, HDL posredno preko PON-1 učestvuje u održavanju redoks ravnoteže, te inhibiranjem oksidacije LDL čestica, ovaj lipoprotein na još jedan način ostvaruje svoje antiaterosklerotske efekte. Pokazano je da izmenjeni sastav HDL čestica i nivo HDL-h utiču na aktivnost PON-1 u bolestima povezanim sa aterosklerozom [87], te je poželjno ispitati uticaj ovih promena i u CRC.

1.2.1.5 Metabolički efekti IGF1

U sklopu ispitivanja metaboličkih poremećaja kod CRC, insulin kao i IGF1, predstavljaju nezaobilazne komponente. IGF1 je mali peptid koji se sastoji od 70 aminokiselina, sa dva lanca - A i B povezana disulfidnim vezama i C peptidom sačinjenim od 12 aminokiselina [90]. Poznato je da insulin i IGF1 osa ostvaruju komplementarne i važne efekte na rast i metabolizam ćelije [91]. Više od 90% cirkulišućeg IGF1 se nalazi u kompleksu sa proteinom koji vezuje insulinu sličan faktor rasta 3 (*insulin-like growth factor binding protein*, IGFBP-3), dok se aktivnom formom smatra samo slobodan peptid [91]. Prema tome biološka aktivnost IGF1 je određena njegovom lokalnom produkcijom, ali i produkcijom IGFBP-3 i IGFBP-3 proteaze koja inače reguliše dostupnost vezujućeg proteina [91]. Za IGFBP-3 postoje indicije da pored vezivanja IGF1, direktno ispoljava i antiproliferativne i pro-apoptotske efekte [92, 93]. Funkcionisanje IGF1 ose u zdravim i maligno izmenjenim ćelijama je prikazano na slici 7. IGF1 se prevashodno vezuje za IGF1 receptor (IGF1R), heterotetramer koji se sastoji od dve ekstracelularne α subjedinice i dve transmembranske β subjedinice [90]. Vezivanjem za IGF1R, IGF1 indukuje autofosforilaciju samog receptora i fosforilaciju signalnih proteina što vodi ka aktivaciji Akt, PI3K, MAPK i β -katenin signalnih puteva koji dalje promoviraju proliferaciju, preživljavanje i migraciju ćelija [94]. Osa IGF1-odgovarajući receptor, aktivacijom PI3K i kinaze regulisane ekstracelularnom

signalizacijom (ERK), pokreće ključne konstituente razvoja i progresije CRC, koji su tesno povezani i sa “*epidermal growth factor receptor*”, EGFR signalizacijom [95], te i otpornošću na anti-EGFR terapiju. Povezanost IGF1, kako sa razvojem CRC, tako i drugih malignih oboljenja je odavno istaknuta. Najpre su studije na životinjskim modelima pružile uvid u doprinos hormona rasta i IGF1 malignim transformacijama ćelije [96]. Preliminarni podaci su takođe pokazali da IGF1 u sprezi sa IGF1R, promovira rast i malignu transformaciju adenomatoznih polipa [97]. Naime, studija koja je ispitivala vezu između ushodne ekspresije IGF1R, aktivacije Akt i ushodne regulacije antiapoptotskog proteina Bcl-xL je dokazala da je IGF1R/Akt/Bcl-xL signalna osa uzročnik razvoja agresivnijeg tipa CRC [98]. U eksperimentima na ćelijskim linijama karcinoma kolona je pokazano da IGF1 pojačava produkciju vaskularnog endotelnog faktora rasta, koji kao važan angiogeni činilac dalje pospešuje rast maligniteta [99]. Sa druge strane, članovi p53 familije (p63 i p73) kontrolišu proliferaciju ćelija kolona posredstvom nishodne regulacije IGF1R [100]. Sve ovo ukazuje na kompleksnost interakcija spomenutih činilaca IGF1 ose tokom razvoja CRC. Značajno je istaći i gojaznost kao još jednu važnu sponu između IGF1 i CRC, imajući na umu da povećana telesna težina predstavlja faktor rizika za razvoj karcinoma [101], pri čemu još utiče i na nivoe ovog peptida [102, 103]. Nasuprot dokazima koje su pružile osnovne studije, klinički podaci u vezi sa koncentracijama IGF1 kod pacijenata sa CRC su nekonzistentni. Dok je nekoliko studija ukazalo na povišene nivoe IGF1 u CRC [104, 105], ostali autori su izveli suprotne zaključke [106, 107], te je vezu između CRC i IGF1 potrebno detaljnije ispitati. Svemu ovome treba pridodati i značaj genskih alteracija IGF1. Polimorfne varijante *IGF1* gena rs2946834 bi se mogle smatrati značajnim, s obzirom na lokaciju polimorfizma u 3' netranslatornom regionu i shodno tome njegovom uticaju na stabilnost informacione ribonukleinske kiseline (iRNK) [108, 109]. Dokazana je povezanost ovog polimorfizma sa promenama u koncentraciji IGF1, dok je njegov značaj istaknut i u studiji koja je ispitivala njegov prognostički potencijal u CRC [109]. Štaviše autori pomenute studije su IGF1 razmatrali i kao mogući terapijski cilj budući da je njegov prognostički značaj potvrđen kod pacijenata sa metastazama CRC, koji su ujedno bili nosioci RAS „wild“ tipa alela. Svakako, vredi ispitati da li bi se dijagnostički i prediktivni potencijal modela poboljšao ukoliko bi se IGF1 uključio u integrativni panel biomarkera.



Slika 7. Ekspresija i funkcija insulin/IGF ose u normalnim i ćelijama CRC:(A) U zdravom tkivu insulin, IGF1 i IGF-2 se vezuju sa visokim (neisprekidana linija) ili niskim (isprekidana linija) afinitetom za odgovarajuće receptore da bi aktivirali supstrate za insuliniski receptor (IRS) koji modifikuju više puteva uključenih u transkripciju gena, ćelijsku proliferaciju i apoptozu. IGFBP se ponašaju kao negativni regulatori koji modifikuju funkcije IGF1 i IGF-2

(B) U maligno izmenjenom tkivu pacijenata sa CRC u ushodnu regulaciju PI3K-Akt signalnog puta su uključeni povećana ekspresija insuliniskog receptora A i IGF1R, kao i prisustvo polimorfizama IRS-1 i IRS-2. Dodatno, nishodna regulacija IGFBP3, kao i prekomerna ekspresija IGFBP2 pojačavaju funkciju IGF1 i aktivaciju intracelularnih signalnih puteva koji doprinose poremećaju transkripcije gena, ćelijskoj proliferaciji, diferencijaciji i apoptozu.

Preuzeto iz: Vigneri PG, Tirrò E, Pennisi MS, Massimino M, Stella S, Romano C, Manzella L. The insulin/IGF system in colorectal cancer development and resistance to therapy. *Frontiers in oncology*. 2015; 5:230.

1.2.1.6 Povezanost IGF1 i E-kadherina u CRC

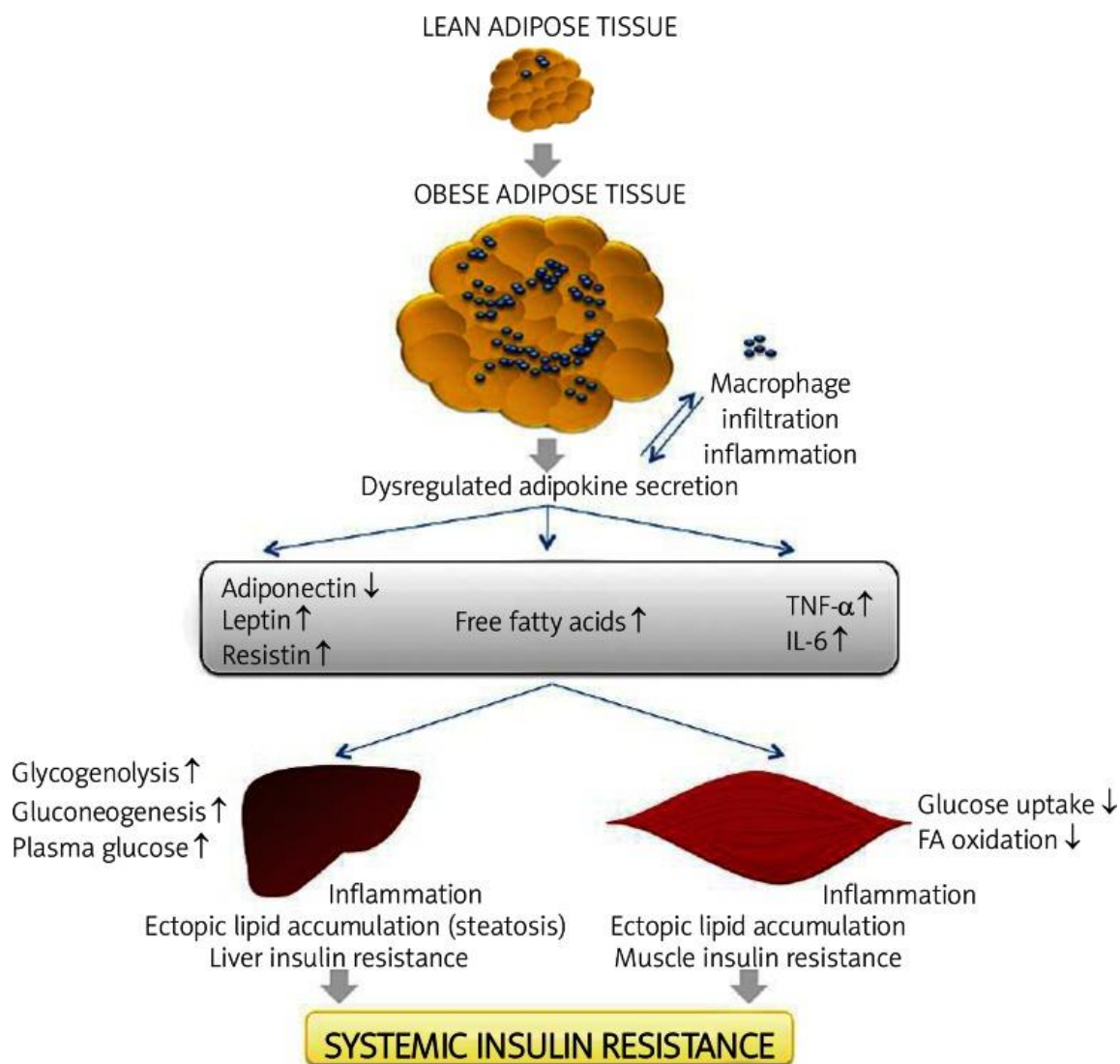
E-kadherin je član kadherinske superfamilije proteina i ima važnu ulogu u formiranju i održavanju intercelularnih adhezivnih veza [110]. Produkt je *CDH1* gena i sastoji se od citoplazmatskog domena, transmembranskog domena i ekstracelularnog domena sa 5 kadherin-ponavljajućih sekvenci za interakciju sa molekulima kadherina na susednim ćelijama. Citoplazmatski domen interaguje sa kateninima, uključujući β -katenin i plakoglobin (γ -katenin), da bi oni dalje posredovali u njegovom vezivanju za aktinske filamente citoskeleta [111]. Studije su pokazale da nedostatak E-kadherina dovodi do gubitka adhezije između ćelija, što promoviše EMT i predstavlja značajan doprinos tumorogenezi [110, 112]. EMT je ključni proces u embriogenezi, ali je takođe jedan od predloženih mehanizama razvoja metastaza. Tokom EMT, veze između epitelnih ćelija se raskidaju, zajedno sa izmenom apikalno-

bazalne polarnosti, citoskelet se reorganizuje i dolazi do promena u signalnim kaskadama koje definišu ćelijski oblik, što je dodatno praćeno reprogramiranjem genske ekspresije [113]. Sve ovo dovodi do porasta u mobilnosti ćelija i podstiče razvoj invazivnog fenotipa [113]. Pokazano je da su ove promene povezane sa progresijom tumora i metastazama na limfnim čvorovima. Shodno tome, redukovana ekspresija E-kadherina se dovodi u vezu sa uznapredovalim CRC [114]. Ipak, pojedine grupe istraživača su ukazale na povišene koncentracije E-kadherina u CRC, ali samo kada je u pitanju solubilna forma proteina [115]. Studija sprovedena na 186 pacijenata sa CRC je pokazala da su preoperativne koncentracije solubilnog E-kadherina bile povezane sa lošijom prognozom, odnosno da nivoi solubilnog E-kadherina rastu sa progresijom bolesti ka višim stadijumima [116].

Istraživanja takođe sugerišu da očuvanje intestinalne epitelne homeostaze, može biti posebno narušeno u inflamatornom okruženju tipičnom za maligne bolesti, kao i da sam E-kadherin ima svoje mesto u inflamatornoj kaskadi [117, 118]. Takođe, od značaja može biti i odnos E-kadherina sa IGF1. Nedavne studije su pokazale da se IGF1 nalazi u recipročnoj vezi sa E-kadherinom u različitim tipovima karcinoma [119-121]. Dodatno, pokazano je da su nivoi E-kadherina u ćelijama CRC (HCT 116) sa utišanom ekspresijom IGFBP2, bili značajno povišeni, što bi moglo da ukaže na potencijalnu ulogu intracelularnog IGFBP2 u promociji EMT [122]. Sam IGF1 može da ubrzava ćelijsku migraciju preko regulacije E-kadherin/ β -katenin kompleksa [123]. Shodno navedenom, važno je ispitati odnos ovih biomarkera u CRC, kao i dijagnostički potencijal njihove pretpostavljene recipročne zavisnosti.

1.2.1.7 Adipozno tkivo, adipocitokini i CRC

Odavno je poznato da adipozno tkivo ne služi samo za skladištenje energije, već predstavlja izvor faktora rasta, hormona, citokina i adipocitokina [124]. Između ostalih sekretujućih molekula, izdvajaju se leptin, adiponektin, angiotenzinogen, inhibitor aktivatora plazminogena 1 i rezistin [125]. Adipozno tkivo se može smatrati aktivnim učesnikom urođenog imunog odgovora, u kome se upravo sekrecijom citokina formira parakrina petlja između adipocita i makrofaga, što rezultuje sistemskom inflamacijom niskog stepena koja pogoduje razvoju tumorske mikrookoline [124]. Danas je prepoznato da makrofage u adipoznom tkivu predstavljaju važan izvor inflamatornih citokina kao što su TNF- α i IL-6 [125] (slika 8). Adipokini i citokini zajedno sa velikom količinom lipida u tumorskoj mikrookolini promovišu adheziju, migraciju i invaziju malignih ćelija, odnosno podstiču progresiju tumora i njegov nekontrolisani rast [126].



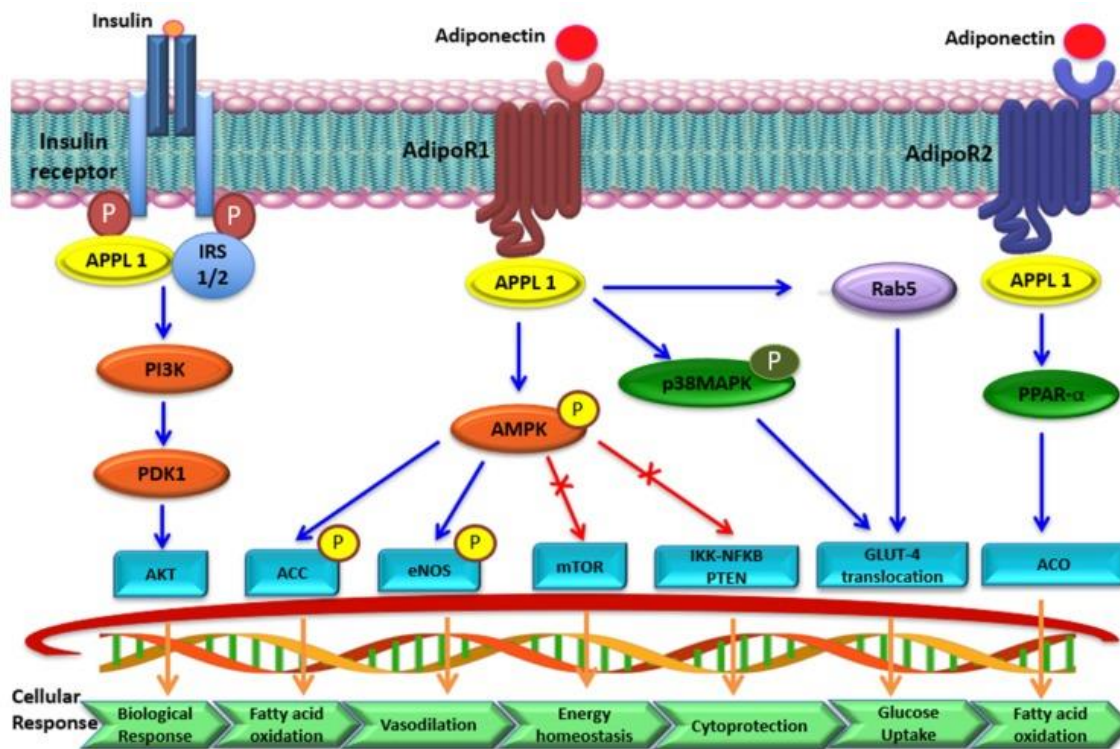
Slika 8. Uloga adipoznog tkiva i makrofaga u razvoju inflamacije i njihovi sistemski efekti.

Gojaznost je praćena hipertrofijom adipocita. Oslobođeni hemokini deluju hemotaksično na monocite/makrofage, te je povećana njihova infiltracija, što dalje vodi u progresivnu inflamaciju uzrokovanu prekomernom produkcijom proinflamatornih citokina poput TNF- α i IL-6. Do ovih efekata dolazi najpre usled deregulacije u sekreciji leptina, adiponektina i rezistina. Proizvodi sekrecije makrofaga i adipokini mogu dalje da deluju parakrino ili autokrino što pogoršava inflamaciju u adipoznom tkivu. Narušena sekrecija adipokina na sistemskom nivou može voditi ka smanjenju insulinske osetljivosti u mišićima i jetri. Ovi efekti vode do povećane produkcije glukoze u jetri (glukoneogenezom i glikogenolizom), dok se metabolizam u mišićima preusmerava ka modelu niskog preuzimanja glukoze i niske oksidacije masnih kiselina, te dolazi do porasta koncentracije glukoze u plazmi i posledično do pojačavanja insulinske rezistencije.

Preuzeto iz: Coelho M, Oliveira T, Fernandes R. Biochemistry of adipose tissue: an endocrine organ. Archives of medical science: AMS. 2013; 9:191-200.

1.2.1.8 Metabolički efekti adiponektina

Adiponektin predstavlja pleiotropni citokin koji pored uloge u energetske homeostazi, deluje još kao anti-apoptotski, antiinflamatorni i anti-angiogeni faktor [127]. Po strukturi je protein od 244AAK sekretovan u najvećoj meri od strane adipoznog tkiva [128]. Gen za sintezu adiponektina na hromozomu 3q27 je prvi put opisan 1995. godine [125]. Strukturno, adiponektin je srodan familiji komplementa 1q, sadrži karboksilni-terminalni globularni domen, amino-terminalni kolageni domen i pokazuje visok nivo homologije u sekvenci sa kolagenom VIII i X [125]. Svaki monomer adiponektina se sastoji od 3 domena: promenljivog N-terminalnog regiona, spiralne kolagenske „drške“ sastavljene od višestrukih ponavljajućih sekvenci G – X – Y i karakterističnog C-terminalnog globularnog domena od približno 140 aminokiselina [125]. Adiponektin postoji u dve cirkulišuće forme, kao globularni adiponektin i adiponektin pune dužine (*full length*) [127]. Posttranslacioni i presekrecioni procesi imaju za posledicu formiranje više izoformi proteina u ćeliji i plazmi, uključujući trimere (LMW, ~67 kDa), heksamere (MMW, ~136 kDa) i multimerne velike molekulske težine (HMW, >300 kDa) [127]. Metabolički efekti adiponektina su danas u mnogome rasvetljeni. Smatra se da ovaj molekul može da inhibira glukoneogenezu, poboljšava insulinsku osetljivost, stimuliše beta oksidaciju masnih kiselina u skeletnim mišićima i sprečava akumulaciju masti u jetri [129]. Svoje efekte ostvaruje preko tri do sada identifikovana receptora: adiponektinskog receptora 1 (Adipor1), adiponektinskog receptora 2 (Adipor2) i T-kadherina. Adipor1 i Adipor2 se sastoje od intracelularnog amino-terminalnog i ekstracelularnog karboksi-terminalnog segmenta [130]. Ovi receptori imaju sedam transmembranskih domena i po topologiji su suprotni receptorima spregnutim sa G proteinom [130]. Adiponektinski receptori pokazuju afinitet kako za adiponektin pune dužine (*full length*), tako i za globularni adiponektin, iako Adipor1 više vezuje globularnu formu proteina, prvenstveno u mišićnim i endotelnim ćelijama, dok Adipor2 interaguje i sa globularnim i sa *full length* adiponektinom prvenstveno u ćelijama jetre [127]. Kompleks adiponektina i Adipor1 aktivira adenozin monofosfat-aktiviranu protein kinazu (AMPK) i promovise oksidaciju lipida, dok Adipor2 povećava aktivnost liganda peroksizom-proliferator-aktiviranog receptora (PPAR) [127]. Zapravo, kada je Adipor1 stimulisan adiponektinom, odnosno kada adiponektin interaguje sa karboksi-terminalnim domenom Adipor1, dolazi do pokretanja više ćelijskih signalnih kaskada uključujući serin/treonin kinazu Akt, fosfatidilinozitol-4,5-bifosfat-3-kinazu, IRS-1 i IRS-2, AMPK i MAPK [130]. Ključni signalni putevi nastali vezivanjem adiponektina za receptore su prikazani na slici 9.



Slika 9. Ključni signalni putevi adiponektina

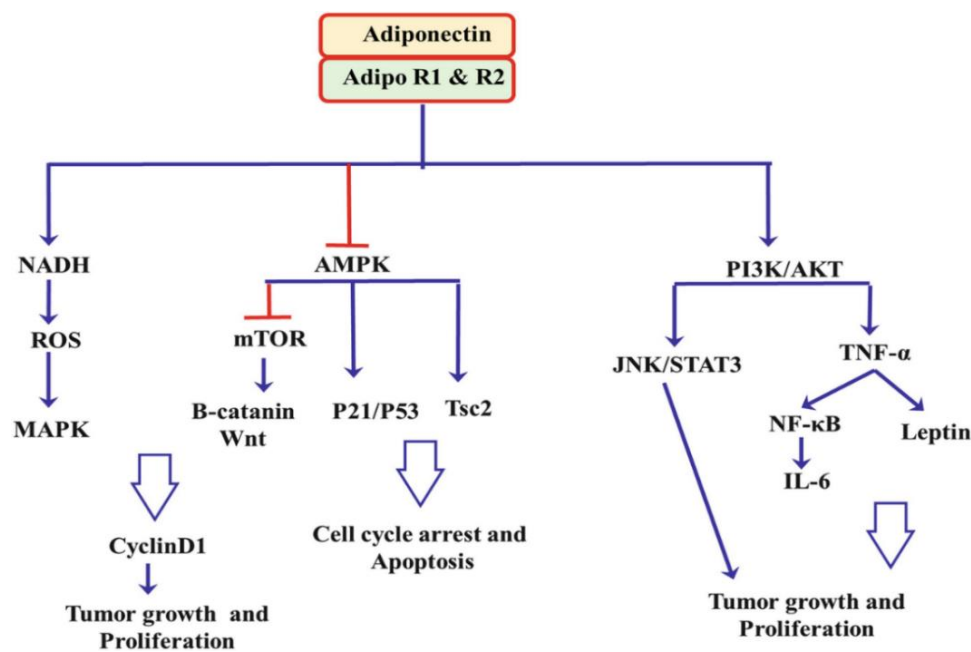
Vezivanje adiponektina za odgovarajući receptor aktivira adaptorni protein sa plekstrinu homologim domenom (*adaptor protein containing a pleckstrin homology domain*, APPL). APPL1 inicira signalnu transdukciju aktivacijom PPAR α i fosforilacijom AMPK i p38- MAPK. Fosforilisani AMPK inhibira lipogenezu i podstiče oksidaciju masnih kiselina, kao i njihov transport u mitohondrije, fosforilacijom acetil-CoA-karboksilaze (ACC1). Fosforilisana eNOS stimuliše sintezu NO, što rezultira vazodilatacijom. Dodatno, adiponektin pokazuje citoprotektivne efekte jer aktivacijom AMPK suprimira *mammalian/mechanistic target of rapamycin* mTOR i *IkkapB kinase* (IKK)-NF- κ B- *phosphatase and tensin homologue deleted from chromosome 10* (IKK-NF- κ B-PTEN) signalizaciju. Metabolički efekti insulina su mahom kontrolisani PI3K-Akt signalnom kaskadom. Kada je PI3K-Akt put aktiviran, sinteza glikogena i preuzimanje glukoze se povećavaju, ali je lipoliza suprimirana. Osetljivost na insulin je još više povećana kada su IRS-1 i IRS-2 aktivirani adiponektinom.

Preuzeto iz Choi HM, Doss HM, Kim KS. Multifaceted physiological roles of adiponectin in inflammation and diseases. *International journal of molecular sciences*. 2020 Jan;21(4):1219.

Daljim proučavanjem signalnih puteva u koje je uključen adiponektin, korišćenjem multiplih *gain* i *loss-of-function* animalnih modela, pokazano je da aktivnost ceramidaze možda predstavlja ključni mehanizam odgovoran za pleiotropnu ulogu adiponektina u organizmu [131]. Naime pokazano je da adiponektin stimuliše aktivnost ceramidaze povezane sa adiponektinskim receptorima, što dalje pospešuje katabolizam ceramida i formiranje antiapoptotskog metabolita - sfingozin-1-fosfata, i to najverovatnije mehanizmom nezavisnim od AMPK [132]. Ova otkrića sugerišu da adiponektinski receptori imaju fundamentalnu ulogu u fiziološkom balansu ceramida i sfingozin-1-fosfata, usled čega dobijaju još više na značaju [132]. Nasuprot Adipor1 i Adipor2, uloga T-kadherina još uvek nije dovoljno rasvetljena [133]. T-kadherin se isključivo vezuje za MMW i HMW izoforme adiponektina, prvenstveno u endotelnim i glatkim mišićnim ćelijama [131, 133]. Kako je ovaj protein vezan za plazma membranu preko glikozil fosfatidil inozitola usled nedostajuće citoplazmatske sekvence, smatra se da se

intracelularna signalizacija oslanja na još uvek neidentifikovani ko-receptor ili možda čak same Adipor1 i Adipor2 [131].

Više studija je ukazalo na vezu između niskih koncentracija adiponektina i razvoja CRC [128]. Štaviše, kada su izvršene korekcije za moguće faktore uticaja, inverzna relacija između adiponektina i rizika za CRC je i dalje postojala [134]. Dodatno, meta analiza studija izvedenih na muškoj populaciji je pokazala da porast od 1 $\mu\text{g/mL}$ u koncentraciji adiponektina smanjuje za 2% rizik za razvoj CRC [135]. Kada su u pitanju Adipor1 i Adipor2, primenom imunohistohemijskog bojenja, kao i kvantitativne lančane reakcije polimerizacije (qPCR), nađeni su viši nivoi genske i proteinske ekspresije u tumoru kolorektuma u odnosu na zdravo tkivo [136]. Nasuprot tome, druga grupa autora je pokazala da sa napredovanjem T stadijuma tumora, stepen imonohistohemijskog bojenja na Adipor1 opada. Proporcionalno slabljenje imunohistohemijskog bojenja na Adipor1 je bilo izraženije u lošije diferenciranom adenokarcinomu, nego u dobrom ili srednje diferenciranom tumoru [137]. Stepem imunohemijskog bojenja na Adipor2 je pokazao značajnu vezu sa limfovaskularnom infiltracijom, te je ukazano na potencijalnu korisnost ovog markera u prognostičke svrhe [137]. Bez obzira na različite zaključke ovih, a i mnogih drugih studija, mehanizmi kojima adiponektin suprimira razvoj CRC su već predloženi. Naime, u više kolorektalnih ćelijskih linija je pokazano da adiponektin direktno reguliše ćelijsku proliferaciju, adheziju i invazivnost, dok istovremeno kontroliše metaboličke puteve [(AMPK)/S6], inflamatornu signalizaciju [signalni transduktor i aktivator transkripcije 3 (STAT3)/vaskularni endotelni faktor rasta (VEGF)], kao i ćelijski ciklus (p21/p27/p53/ciklini) [124]. Inhibicija preživljavanja malignih ćelija se postiže kroz blokadu ćelijskog ciklusa, apoptozu i redukovanu aktivnost c-Jun N-terminalne kinaze (JNK)/STAT3, NF- κ B, mTOR, Wnt i MAPK signalnih kaskada [127]. Značajni mehanizmi preko kojih adiponektin suprimira kolorektalnu karcinogenezu su prikazani na slici 10. Zbog svega navedenog, ne iznenađuje činjenica o velikoj zainteresovanosti naučne zajednice za ulogu adiponektina i njegovih receptora u CRC [138].



Slika 10. Mehanizmi preko kojih adiponektin suprimira kolorektalnu karcinogenezu

AMPK interferira sa ćelijskim rastom preko mTOR signalnog puta i inhibira progresiju karcinogeneze, adheziju ćelija tumora i migraciju. Dodatno, AMPK inhibira sintezu masnih kiselina, nishodnom regulacijom sinteze masnih kiselina. Adiponektin redukuje rast tumora i proliferaciju kroz supresiju PI3K/Akt signalnih puteva. S druge strane Wnt fosforilacijom glikogen sintaza kinaze-3 β (GSK3 β), smanjuje se sposobnost ovog enzima da ukloni β -katenin iz ćelijskog nukleusa. Na taj način Wnt posredno utiče na pojačanu ekspresiju ciklina D1, podstičući ćelijski ciklus. Posredstvom adiponektina fosforilacija GSK3 β je onemogućena, te je i ćelijski ciklus maligno izmenjenih ćelija suprimiran. Smanjenjem fosforilacije STAT-3 uključenog u JAK/STAT signalizaciju, adiponektin redukuje proliferaciju ćelija.

Preuzeto iz: Srivani G, Dariya B, Nagaraju GP, Alam A. Adiponectin Signaling in Colorectal Cancer. In: Theranostics Approaches to Gastric and Colon Cancer 2020 (pp. 29-48). Springer, Singapore.

1.2.2 Poremećaji imuniteta i inflamacije

1.2.2.1 Adiponektin kao učesnik imune homeostaze

Prethodne studije su istakle značaj ukrštanja adipocitokinskih signalnih puteva sa kaskadama pokrenutim od strane imunih medijatora [139]. Prema tome, adiponektin se može posmatrati kao regulator metaboličke ravnoteže, ali i kao protein povezan sa imunološkim odgovorom. Metabolička uloga adiponektina u CRC je već detaljno ispitana, a njegova uloga u očuvanju imune homeostaze danas postaje sve značajnija. Naime, sve više pažnje se posvećuje ulozi adiponektina u imunomodulaciji, s obzirom na njegov značaj za polarizaciju i plastičnost monocita/makrofaga [140]. Ovo je posebno značajno ako se zna da M1, ili klasično-aktivirane makrofage, ushodno regulišu produkciju proinflamatornih citokina, uključujući TNF- α , IL-6 i IL-12, dok istovremeno povećavaju produkciju ROS [140,141]. Nasuprot njima M2, ili alternativno aktivirane makrofage polarizovane sa IL-4 i IL-13,

učestvuju u oksidativnom metabolizmu, reparaciji tkiva i blokadi inflamacije [140,141]. Pokazano je da adiponektin suprimira aktivaciju M1 makrofaga i nishodno reguliše markere poput TNF- α , monocitnog hemoatraktantnog proteina 1 (MCP-1) i IL-6 [141]. S druge strane, adiponektin pomera ravnotežu ka M2 fenotipu, uz ushodnu regulaciju arginaze 1, galaktoza-tip lektina 1 u makrofagama (*Macrophage galactose-type lectin-1*, MGL1) i IL 10 [141]. Eksperimentalno je utvrđeno da su M2 makrofage u stanju i da suprimiraju inflamatorni odgovor M1 makrofaga u neposrednoj blizini, a jačanje antiinflamatornog odgovora M2 subpopulacije makrofaga se delom pripisuje i adiponektinu [142]. Uloga Adipor1 u makrofagama je već rasvetljena i povezana sa nishodnom regulacijom proinflamatorne kaskade posredovane NF- κ B, dok je pretpostavljena uloga Adipor2 indukcija polarizacije makrofaga ka M2 subpopulaciji [141].

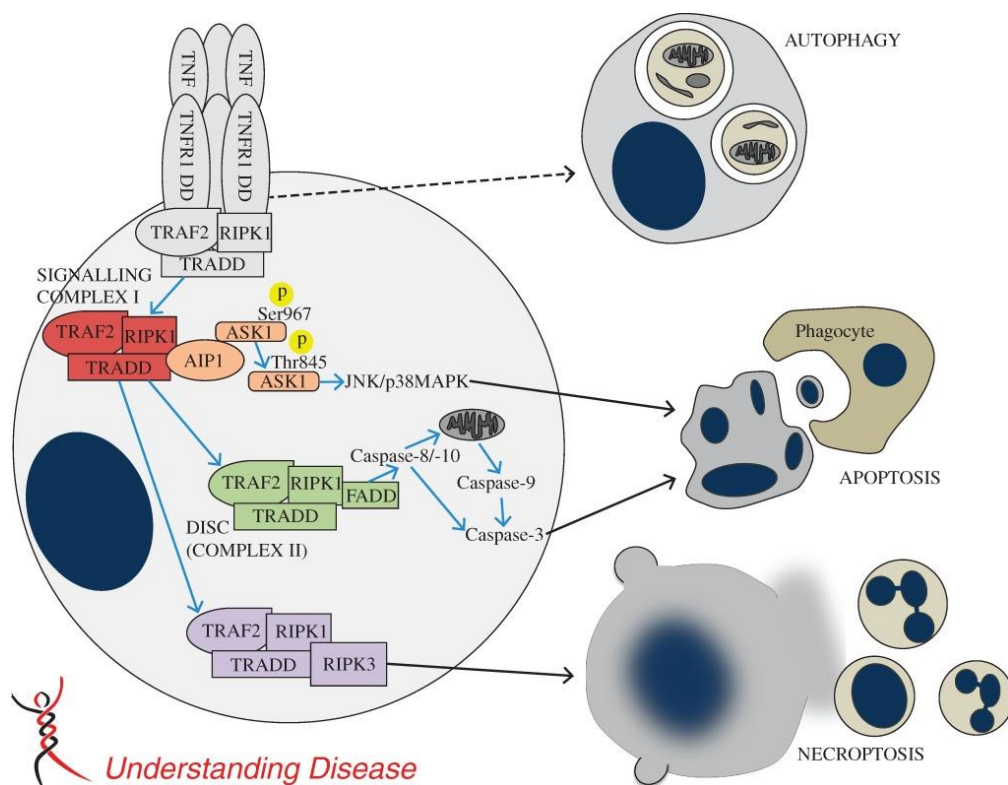
Pored svega navedenog, značaj adiponektina i njegovih receptora u CRC je dodatno naglašen brojnim studijama koje su ukazale na povezanost određenih SNP sa razvojem maligniteta [143]. Polimorfizmi gena *ADIPOQ* i *ADIPOR1* mogu biti uzročnici nepravilnog funkcionisanja adiponektinske ose, te mogu imati važne kliničke implikacije u različitim bolestima. Kako su pojedine studije istakle veći značaj adiponektinskih efekata posredovanih Adipor1 kaskadom pre nego vezivanjem adiponektina za Adipor2, pogotovo kada je u pitanju CRC [144], od značaja je istraživanje polimorfizama gena za *ADIPOQ* (rs266729) i *ADIPOR1* (rs7539542 i rs1342387). Naime, studije su ukazale na vezu između *ADIPOQ* rs266729 polimorfizma i povećanog rizika za razvoj CRC [145, 146]. Takođe je pokazano da nosioci T alela u slučaju rs1342387 *ADIPOR1* polimorfizma imaju niži rizik za razvoj bolesti [147]. S druge strane meta analiza je istakla vezu istog polimorfizma, ali ne i rs7539542 (C/G) *ADIPOR1* sa povećanim rizikom za razvoj CRC na području Azije [148]. Smatra se da diverzitet u studijama potiče od razlika u etničkoj pripadnosti populacija.

Imajući u vidu da su rezultati studija o interakcijama adiponektin-Adipor 1/Adipor2, kao i njihovim ulogama u razvoju CRC neusklađeni, kako na proteinskom, tako i na genetskom nivou, potrebno je sprovesti opsežnija istraživanja [136, 137]. Treba takođe naglasiti da je nivo ekspresije ovih biomolekula dobro ispitan u tkivima, ali znatno manje u mononuklearnim ćelijama periferne krvi (*peripheral blood mononuclear cells*, PBMC). S druge strane, kako moderna dijagnostika teži ka razvoju minimalno invazivnih procedura, novi biomarkeri adiponektinske homeostaze koji se mogu detektovati u venskoj krvi su poželjni. U tom smislu PBMC predstavljaju vrlo zahvalan biološki materijal, koji s jedne strane omogućava ispitivanje promena imunog odgovora posredovanog adiponektinom u CRC, a s druge strane je lako dostupan i prihvatljiv za pacijenta.

1.2.2.2 TNF- α kao medijator imunog odgovora i inflamacije

Pored poremećaja u metabolizmu i imunom odgovoru, za progresiju karcinoma je karakteristična i inflamacija [149, 150]. Značajan proinflamatorni medijator, čija je uloga u karcinomu kolona posebno istaknuta je TNF- α [150, 151]. Ovaj protein se primarno sintetise u ćelijama imunog sistema (monociti,

makrofage, prirodne ćelije ubice (*natural killer (NK) cells*), T limfociti, mast ćelije, neutrofili [152]. Postoji u formi transmembranskog proteina i aktivan je, ili kao homotrimer na površini sekretujućih ćelija, ili kao solubilni homotrimer koji se formira od C-terminalnog kraja membranskog oblika pod uticajem TNF- α -konvertujućeg enzima (metaloproteinaze ADAMS17) [153]. TNF- α svoje efekte ostvaruje posredstvom dva receptora: TNFR1 i TNFR2 i citozolnog adaptorskog proteina [153]. Smatra se da pleiotropni efekti TNF- α nastaju ne samo kao posledica postojanja dveju formi, već i usled slabe homologije ligand vezujućih domena, kao i potpunog odsustva homologije intracelularnih domena receptora, koji pokreću intracelularnu signalnu kaskadu pomoću *scaffold* proteina [152]. Studije su pokazale da vezivanje TNF- α za odgovarajući receptor dovodi do aktivacije NF- κ B i aktivator protein 1 (AP-1) signalne kaskade, što rezultuje produženim preživljavanjem ćelija [154]. Pored doprinosa ćelijskom preživljavanju i proliferaciji, signalizacija posredstvom TNFR1 može voditi ka formiranju DISC kompleksa (*death-inducing signalling complex*) i može indukovati apoptozu, odnosno nekroptozu ćelija (programirana ćelijska smrt okarakterisana bubrenjem ćelije i lizom) [153]. Detaljna signalna kaskada koju pokreće TNF- α sa sledstvenim efektima ovog glikoproteina je objašnjena na slici 11. U ćelijskim linijama tumora nedostaju inhibitori ove signalizacije koji su inače prisutni u zdravim ćelijama, pa je ovaj mehanizam prepoznat kao jedan od razloga zbog kojih u *in vitro* uslovima TNF- α dovodi do nekroptoze ćelija karcinoma [153]. Signalizacija posredstvom TNFR2 s druge strane može da aktivira endotelnu/epitelnu tirozin kinazu (Etk) sa ulogom u ćelijskoj adheziji, migraciji, proliferaciji i preživljavanju, tako da umesto nekrotičnog efekta, TNF- α na ovaj način deluje kao autokrini signal za preživljavanje ćelija karcinoma [153]. TNF- α je identifikovan i kao medijator urođenog i stečenog imuniteta, koji dovodi do antitumorskog odgovora T-ćelija [155]. Antitumorska uloga TNF- α se ostvaruje uništavanjem strome tumora posredstvom aktivacije citotoksičnih T limfocita ili tumor-infiltrirajućih makrofaga, kao i aktivacijom tumor-infiltrirajućih dentritičnih ćelija [155]. Iako uloga TNF- α nije u potpunosti rasvetljena i u literaturi opisana kao dualna, ovaj citokin je prepoznat kao posebno značajan za kolorektalnu karcinogenezu [150]. Zanimljivo je da su studije pokazale da adiponektin ima strukturnih sličnosti sa TNF- α [128]. Štaviše, adiponektin se smatra važnim faktorom uticaja na promene koncentracije TNF- α i obrnuto [156, 157]. Primera radi, protektivni efekti adiponektina kroz Adipor1-zavisnu aktivaciju, su ostvareni redukcijom proinflamatornog efekta TNF- α u endotelnim ćelijama pupčane vene [158]. Međutim, ovakva povezanost nije ispitivana u CRC. Važno je apostrofirati i značaj genskog polimorfizma TNF- α za proces kolorektalne karcinogeneze. U ovom smislu se može izdvojiti SNP *TNF- α* -308 G>A (rs1800629), posebno ako se uzme u obzir njegova lokalizacija u promotorskom regionu gena i sledstveni uticaj na sintezu ovog glikoproteina [159]. Naime, pokazano je da prisustvo *TNF- α* -308 AA/GA genotipa kod pacijenata sa ulceroznim kolitisom dovodi do višeg rizika za razvoj CRC [160]. Dodatno je uočena veza ovog SNP sa kliničkim karakteristikama CRC, kao i sa udaljenim metastazama kod pacijenata sa karcinomom rektuma [161].



Slika 11. TNF- α posredovana ćelijska smrt

Vezivanjem TNF- α za TNFR1 inicira se proinflatorna signalizacija, kao i signalizacija za preživljavanje ili ćelijsku smrt kroz aktivaciju apoptoza signalne kinaze 1 (*apoptosis signaling kinase 1*, ASK1). Ovo dalje rezultuje aktivacijom JNK i p38-MAPK puta.

Alternativno TNFR1 može da inicira formiranje signalnog kompleksa smrti (*death-inducing signaling complex*, DISC) koji dovodi do ćelijske smrti kroz apoptozu ili nekroptozu (ćelijska smrt okarakterisana bubrenjem ćelija i lizom). Po vezivanju TNF-TNFR1 dolazi do formiranja signalnog kompleksa 1 [čine ga 3 komponente: *adaptor protein -TNF receptor associated death domain protein* (TRADD); *serin/treonin kinaza- receptor interacting protein kinase -1* (RIPK-1); E3 ubikvitin ligaza - *TNF receptor-associated factor* (TRAF2)]. Par sati nakon formiranja, signalni kompleks 1 regrutuje adaptorski protein poznat kao Fas-povezani domen smrti (FADD), formirajući DISC. DISC dalje može da regrutuje i promoviše autokatalitičku aktivaciju pro-kaspaza 8 i 10 koje dalje proteolitički aktiviraju efektor kaspaza 3 i 6 što sve vodi ka apoptozi.

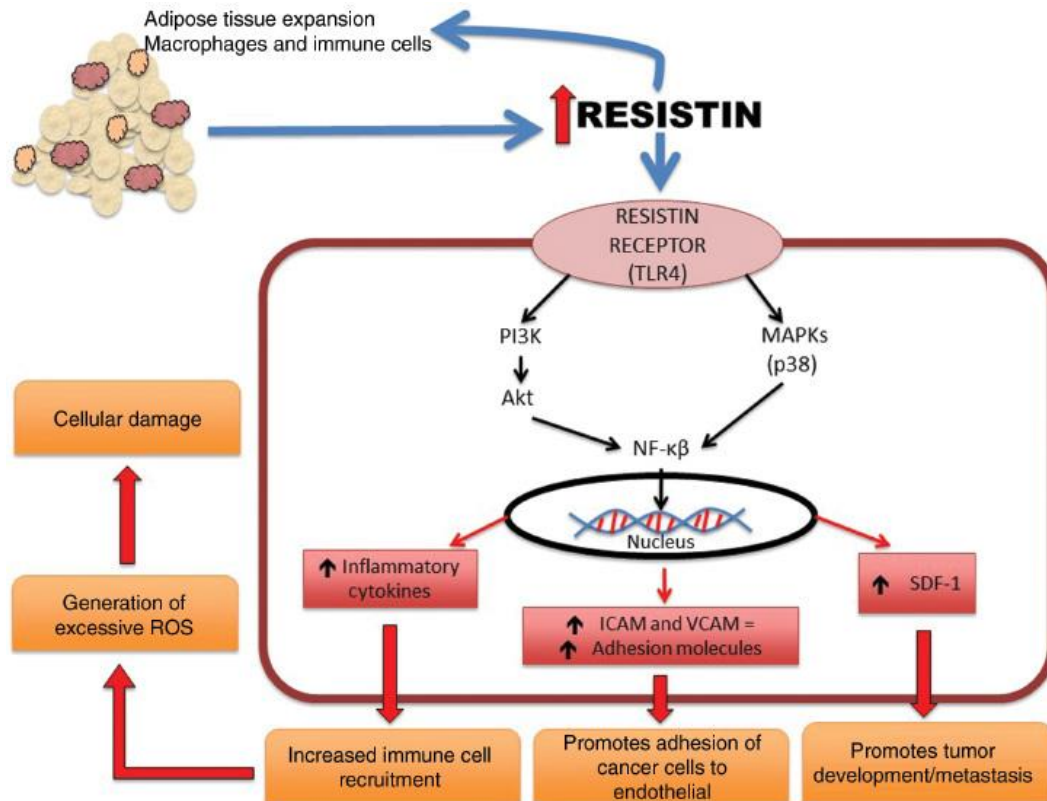
Preuzeto iz Waters JP, Pober JS, Bradley JR. Tumour necrosis factor and cancer. *The Journal of pathology*. 2013 ;230:241-248.

1.2.2.3 Uloga rezistina u inflamaciji i potencijalna povezanost sa razvojem CRC

Rezistin je po strukturi peptid bogat cisteinom koji se sastoji od 108 aminokiselina, težine 12,5 kDa [162]. Gen za rezistin (*RETN*) je mapiran je na p13.3 kraku hromozoma 19 [162]. Iako se primarno smatrao adipocitokinom, translaciona studija autora Schwartz i Lazara je pokazala da humani rezistin primarno poreklo vodi iz PBMC, makrofaga, ćelija koštane srži, a ne iz adipocita [163, 164]. Kao član porodice rezistinu-sličnih molekula (sekretornih proteina povezanih sa aktivacijom inflamacije), rezistin reguliše inflamatorni odgovor, posreduje u metaboličkim poremećajima i podstiče progresiju karcinoma [164]. Povišene koncentracije rezistina su opisane u dijabetes melitusu, metaboličkom sindromu i inflamatornim bolestima creva [165-167], dok su prethodne studije pokazale da su povišene koncentracije rezistina u vezi i sa uvećanim rizikom za razvoj CRC [124]. Pretpostavlja se da rezistin doprinosi progresiji karcinoma, stimulišući rast i proliferaciju malignih ćelija, no eksperimenti sprovedeni radi potvrđivanja ovih tvrdnji su rezultovali oprečnim zapažanjima [168]. Nasuprot diskutabilnoj ulozi rezistina u ćelijskoj proliferaciji tokom tumorogeneze, njegova veza sa inflamacijom u malignim bolestima je nedvosmislena [169]. Međutim, nepoznanica je da li rezistin doprinosi i dislipidemiji koja se često može uočiti u CRC [60]. Veza rezistina sa HDL česticama može biti posebno intrigantna, s obzirom na njihov značajan doprinos antiinflamatornom i antioksidativnom kapacitetu plazme. Moguća povezanost rezistina sa koncentracijom HDL-h, kao i aktivnošću PON-1 je još uvek nedovoljno istražena, kako generalno, tako i u CRC. Imajući u vidu prethodno rečeno, rezistin bi mogao biti jedan od potencijalnih biomarkera CRC, sa značajnom ulogom u ispitivanju interakcija inflamacije, dislipidemije i karcinogeneze. U ovom kontekstu istraživanje interakcija između rezistina, HDL-h i PON-1, kao pokazatelja poremećene inflamatorne, lipidne i redoks ravnoteže, može biti korisno u definisanju tačnih panela biomarkera za detekciju povišenog rizika za razvoj CRC.

S obzirom da je značaj rezistina potvrđen u različitim patološkim stanjima, tragalo se za adekvatnim receptorom preko kojih ovaj protein ostvaruje svoje efekte. Istraživanja su pokazala da se rezistin može vezati za više receptora: mišju izoformu dekorina, mišji *tyrosine kinase-like orphan receptor 1* (ROR1) i *Toll like receptor 4* (TLR-4), ali i za protein udružen sa adenilat ciklazom 1 (*Adenylyl Cyclase-Associated Protein 1*; CAP-1) [170-173]. Kod ljudi se TLR4 smatrao glavnim ciljnim mestom za vezivanje rezistina [172] (neki od najvažnijih signalnih puteva rezistina u karcinomu, ostvareni preko TLR4 su prikazani na slici 12), sve dok Sahmin Lee i sar. nisu ukazali na značaj interakcije rezistina sa CAP-1 [173]. Iako se CAP-1 može naći u različitim tkivima, njegova najveća zastupljenost je u PBMC i koštanoj srži. Naime, autori su potvrdili da kompleks rezistin-CAP-1 dovodi do aktivacije protein kinaze A (PKA) i NF- κ B signalnog puta, što rezultuje produkcijom proinflamatornih citokina (slika 13) [173]. Iako su visoke koncentracije rezistina povezivane sa CRC [174], genska ekspresija CAP-1 je bila uglavnom ispitivana u kardiovaskularnim bolestima [175], tako da je interakcija rezistin-CAP-1 još uvek neistražena kod pacijenata sa CRC. Ipak, izučavanje mogućih obrazaca poremećaja interakcija receptor-protein, može biti posebno značajno za predikciju rizika, prevenciju i personalizovani tretman kako CRC, tako i bilo kog drugog oboljenja [176]. Dodatno,

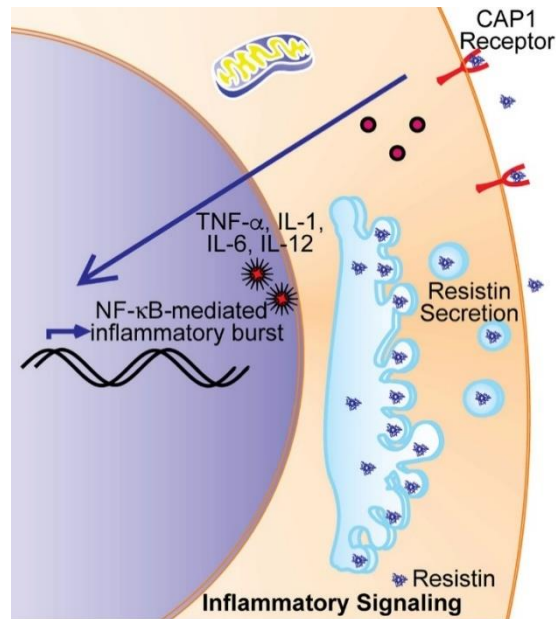
moderni koncept personalizovane medicine je u velikoj meri baziran na razumevanju povezanosti genetskih i epigenetskih poremećaja sa individualnim kliničkim ishodom [177]. S obzirom da predstavljaju jedan od glavnih izvora genetskog diverziteta, SNP treba uzeti u obzir i prilikom ispitivanja moguće uloge rezistin-CAP-1 interakcije u razvoju CRC. Naime, više studija je ukazalo na vezu polimorfizma *RETN* -420 C/G (rs1862513) sa povišenom incidencom CRC [178]. U tom smislu, bilo bi značajno istražiti uticaj ovog SNP na koncentraciju proteina, kao i na gensku ekspresiju rezistina i CAP-1.



Slika 12. Prikaz signalizacije pokrenute vezivanjem rezistina za TLR4

Vezivanjem rezistina za receptor dolazi do aktivacije dve različite signalne kaskade. Prva je ushodna regulacija PI3K-AKT-NFκB signalnog puta. Druga je aktivacija p38-MAPK signalnog puta, koja je praćena ushodnom regulacijom NFκB. NFκB dalje pokreće tri različita puta: prvi dovodi do pojačane produkcije inflamatornih citokina i regrutovanja imunih ćelija, što je praćeno porastom u produkciji ROS i oštećenjem ćelija; drugi je ushodna regulacija adhezionih molekula ICAM-1 i VCAM-1, koji dovode do povećane adhezije ćelija karcinoma za endotel; treći je ushodna regulacija *stromal cell-derived factor-1* (SDF-1) koji promoviše razvoj tumora i metastaze.

Preuzeto iz: Booth A, Magnuson A, Fouts J, Foster M. Adipose tissue, obesity and adipokines: role in cancer promotion. *Hormone molecular biology and clinical investigation*. 2015; 21:57-74.



Slika 13. Prikaz signalizacije pokrenute vezivanjem rezistina za CAP-1 receptor. Rezistin uzrokuje pro-inflamatorno stanje preko NF-κB-zavisne signalizacije

Preuzeto iz: Tripathi D, Kant S, Pandey S, Ehtesham NZ. Resistin in metabolism, inflammation, and disease. The FEBS journal. 2020; 287:3141-3149.

Da bi se zdravstvena zaštita razvijala u pravcu pouzdane prediktivne, preventivne i personalizovane medicine (PPPM) neophodno je razvijati složeniji laboratorijski pristup od postojećeg. Ovakav pristup prevenciji, dijagnostici i lečenju uzima u obzir genetsku varijabilnost, faktore okruženja, kao i životni stil pojedinca, odnosno multidimenzionalne interakcije internih i eksternih faktora pri proceni predispozicije pojedinca za razvoj bolesti, tok bolesti i odgovor na terapiju [177]. U tom smislu, neophodno je detektovati panel biomarkera koji će u okviru laboratorijske medicine reflektovati težnje PPPM. Shodno svemu navedenom, može se zaključiti da integrativni pristup, koji bi obuhvatio istovremeno određivanje više parametara koji odslikavaju narušen energetskei metabolizam, redoks, imunu i inflamatornu ravnotežu, predstavlja obećavajuću strategiju u proceni rizika, skriningu i ranoj dijagnostici CRC.

2. Ciljevi istraživanja

Multimarkerski pristup koji uključuje ispitivanje plazmatske koncentracije proteina, genske ekspresije i polimorfizama od značaja može da predstavlja osnov razvoja visoko osjetljivih i specifičnih dijagnostičkih i prediktivnih alata za kompleksna oboljenja poput CRC. Osim toga, ovakvi modeli poseduju i potencijal za praćenje individualizovane terapije. Relativno neinvazivan postupak uzorkovanja donosi značajnu prednost ovom potencijalnom pristupu u predikciji nastanka i ranoj dijagnostici CRC. U tom smislu, ciljevi našeg istraživanja su bili sledeći:

- ❖ Ispitati karakteristike osnovnog lipidnog profila kod pacijenata sa CRC i utvrditi razlike u odnosu na zdrave osobe.
- ❖ Ispitati promene parametara specifičnog lipidnog profilisanja (enzimska aktivnost LCAT i CETP, masena koncentracija CETP, paraoksonazna i arilesterazna aktivnosti PON-1) i glavnog pokazatelja oksidativnog stresa, PAB, kod pacijenata sa CRC u odnosu na kontrolnu grupu.
- ❖ Ispitati razlike u nivoima ekspresije gena rezistina, CAP-1, Adipor1, Adipor2 i TNF- α u PBMC pacijenata u odnosu na kontrolnu grupu.
- ❖ Primenom bioinformatičke *gene set enrichment* (GSE) analize online dostupnih baza transkriptomskih podataka utvrditi povezanost nivoa iRNK Adipor1/ Adipor2 i genskih setova vezanih za signalne puteve od značaja za razvoj CRC. Ispitati transkriptomski profil adiponektinskih receptora i TNF- α u odabranim bazama podataka.
- ❖ Odrediti plazmatske koncentracije rezistina, IGF-1 i E-kadherina kod obe grupe ispitanika u cilju evaluacije njihovog značaja u okviru poremećaja homeostaze lipida i inflamatornih medijatora u CRC
- ❖ Ispitati korelacije nivoa ekspresija gena rezistina, Adipor1, Adipor2, TNF- α i CAP-1 u PBMC, kao i plazmatskih koncentracija rezistina, IGF-1 i E-kadherina sa antropometrijskim karakteristikama ispitanika i tradicionalnim lipidnim i nelipidnim faktorima rizika za CRC.
- ❖ Ispitati razlike u frekvenci genotipova ispitanika u sklopu polimorfizama za *ADIPOQ* (rs266729), *RETN* (rs1862513), *ADIPOR1* (rs7539542, rs1342387), *TNF- α* (rs1800629) i *IGF-1* (rs2946834).
- ❖ Ispitati povezanost genskih ekspresija i polimorfizama ciljnih gena sa plazmatskim koncentracijama proteina, kao i međusobnu povezanost ispitivanih polimorfizama i genskih ekspresija.
- ❖ Utvrditi postojanje razlika u ispitivanim biomarkerima u zavisnosti od gradusa i stadijuma CRC.

- ❖ Utvrditi potencijal istraživanih biomarkera za predikciju prisustva i dijagnozu CRC.
- ❖ Na osnovu karakteristika i identifikovane međusobne povezanosti pojedinačnih biomarkera formirati odgovarajuće multimarkerske modele za predviđanje pojave CRC.
- ❖ Primenom analize ROC krive ispitati dijagnostičku tačnost pojedinačnih biomarkera, kao i dobijenih multimarkerskih modela.
- ❖ Primenom MDR softvera evaluirati prisustvo gensko-genskih interakcija i interakcija gena sa faktorima spoljašnje sredine.

3. Materijal i metode

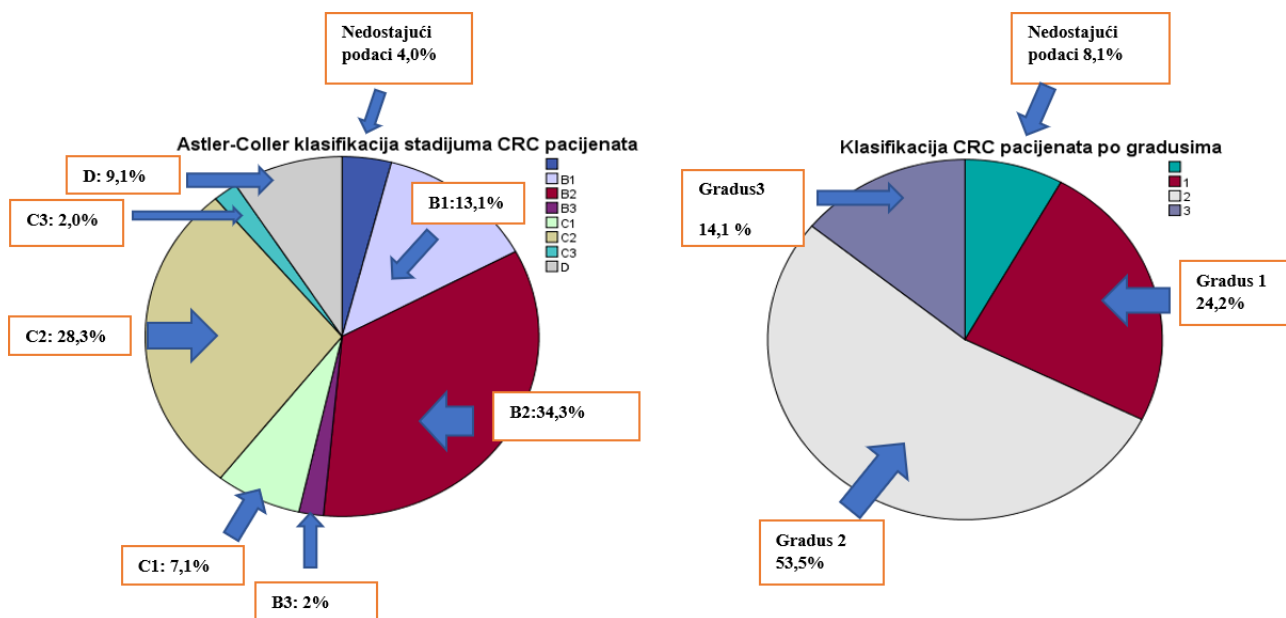
3.1 Ispitanici

Ovo istraživanje je uključivalo 126 pacijenata koji su bili podvgnuti elektivnoj resekciji creva zbog preoperativne dijagnoze CRC, u periodu od jula 2014. do januara 2016. godine na Klinici za opštu hirurgiju Vojnomedicinske akademije u Beogradu, kao i 101 zdravu osobu. Uslovi za uključivanje pacijenata u studiju su bili: odrasla dob, lična anamneza negativna na prisustvo prethodnih malignih bolesti, odsustvo neoadjuvantne terapije i odsustvo upotrebe hipolipidemika. Za svakog pacijenta je postoperativno dobijen definitivni patohistološki nalaz. U 5 slučajeva histološka analiza resektovanog tkiva je isključila CRC, dok je kod 121 slučaja adenokarcinom bio histopatološki potvrđen. Standardizovan upitnik, koji je sadržao osnovne informacije o starosti, antropometrijskim karakteristikama (visina, težina, ITM) i životnim navikama (status pušenja, konzumiranje alkohola, fizička aktivnost, lična i porodična anamneza) je popunjen za svakog pacijenta od strane obučenog medicinskog osoblja. ITM je računat po formuli: telesna težina (kg) / telesna visina² (m²). Zbog nepotpunih podataka, 16 pacijenata je isključeno iz studije, a nepotpune laboratorijske analize u slučaju specifičnog lipidnog profilisanja su uzrokovale isključenje još 6 dodatnih uzoraka, tako da je konačnu grupu za ovaj deo istraživanja činilo 99 pacijenata sa CRC. S obzirom na stroge analitičke zahteve kada su u pitanju uzorci za genetske analize i uspešnost testiranja, ciljne grupe su u daljem toku istraživanja bile redukovane na sledeći način: određivanje koncentracije IGF1 i E-kadherina, kao i genotipizacija ispitanika za SNP *IGF1* je obuhvatila 70 pacijenata sa klinički potvrđenim CRC. Analize nivoa Adipor1, Adipor2 i genske ekspresije TNF- α , kao i genotipizacija za polimorfizme *ADIPOQ* i *ADIPOR1* i *TNF- α* su sprovedeni na grupi od 73 pacijenata, dok je grupa za određivanje plazmatske koncentracije i genske ekspresije rezistina, ekspresije CAP-1 kao i genotipa u okviru *RETN* gena uključivala 86 pacijenata.

Gradusi i stadijumi CRC su bili određeni histopatološkim ispitivanjem resektovanog tumorskog tkiva. Prema histološkom gradusu definisane su sledeće kategorije: gradus I - dobro diferenciran tumor, gradus II - srednje diferenciran tumor, gradus III - slabo diferenciran tumor. Podela po stadijumima CRC je izvedena upotrebom Astler-Coller klasifikacionog sistema (slika 14).

Kontrolna grupa se sastojala od 101 odraslog zdravog dobrovoljca koji je pristupio redovnom godišnjem lekarskom pregledu u Opštoj bolnici Medigroup u Beogradu. Svi učesnici su zadovoljili kriterijume za uključivanje u studiju: odsustvo bilo koje trenutno prisutne ili prethodne maligne bolesti, odsustvo hroničnih bolesti srca, bubrega ili jetre i odsustvo primene hipolipemika. Zdravi ispitanici su anketirani na isti način kao i pacijenti sa CRC. Određivanje koncentracija IGF1, E-kadherina i genotipizacija ispitanika za polimorfizam *IGF1* je obuhvatila 75 zdravih osoba. Genotipizacija za polimorfizme *ADIPOQ*, *ADIPOR1* i *TNF- α* sa određivanjem nivoa genske ekspresije adiponektinskih receptora i TNF- α su sprovedeni u grupi od 80 zdravih ispitanika. Koncentracija rezistina, ekspresija

gena rezistina i CAP-1, kao i genotipizacija za polimorfizam *RETN* su izvedeni u grupi od 75 zdravih dobrovoljaca.



Slika 14. Klasifikacija pacijenata na osnovu gradusa i stadijuma po Astler-Coller sistemu

Svi učesnici su potpisali informisani pristanak pre uključivanja u studiju. Čitav protokol studije je dizajniran i sproveden u skladu sa etičkim smernicama definisanim Helsinškom deklaracijom i odobrenim od strane etičkih komiteta Vojnomedicinske akademije, Opšte bolnice Medigroup i Farmaceutskog fakulteta.

3.2 Metode

3.2.1 Osnovne biohemijske analize

Uzorci krvi su uzimani od pacijenata sa CRC neposredno pre početka hirurške procedure, dok je kod zdravih ispitanika uzorkovanje vršeno u jutarnjim časovima, nakon dvanaestočasovnog gladovanja. Za uzorkovanje su korišćeni vakutejner sistemi sa EDTA kao antikoagulansom za dobijanje plazme, dok su za izdvajanje seruma korišćene serum-aktivator epruvete (BD Vacutainer®, New Jersey, USA). Plazma i serum su izdvojeni centrifugiranjem na brzini od 1500g tokom 10, odnosno 15 minuta u slučaju seruma. Alikvoti uzoraka su sakupljeni i čuvani na -80°C do odmrzavanja koje je rađeno neposredno pre sprovođenja analiza.

Koncentracije glukoze, ukupnih proteina, albumina, UH, TG, LDL-h i HDL-h su određivane rutinskim laboratorijskim enzimskim i kolorimetrijskim metodama (Biosystems, Spain) na automatskom analizatoru ILab 300+ (Instrumentation Laboratory, Bedford, Massachusetts, USA).

3.2.2 Određivanje aktivnosti enzima LCAT i CETP

Za određivanje aktivnosti LCAT i CETP je korišćena procedura koju su prethodno opisali Asztalos i Fielding [179]. Određivanje aktivnosti ova dva enzima je podrazumevalo merenje koncentracija slobodnog holesterola (SH) i UH (Bioanalitica, Beograd, Srbija) i izdvajanje HDL frakcije precipitacionim reagensom proizvođača Biosystems, Barcelona, Španija. Kako je LCAT odgovoran za esterifikaciju holesterola u plazmi, merenje aktivnosti LCAT se zasnivalo na utvrđivanju razlika u količini SH pre i posle dvočasovne inkubacije uzoraka na 37°C [179]. Aktivnost LCAT je prema tome bila izračunata prema sledećoj formuli:

$$\text{aktivnost LCAT } (\mu\text{mol/L/h}) = ([\text{SH pre inkubacije}] - [\text{SH posle inkubacije}]) \times 1000/2$$

Aktivnost CETP je procenjena na osnovu intenziteta CETP-posredovanog bidirekcionog prenosa holesterol estara između HDL i lipoproteina bogatih TG, pre i nakon inkubacije uzoraka na 37°C tokom 2 sata. Analizirana je ukupna aktivnost CETP bez obzira na smer prenosa holesterol estara. Prema tome, praćeno je smanjenje u količini slobodnog holesterola u plazmi, kao i promene u količini holesterol estara u HDL frakciji. Promene u koncentraciji holesterol estara su dobijene oduzimanjem koncentracija SH od koncentracija UH u HDL frakciji datog uzorka pre i nakon inkubacije od 2h (prema tome, izmerene su koncentracije SH i UH u inicijalnoj HDL frakciji pre inkubacije, a zatim su koncentracije SH i UH određene u finalnoj HDL frakciji nakon inkubacije). Proračun je izvršen prema sledećoj jednačini:

$$\text{aktivnost CETP } (\mu\text{mol/L/h}) = [(\text{inicijalni plazma SH} - \text{finalni plazma SH})] - [(\text{finalni HDL-UH} - \text{finalni HDL-SH}) - (\text{inicijalni HDL-UH} - \text{inicijalni HDL-SH})] \times 1000/2$$

HDL frakcija je izolovana uz korišćenje precipitirajućeg reagensa koji je sadržao fosfovolframovu kiselinu i jone magnezijuma za taloženje lipoproteinskih čestica koje sadrže apoB.

3.2.3 Parametri redoks statusa

Paraoksonazna aktivnost enzima PON-1 je određena prema paraoksonu kao supstratu, odnosno na osnovu konverzije paraoksiona u p-nitrofenoksidni anjon, čiji je maksimum apsorbancije praćen kinetički na 405 nm [180]. Arilesterazna aktivnost PON-1 je određena spektrofotometrijski, merenjem brzine hidrolize fenilacetata preko povećanja apsorbancije fenola na 270 nm [181]. Da bismo ispitali fenotip PON-1 kod ispitanika, grafički smo predstavili arilesteraznu aktivnost PON-1 naspram paraoksonazne aktivnosti [182]. Na ovaj način su se izdvojila dva različita fenotipa: fenotip A sa niskom aktivnošću paraoksonaze i fenotip B sa visokom aktivnošću paraoksonaze.

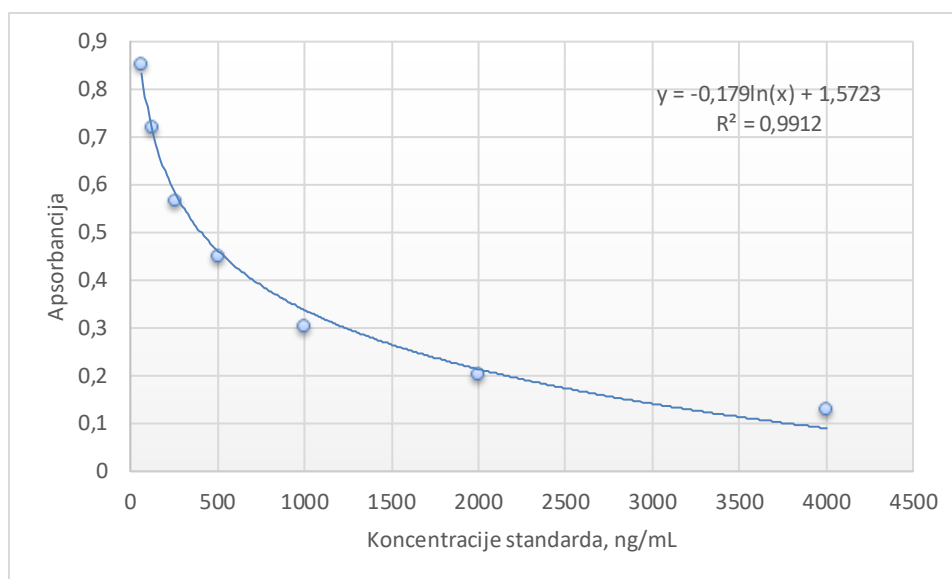
Modifikovana metoda Hamidi-Alamdari i sar. [86] je korišćena za određivanje PAB. Ova metoda se zasnivala na upotrebi tetrametilbenzidin-katjona za reakciju sa prooksidansima i antioksidansima

istovremeno. Kapacitet prooksidanasa je kalibrisan prema vodonik-peroksidu, dok je kalibracija antioksidanasa izvršena prema mokraćnoj kiselini. Rastvori od 1mmol/L H₂O₂ i 3mmol/L mokraćne kiseline u različitim odnosima su korišćeni kao standardi za pravljenje kalibracione krive.

3.2.4 Određivanje masene koncentracije CETP, IGF1, E-kadherina i rezistina

3.2.4.1 Određivanje masene koncentracije CETP

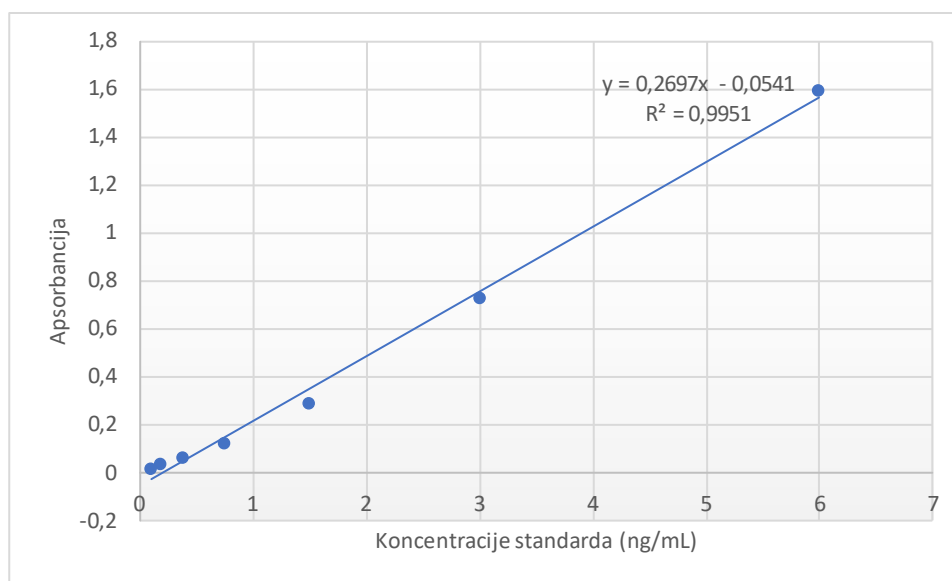
Masena koncentracija CETP je određena komercijalnim ELISA testom (Cell Biolabs, Inc, USA). Ova metoda je podrazumevala oblaganje ELISA ploče prethodno razblaženim CETP konjugatom (1:1000, za razblaženje je korišćen PBS), a zatim je inkubacija vršena preko noći na 4⁰C. Višak nevezanog konjugata je uklonjen ispiranjem fosfatnim puferom (PBS). Zatim je dodata propisana količina komercijalnog test diluenta radi blokiranja nevezanih mesta na ploči, a ovako pripremljena ploča inkubirana je 1h na sobnoj temperaturi. Nakon uklanjanja rastvora, uzorci i standardi su nanoseni u odgovarajuća polja. Za pravljenje razblaženja uzoraka (1:5), korišćen je 0,1% rastvor goveđeg serumskog albumina u PBS, dok su standardi rekonstituisani i razblaženi test diluentom. Standardna kriva je konstruisana iz standarda sledećih koncentracija: 4000 ng/mL, 2000 ng/mL, 1000 ng/mL, 500 ng/mL, 250 ng/mL, 125 ng/mL i 62,5 ng/mL. Slepnu probu je predstavljao test diluent. Usledila je jednočasovna inkubacija uzoraka sa prethodno razblaženim anti-CETP antitelom (1:500, za razblaženje je korišćen test diluent). Nakon ispiranja (*Wash solution*), dodato je prethodno razblaženo sekundarno antitelo (1:1000, za razblaženje je korišćen test diluent) sa konjugatom streptavidin-peroksidaza iz rena (*HRP* konjugat). Ploča je inkubirana 1h. Posle ispiranja konjugata, dodat je rastvor supstrata, odnosno 3,3',5,5'-tetrametilbenzidin koji se u prisustvu peroksidaze rena i H₂O₂ oksidovao do plavo obojenog jedinjenja. Reakcija je nakon 30 min. zaustavljena stop rastvorom sumporne kiseline, uz promenu boje iz plave u žutu. Merenje intenziteta obojenja je vršeno kolorimetrijski na ELISA čitaču (LKB Vertriebs GmbH, Beč, Austrija) na talasnoj dužini od 450 nm. Standardna kriva za određivanje masene koncentracije CETP je data na slici 15.



Slika 15. Standardna kriva za određivanje masene koncentracije CETP

3.2.4.2 Određivanje masene koncentracije IGF1

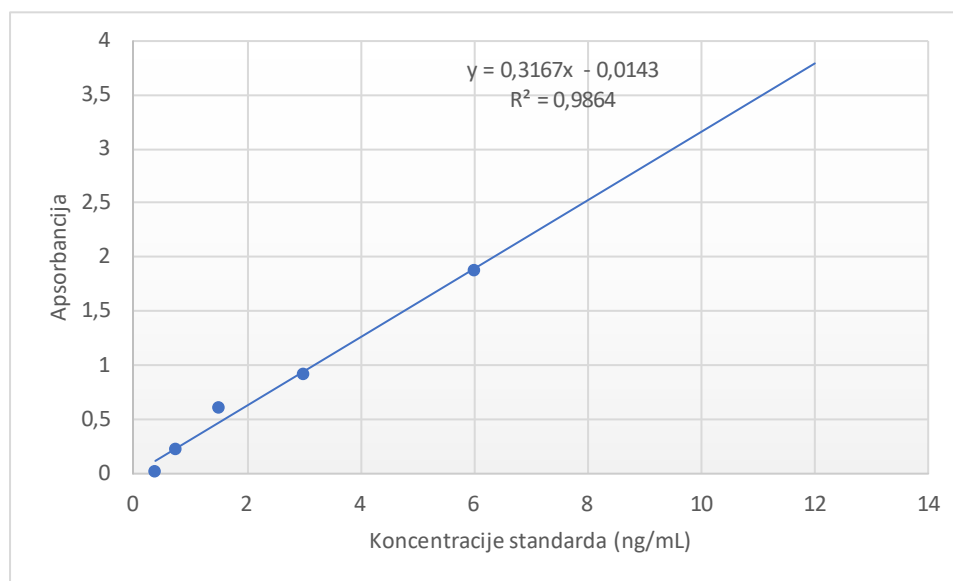
Za određivanje IGF1, korišćena je komercijalna ploča sa već impregniranim primarnim antitelom (*Human IGF1*, R&D Systems, Inc. Minneapolis, MN, USA) specifičnim za IGF1 epitop. Nanošenju razblaženih rastvora standarda i uzoraka (1:100, za razblaženje je korišćen komercijalan rastvor za pretretman uzoraka) na ploču, je prethodio dodatak test diluenta. Standardi korišćeni za konstrukciju kalibracione krive su bili sledećih koncentracija: 6 ng/mL, 3 ng/mL, 1,5 ng/mL, 0,75 ng/mL, 0,375 ng/mL, 0,188 ng/mL i 0,094 ng/mL. Potom je usledila inkubacija ploče na 2-8⁰C tokom perioda od 2h. Nakon ispiranja ploče odgovarajućim rastvorom (*Wash solution*), u bunarčice je dodato sekundarno antitelo spregnuto sa enzimom (*HRP* konjugat). Usledila je jednočasovna inkubacija na hladnom. Nakon ispiranja, uzorcima je dodat rastvor supstrata kako bi došlo do razvijanja boje. Razvijanje boje je nakon 30 min. zaustavljeno i intenzitet boje je izmeren kolorimetrijski na 450 nm. Standardna kriva za određivanje masene koncentracije IGF1 je data na slici 16.



Slika 16. Standardna kriva za određivanje masene koncentracije IGF1

3.2.4.3 Određivanje masene koncentracije E-kadherina

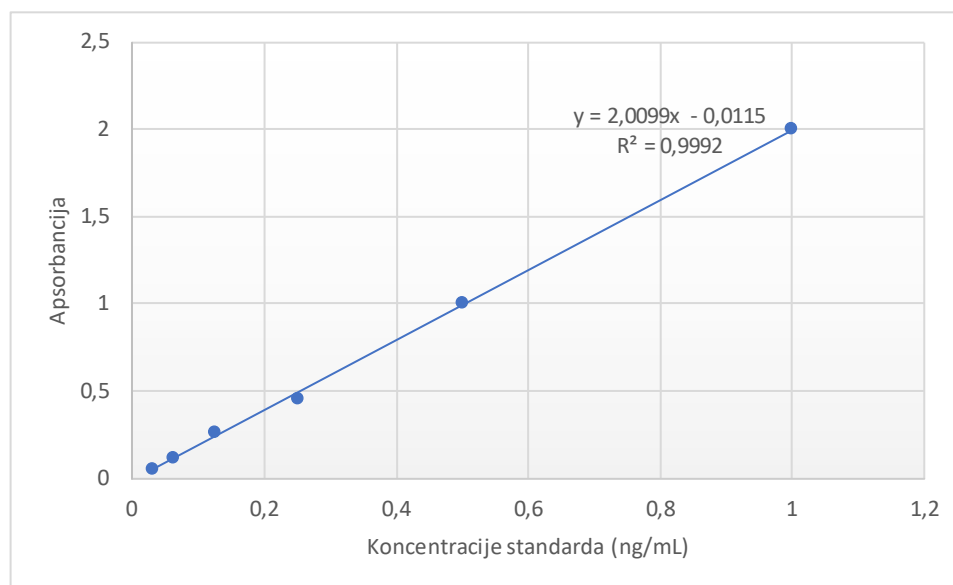
Za određivanje E-kadherina je korišćen *Human E-kadherin DuoSet Elisa kit* (R&D Systems, Inc. Minneapolis, MN, USA). Nakon rekonstitucije i dilucije primarnog antitela do radne koncentracije PBS-om, usledilo je razlivanje u odgovarajuće ploče (maxisorb) i inkubacija preko noći. Posle ispiranja nevezanog antitela (*Wash* rastvor je predstavljao 0,05% rastvor *Tween 20* deterdženta u PBS), ploča je blokirana reagens diluentom, odnosno 1% rastvorom goveđeg serumskog albumina u PBS. Zatim su uzorci i standardi nanoseni u za to predviđena polja na ploči. Uzorci su razblaženi u odnosu 1:100 reagens diluentom, koji je ujedno korišćen i za pravljenje odgovarajućih razblaženja standarda. Standardna kriva je konstruisana iz standarda sledećih koncentracija: 12 ng/mL, 6 ng/mL, 3 ng/mL, 1,5 ng/mL, 0,75 ng/mL, 0,375 ng/mL, 0,1875 ng/mL. Za slepu probu je korišćen reagens diluent. Ploča je inkubirana 2h, nakon čega je usledilo njeno ispiranje i dodatak detekcionog antitela (radna koncentracija je dobijena razblaženjem sa reagens diluentom). Inkubacija je vršena narednih 2h, da bi se nakon ispiranja detekcionog antitela dodao radni rastvor streptavidin-HRP konjugat. Nakon inkubacije od 20 min ploča je isprana, te je dodat rastvor supstrata. Posle određenog vremena i razvoja boje reakcija je zaustavljena stop reagensom. Merenje intenziteta obojenja je vršeno na 450 nm. Standardna kriva za određivanje masene koncentracije E-kadherina je data na slici 17.



Slika 17. Standardna kriva za određivanje masene koncentracije E-kadherina

3.2.4.4 Određivanje masene koncentracije rezistina

Za određivanje koncentracije rezistina je korišćen *Human Resistin DuoSet Elisa kit* (R&D Systems, Inc. Minneapolis, MN, USA). Ploča je obložena primarnim antitelom razblaženim sa PBS do odgovarajuće radne koncentracije i inkubirana preko noći. Nakon ispiranja nevezanog antitela (*Wash* rastvor je predstavljao 0,05% rastvor *Tween 20* deterdženta u PBS) i blokiranja ploče 1% rastvorom goveđeg serumskog albumina u PBS (reagens diluent), dodata je propisana zapremina prethodno razblaženih uzoraka i pripremljenih standardnih rastvora. Uzorci su razblaženi u odnosu 1:80 reagens duluentom, koji je ujedno korišćen i za pravljenje odgovarajućih razblaženja standarda. Standardna kriva je konstruisana iz standarda sledećih koncentracija: 2 ng/mL, 1 ng/mL, 0,5 ng/mL, 0,25 ng/mL, 0,125 ng/mL, 0,0625 ng/mL, 0,0313 ng/mL. Nakon dvočasovne inkubacije i ispiranja ploče, u bunarčice je dodato detekciono antitelo (razblaženo reagens diluentom do radne koncentracije). Usledila je inkubacija od 2h, praćena ispiranjem i dodavanjem streptavidin-HRP konjugata. Nakon 20 min. je ponovljen postupak ispiranja i dodat rastvor supstrata. Boja se razvijala sledećih 20 min, a onda je reakcija stopirana rastvorom sumporne kiseline. Očitavanje intenziteta obojenja je izvršeno uz pomoć ELISA čitača na 450 nm talasne dužine. Standardna kriva za određivanje koncentracije rezistina je data na slici 18.

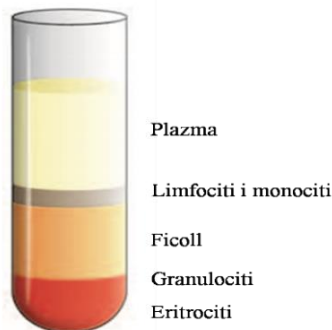


Slika 18. Standardna kriva za određivanje koncentracije rezistina

3.2.5 Određivanje genske ekspresije i polimorfizama ciljnih gena

3.2.5.1 Izolacija mononuklearnih ćelija periferne krvi

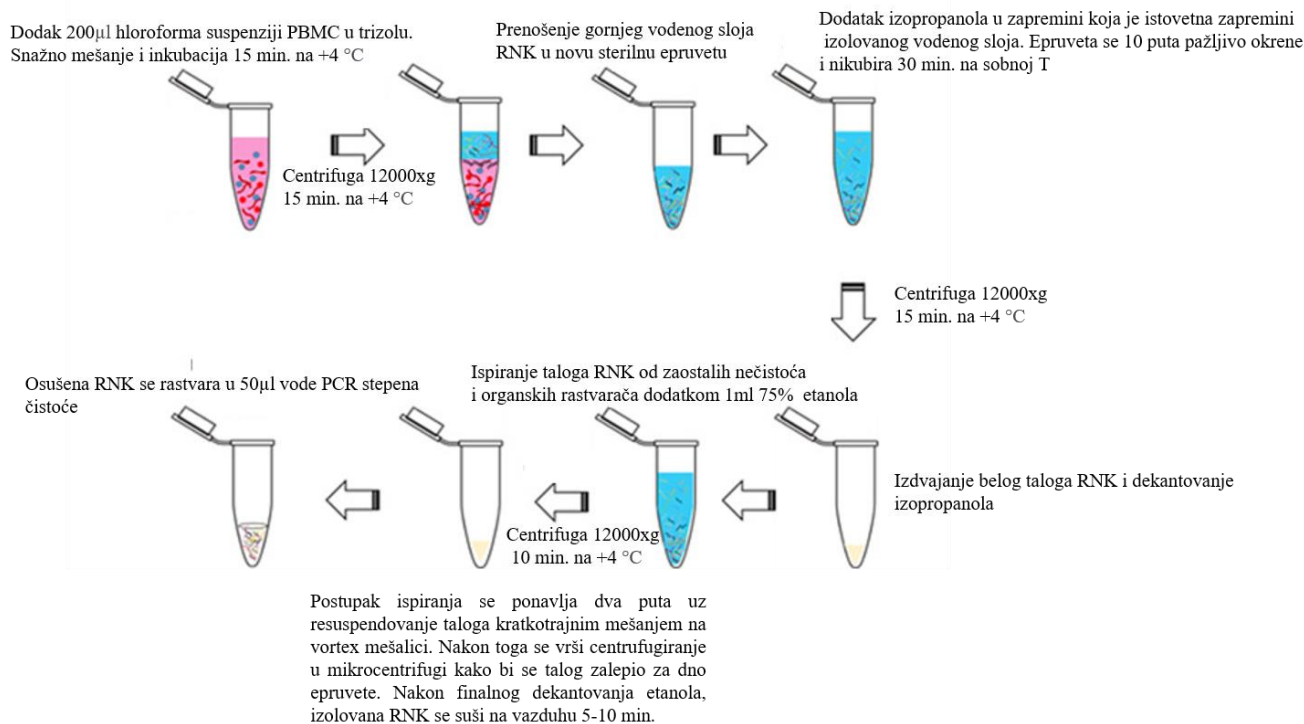
Za izdvajanje PBMC iz EDTA uzoraka krvi je korišćen *Ficoll-Paque*™ *PLUS* medijum (GE Healthcare, Vaukesha, Wisconsin, USA) sa gradijentom gustine. Nakon centrifugiranja uzoraka pune krvi sa dodatim EDTA, u središnjem delu, ispod sloja plazme, a iznad eritrocita se izdvaja “buffy coat”, sloj koji predstavlja koncentrovanu suspenziju leukocita. Sakupljeni “buffy coat” zajedno sa određenom količinom plazme i eritrocita se nanosi na 2 mL prethodno pripremljenog *Ficoll-Paque*™ *PLUS* medijuma. Sledstvenim centrifugiranjem (20 min. na 1000g) dolazi do razdvajanja slojeva ćelija. Centrifugalna sila omogućava da se u okviru središnjeg sloja pozicioniraju PBMC (slika 19) sa procentualno najzastupljenijim limfocitima, zatim monocitima, NK i dendritičnim ćelijama. Prikupljeni PBMC se dva puta ispiraju fosfatnim puferom (PBS) i talože centrifugiranjem (prvo centrifugiranje 5 min. na 750g, a drugo 5 min na 500g). Dobijenom talogu ćelija se dodaje 1mL *TRIzol*™ reagens (Ambion, Life technologies, Grand Island, NewYork), sa komponentama (gvanidin-izotiocijanat, fenol, beta merkaptotanol) koje omogućavaju lizu ćelija, ali i očuvanje oslobođenih ukupnih ribonukleinskih kiselina (uRNK). Ovako pripremljeni uzorci se čuvaju na - 80 °C do izolacije uRNK.



Slika 19. Razdvajanje ćelija na *Ficoll-Paque*™ *PLUS* gradijent medijumu. Preuzeto uz adaptaciju na srpski: <https://www.sigmaaldrich.com/RS/en/technical-documents/protocol/clinical-testing-and-diagnostics-manufacturing/hematology/recommended-standard-method>

3.2.5.2 Izolacija RNK

Izolacija uRNK je izvršena u skladu sa prilagođenim protokolom proizvođača *TRIzol*™ reagensa [183]. Ukratko, dodatkom hloroforma (Serva, Heidelberg, Nemačka) ćelijskoj suspenziji, odnosno nukleinskim kiselinama sa *TRIzol*™ reagensom i sledstvenim intenzivnim mešanjem dolazi do preraspodele genetskog materijala i to tako da se RNK izdvaja u gornjem vodenom sloju, genomska DNK (gDNK) prelazi u međusloj, dok se proteini nalaze u donjem, fenol-hloroformskom sloju. Nakon pažljivog prebacivanja gornjeg vodenog sloja u novu sterilnu epruvetu, precipitacija uRNK se vrši 30-minutnom inkubacijom sa izopropanolom (Serva, Heidelberg, Nemačka). Ispiranje taloga od zaostataka organskih rastvarača se izvodi dodatkom 75% etanola, da bi potom usledilo postepeno sušenje taloga RNK na vazduhu i na kraju rastvaranje u vodi PCR čistoće (PCR grade water, Ambion, Austin, Texas, USA). Detaljan postupak izolacije RNK predstavljen na slici 20.



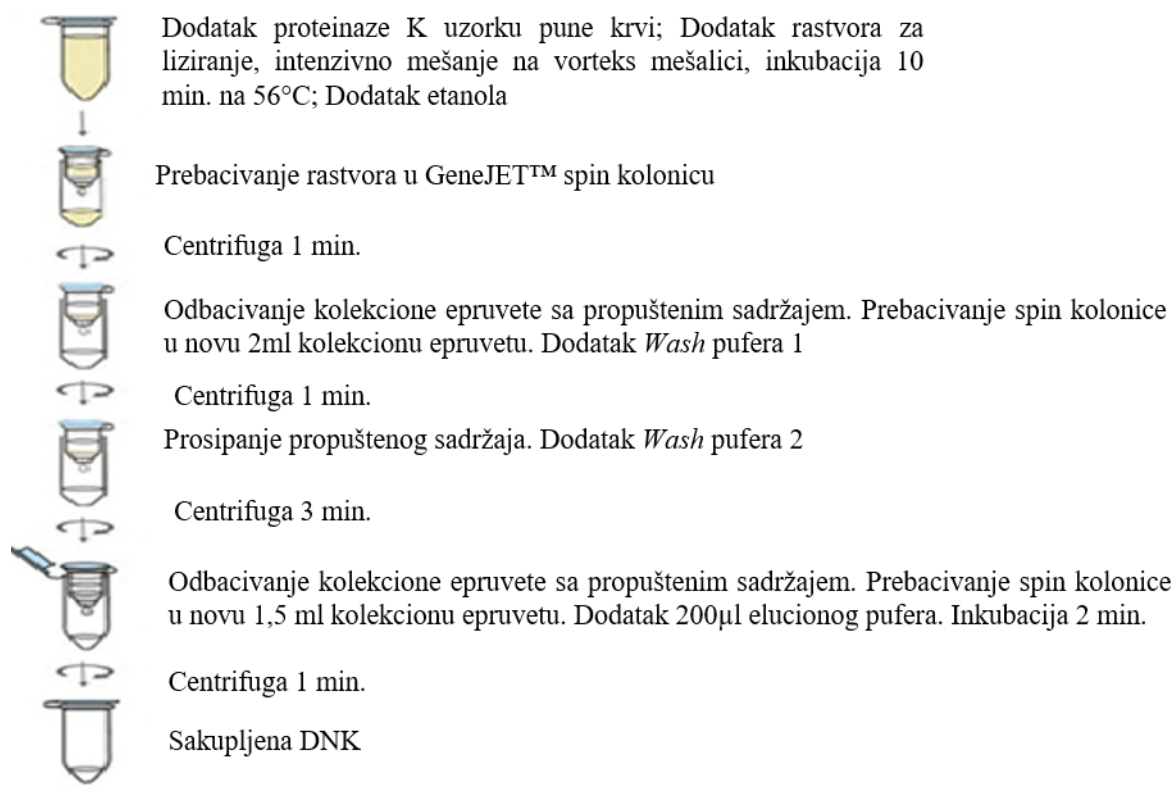
Slika br 20. Šematski prikaz izolacije uRNK prilagođenim protokolom proizvođača *TRIzol*™ reagensa.

Preuzeto uz adaptaciju na srpski: Cortés-Maldonado L, Marcial-Quino J, Gómez-Manzo S, Fierro F, Tomasini A. A method for the extraction of high quality fungal RNA suitable for RNA-seq. *Journal of microbiological methods*. 2020 Mar 1; 170:105855.

3.2.5.3 Izolacija DNK

Iz vakutejnera sa EDTA je izdvojeno 200 μ L pune krvi i prebačeno u sterilnu epruvetu za potrebe izolacije gDNK. U te svrhe je korišćen komercijalni mini set za prečišćavanje gDNK iz pune krvi (*GeneJET™ Whole Blood Genomic DNA Purification Mini Kit*, Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham, Massachusetts, USA). Set je dizajniran tako da zameni tečno-tečnu ekstrakciju pri kojoj se koriste toksični organski rastvarači. Ovaj tip čvrsto-tečne ekstrakcije je baziran na primeni membrana impregniranih silikom koje su smeštene u odgovarajuće kolonice. Princip testa podrazumeva 10-minutnu digestiju uzorka sa proteinazom K u lizirajućem rastvoru na 56°C. Lizat se potom pomeša sa etanolom i nanosi na prečišćavajuće kolonice. Prolaskom uzorka dolazi do vezivanja DNK za silika-membranu. Nečistoće se u ovoj fazi ispiraju primenom različitih *Wash* pufera, određenih jonskih jačina.

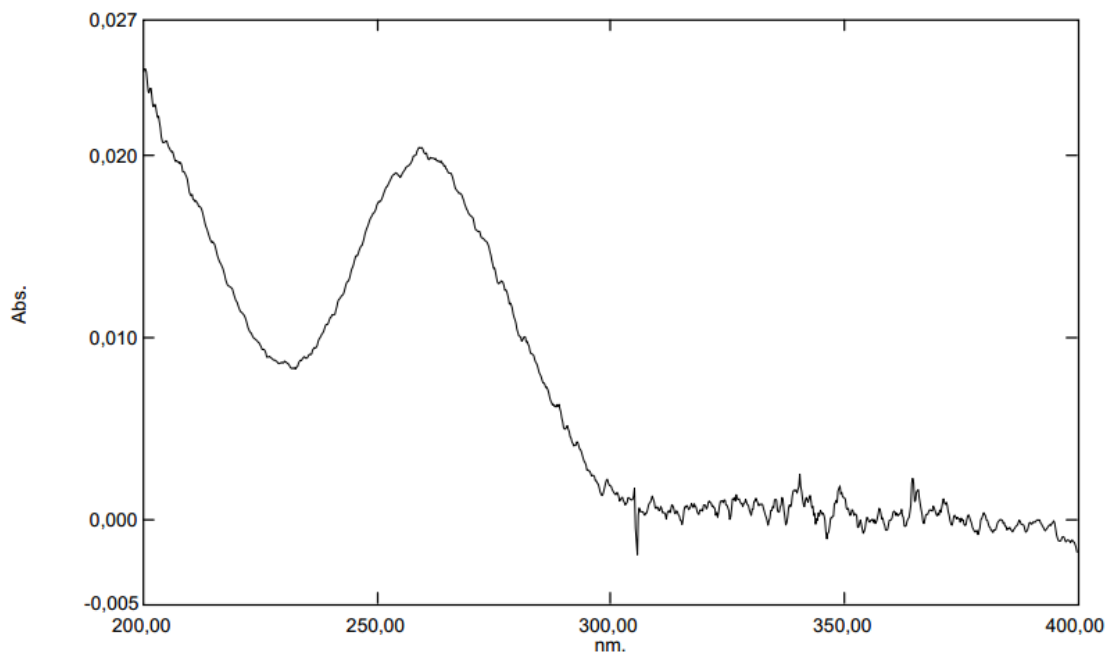
gDNK se primenom elucionog pufera poslednja ispira sa kolonice u odgovarajuće sterilne epruvete u kojima se čuva do genotipizacije. Šematski prikaz je dat na slici 21.



Slika 21. Šematski prikaz izolacije DNK (*GeneJET™ Whole Blood Genomic DNA Purification Mini Kit*). Preuzeto uz adaptaciju na srpski: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/K0781#/K0781>

3.2.5.4 Ispitivanje kvaliteta i integriteta izolovanih nukleinskih kiselina

Provera čistoće izolovanih nukleinskih kiselina, kao i izračunavanje njihovih koncentracija se vrši spektrofotometrijski tako što se izmeri apsorbcija razblaženog rastvora DNK ili RNK (5 μ l rastvora izolovane DNK ili RNK se pomeša sa 495 μ l *aqua pro injeksione*) na više talasnih dužina: 230, 240, 260, 280 i 320 nm. Odnosi apsorbcija na 260/230, 260/280 i 260/240 nm se koriste za utvrđivanje prisustva različitih onečišćenja. Ukoliko je odnos apsorbcija na 260/230 nm manji od 2, takav rezultat obično ukazuje na kontaminaciju rastvora nukleinske kiseline, organskim rastvaračima. Ukoliko je odnos apsorbcija na 260/280 nm <1,7 u slučaju DNK, odnosno <1,9 u slučaju RNK, može se posumnjati na kontaminaciju proteinima. Odnos apsorbcija na 260/240 nm služi za proveru kontaminacije solima koja postoji u slučaju da je ovaj odnos <1,4. Apсорbcija na 320 nm u rastvorima čistih, potpuno rastvorenih nukleinskih kiselina treba da bude jednaka nuli. Adekvatan apsorpcioni spektar rastvora nukleinske kiseline zauzima formu kao na slici 22:



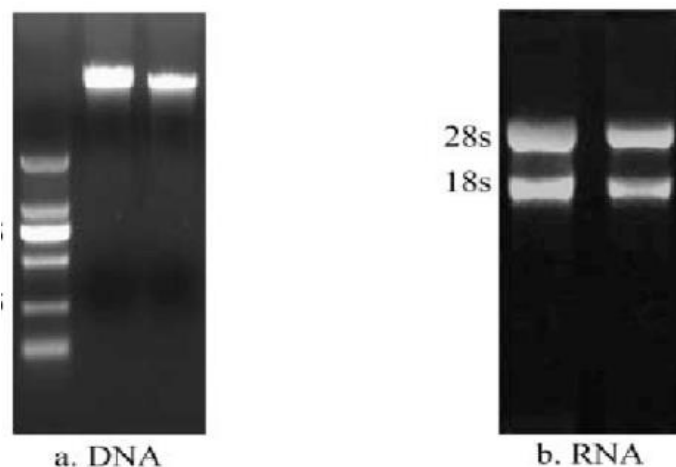
Slika 22. Apсорpcioni spektar rastvora RNK snimljen na UV-1800 spektrofotometru (Shimadzu, Japan)

Za izračunavanje koncentracije RNK, odnosno DNK se koristi formula koja uključuje faktor razblaženja, molarni ekstincioni koeficijent i apsorbciju rastvora odgovarajuće nukleinske kiseline na 260 nm.

$[DNK] = A_{260} \cdot \text{faktor razblaženja uzorka} \cdot \epsilon$; ϵ - molarni ekstincioni koeficijent na talasnoj dužini od 260 nm iznosi 50 μ g/mL za DNK

$[RNK] = A_{260} \cdot \text{faktor razblaženja uzorka} \cdot \epsilon$; ϵ - molarni ekstincioni koeficijent na talasnoj dužini od 260 nm iznosi 40 $\mu\text{g/mL}$ za RNK

Pored stepena onečišćenja, neophodno je ispitati i integritet nukleinskih kiselina. U te svrhe se izvodi horizontalna *submarine* elektroforeza (Hofer Super Sub, Amersham Pharmacia Biotech) na 1% agaroznom gelu i temperaturi od 4°C. Za izvođenje elektroforeze se koristi TRIS-EDTA-acetatni pufer, kojim se postiže pH vrednost od 8,3, pri kojoj su nukleinske kiseline negativno naelektrisane i kreću se ka anodi. Za pripremu TRIS-EDTA-acetatnog pufera, odmerene količine trokomponentnog pufera (12,1g TRIS, 0,93 g dinatrijumove soli EDTA i 2,86 mL glacijalne sirćetne kiseline) se rastvaraju u 250 mL dejonizovane vode. Od ovog rastvora se pravi razblažen radni rastvor pufera (1:10) koji se koristi za elektroforezu. Agarozni gel se formira rastvaranjem 0,75 g "low melting" agaroze u 75 mL radnog rastvora TRIS-EDTA-acetatnog pufera, nakon čega se rastvor zagreva, a zatim hladi do temperature od 65°C i izliva u sistemu za izlivanje gela (*HE 100 casting kit*, Amersham Pharmacia Biotech). Uzorci se nanose na mesta za aplikaciju na agaroznom gelu, uz dodatak *Ficoll-Paque™ PLUS* i boje brom-fenol plavo (2,6 mL Ficoll-Paque i 0,025g brom-fenol-plavog se rastvara u 10 mL vode). Elektroforeza nukleinskih kiselina se izvodi pod sledećim uslovima: 140V, 170mA pri čemu razdvajanje traje 30 min. Nakon prekidanja elektroforeze, nukleinske kiseline se boje fluorescentnom bojom *SybrGreen I* za DNK, odnosno *SybrGreen II* za RNK (ThermoFischer Scientific, Waltham, Massachusetts, USA), kako bi se razdvojene frakcije analizirale na transiluminatoru pod UV svetlom. Jasno uočljive oštre frakcije 28S i 18S ribozomalne RNK potvrđuju prisustvo iRNK očuvanog integriteta. S obzirom da je iRNK zastupljena u manjem procentu u uRNK, ona se ne može direktno detektovati, ali s obzirom da se nalazi u regionu između ribozomalnih RNK, na ovaj način se posredno proverava i njen integritet. Sa druge strane, DNK dobrog kvaliteta sa dosta baznih parova se uočava kao široka traka u blizini starta. Izgled elektroforegrama DNK i RNK je prikazan na slici 23.



Slika 23. Izgled elektroforegrama: a) DNK, b) RNK.

Preuzeto iz: Yao D, Huo X, Zenda T, Liu S, Liu Y, Dai L, Duan H. Effects of ethephon on DNA methylation and gene expressions associated with shortened internodes in maize. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*. 2018 Jan 2;32(1):30-40.

3.2.5.5 Reverzna transkripcija

Uzorci uRNK koji su zadovoljili prethodno navedene kriterijume integriteta i čistoće su ušli u fazu reverzne transkripcije (RT) koja je vodila ka sintezi jednolančane komplementarne DNK (cDNK). U ove svrhe je korišćen *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). S obzirom da se sve komponente komercijalnog seta za RT dobijaju u koncentrovanom obliku, bilo je neophodno pratiti preporuke proizvođača o dodavanju određene zapremine svake od komponenti seta kako bi se postigla njihova željena koncentracija u finalnoj zapremini reakcione smeše od 20 μL . U sastav seta je ulazio pufer neophodan za održavanje optimalne pH vrednosti reakcije. S obzirom da je pufer za RT dopremljen u inicijalnoj koncentraciji 10 puta većoj u odnosu na preporučenu, u sklopu finalne reakcione smeše je dodato 2 μL RT pufera. Nasumični prajmeri su predstavljali kratke sekvence nukleotida koje su se vezivale za komplementarne baze na RNK. Prema uputstvu je dodato 2 μL prajmera po reakciji. Da bi se postigla odgovarajuća koncentracija deoksiribonukleotid trifosfata (dNTP), 0,8 μL dNTP je ulazilo u finalnu reakciju. Enzim, reverzna transkriptaza je dodavan u zapremini od 1 μL . S obzirom da se reverzna transkriptaza aktivira već na sobnoj temperaturi, mešanje komponenti seta je vršeno na ledu kako ne bi došlo do nekontrolisanog procesa RT, odnosno kako RT ne bi otpočela još na sobnoj temperaturi. Voda PCR stepena čistoće je dodavana u zapremini od 4,2 μL . Konačno, u reakciju je dodato 10 μL izolovane RNK uzorka. Svi uzorci RNK su za potrebe reakcije RT svedeni na istu koncentraciju od 30 ng/ μL , razblaživanjem inicijalnih rastvora izolovane nukleinske kiseline vodom PCR čistoće. Primenom temperaturnih inkubacija (1. inkubacija: 25°C, 10 min; 2. inkubacija: 37°C, 120 min; 3. inkubacija: 85°C, 5 min.) izvršena je konverzija RNK u jednolančanu cDNK. Naime, inkubacija na 25°C u trajanju od 10 minuta je obezbedila vezivanje prajmera za matricu RNK, RT (sinteza cDNK) se odvijala na 37°C u trajanju od 120 min, dok se deaktivacija reverzne transkriptaze dešavala na 85°C u trajanju od 5 minuta.

U svrhe provere kontaminacije reagenasa gDNK, korišćena je kontrola bez reverzne transkriptaze (TF, *transcriptase free control*) koja je sadržala sve komponente reakcione smeše za RT sem reverzne transkriptaze, dok je drugi vid provere kontaminacije reagenasa predstavljala NTRT kontrola (*no template reverse transcription control*), koja je sadržala sve komponente za RT sem uzorka. RT je izvršena na uređaju 7500 Real-time PCR system (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

3.2.5.6 Kvantitativni PCR (qPCR)

Lančana reakcija polimeraze u realnom vremenu (*Real-Time Polymerase Chain Reaction*), primenjena u našem istraživanju se zasnivala na *TaqMan* hemiji, što je podrazumevalo upotrebu fluorogeno-obojenih proba koje se podvrgavaju dejstvu 5' nukleazne aktivnosti *Taq* DNK polimeraze. Detekcija amplikona od interesa je bila moguća zahvaljujući oligonukleotidnoj probi koja sadrži tzv. reporter fluorescentnu boju na 5' kraju i prigušivač (*quencher*) na 3' kraju.

3.2.5.7 Metoda relativne standardne krive

Nivoi ekspresije gena su određivani metodom relativne standardne krive. Ova metoda je podrazumevala da se svi uzorci prepisane cDNK koriste u određenoj zapremini za izradu standardne krive. *Pool* uzoraka je napravljen posebno za grupu pacijenata sa CRC, posebno za kontrolne ispitanike. Dodatno, ovaj pristup je nalagao da se za svaki ispitivani gen vrši optimizacija koncentracija standarda koji će se koristiti za izradu krive i to tako da efikasnost PCR reakcije bude između 90-110% što odgovara nagibu krive od $-3,3 \pm 10\%$, uz uslov za koeficijent determinacije $R^2 \geq 0,99$. Krive zadovoljavajućih karakteristika su bile postignute za sledećih pet koncentracija standarda u slučaju CRC i kontrolne grupe: 1,875 ng/ μ L; 0,9375 ng/ μ L; 0,46875 ng/ μ L; 0,234375 ng/ μ L; 0,1171875 ng/ μ L. Standardi različitih koncentracija su dobijeni serijskim razblaživanjem inicijalnog *pool*-a uzoraka čija je početna koncentracija bila 15 ng/ μ L. Primeri standardnih krivi korišćenih u ovom istraživanju su prikazani na slikama 24-26. Nakon optimizacije opsega standardnih rastvora koji su služili za izradu krive, a pre izvođenja same PCR metode, svaki uzorak cDNK je razblažen na vrednost trećeg standarda u nizu, odnosno doveden na koncentraciju od 0,46875 ng/ μ L.

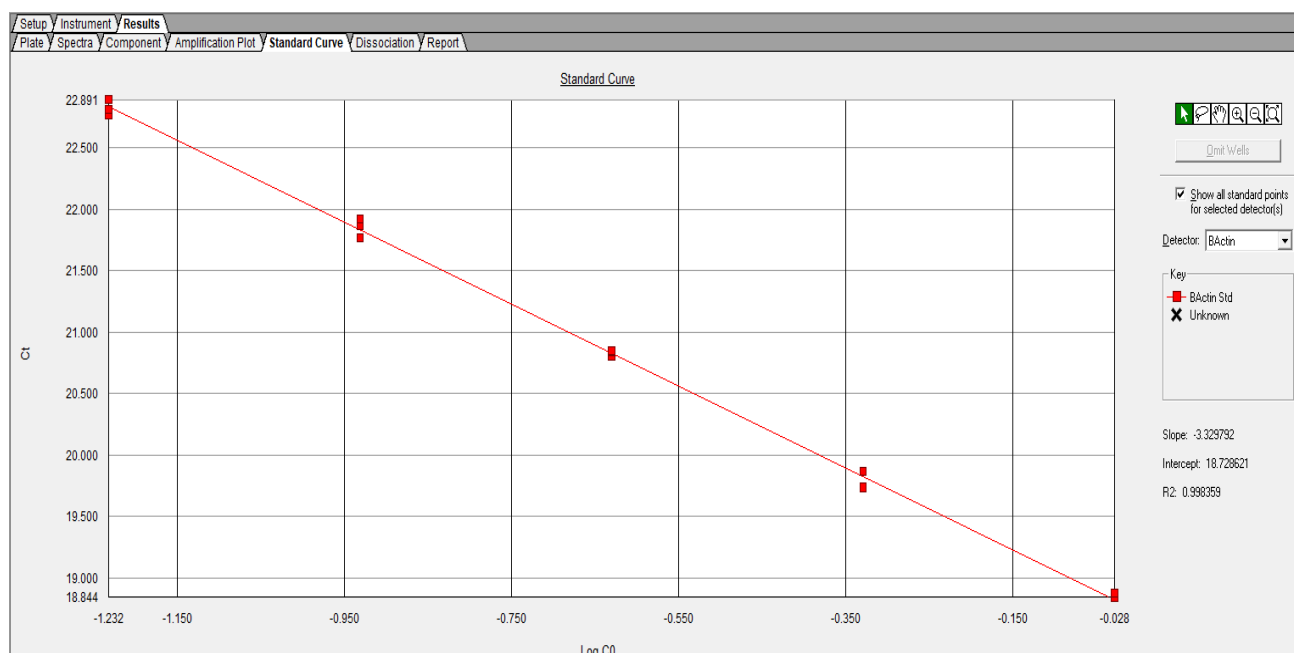
Za qPCR je bilo potrebno 3 μ L 5xHOT FIREPol® *Probe qPCR Mix Plus (ROX)* Master miksa, 0,75 μ L *TaqMan*® eseja za gensku ekspresiju i 5,25 μ L vode PCR čistoće (prikazane zapremine reagenasa se odnose na jednu reakciju). Uzorci cDNK su dodavani u količini od 6 μ L. Sastav 5xHOT FIREPol® *Probe qPCR Mix Plus (ROX)* (Solis BioDyne, Tartu, Estonija) su činili DNK polimeraza, pufer, MgCl₂, dNTP i ROX referentna boja neophodna za normalizaciju fluktuacija u fluorescentnom signalu. *TaqMan* MGB proba obeležena FAM bojom, *forward* i *reverse* prajmeri su predstavljali sastavni deo komercijalnih *TaqMan*® eseja (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA).

Nakon mešanja svih komponenti reakcione smeše uz dodatak standarda, odnosno uzoraka u odgovarajuća polja na ploči, qPCR metoda se izvodila na 7500 Real-time PCR sistemu (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Generisanje fluorescentnog signala se dešavalo tokom 40 ciklusa PCR reakcije. Uslovi PCR su bili podešeni tako da je inicijalna aktivacija HOT FIREPol® DNK polimeraze postignuta inkubacijom enzima na 95°C, 15 min. u toku 1 ciklusa, denaturacija cDNK je izvršena na temperaturi od 95°C u trajanju od 15 sekundi tokom 40 ciklusa, a sledstveno vezivanje prajmera i proba sa polimerizacijom je podrazumevalo temperaturu od 60°C, vreme od 1 min. i 40 ciklusa. Po završetku reakcije, fluorescentni signali su obrađeni SDS softverom (verzija 1.4.0.25).

Prag ciklusa fluorescencije (*Cycle threshold*, Ct) po definiciji je predstavljao PCR ciklus u kome je uzorak svojom fluorescencijom prevazišao fluorescenciju pozadine. U tom ciklusu je dostignuta adekvatna količina amplikona od interesa. Standardna kriva je grafički formirana tako da su logaritmovane vrednosti koncentracija standarda cDNK bile nanosene na x osu, dok su se na y osi nalazile vrednosti Ct ciklusa. Standardne krive su pripremane za svaki gen i to na svakoj ploči. Poznavanjem Ct vrednosti uzorka bilo je lako odrediti nepoznatu koncentraciju cDNK primenom standardne krive. Ipak, zbog mogućih varijacija u pogledu inicijalno unetih količina genetskog materijala, a radi poboljšavanja

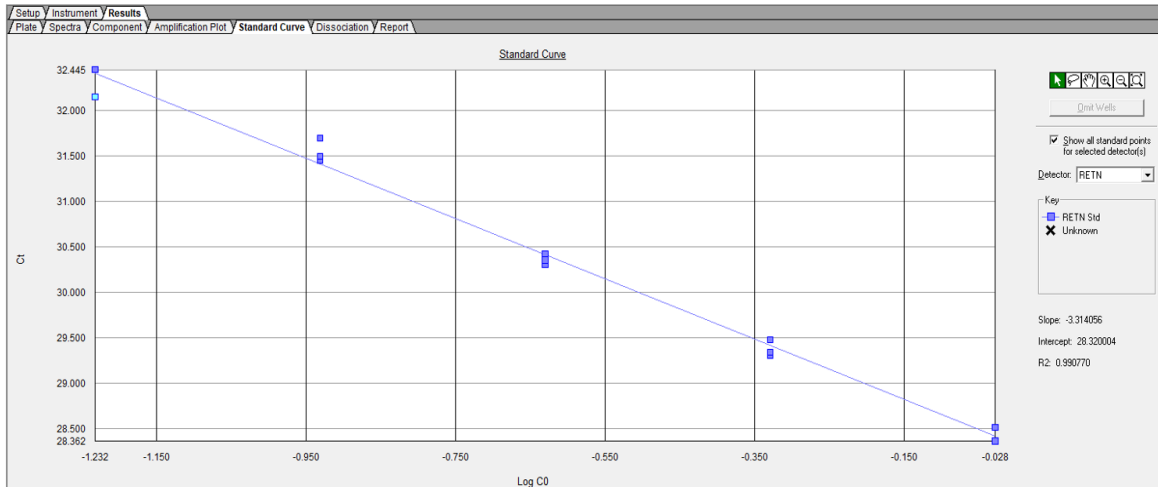
pouzdanosti rezultata, izvršena je normalizacija nivoa cDNK svakog uzorka sa nivoom cDNK konstitutivno eksprimiranog gena. Ovo se može smatrati jednim od vidova endogene kontrole PCR, s obzirom da se za konstitutivni ili *housekeeping* gen bira onaj čija se ekspresija ne menja u ispitivanom patološkom stanju, ali ni pod uticajem fizioloških činilaca, te se na taj način eliminiše uticaj nepoželjnih eksperimentalnih varijacija. Ovo podrazumeva da se pored varijacija nastalih usled grešaka u kvantifikaciji iRNK, neutrališu još i varijacije nastale usled razlika u integritetu RNK, kao i efikasnosti procesa RT, odnosno količine cDNK. U te svrhe, u našem istraživanju je korišćen β aktin. Rezultati su izražavani kao normalizovani nivoi iRNK. Za proveru kontaminacije reagenasa korišćenih u PCR na svakoj ploči je puštana *non template* kontrola (NTC) koja je sadržala sve komponente reakcione smeše sem uzorka.

Određivanje nivoa genskih ekspresija je urađeno pomoću sledećih *TaqMan*® eseja: RETN Hs00220767_m1, CAP-1 Hs00255173_m1; ADIPOR1 Hs01114951_m1; ADIPOR2: Hs00226105_m1; TNF- α : Hs00174128_m1 i β aktin (Hs99999903_m1). Podaci su predstavljeni kao odnos iRNK gena od interesa i iRNK β aktina.

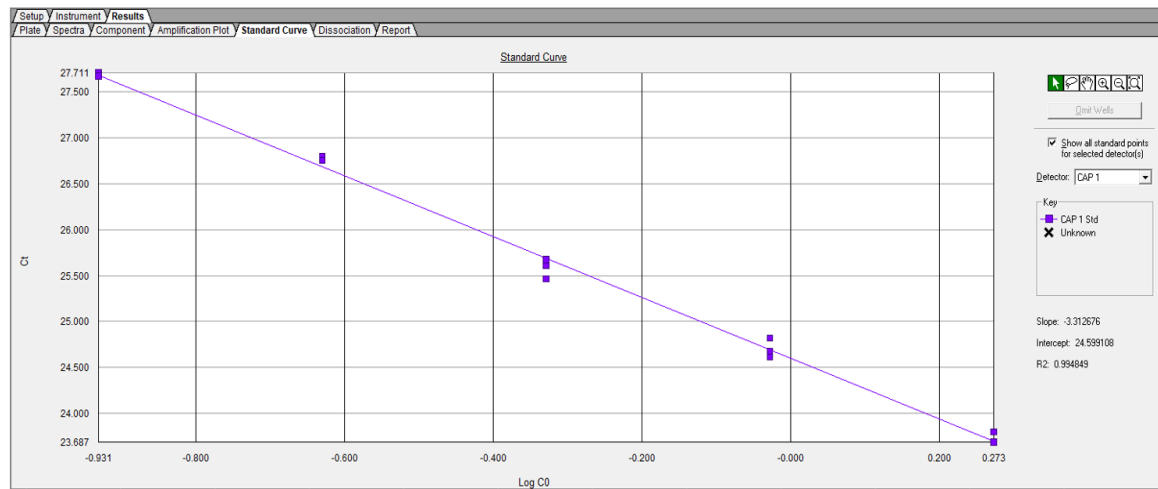


Slika 24. Primer standardne krive za određivanje genske ekspresije β -aktina (nagib -3,33, $R^2=0,998$)

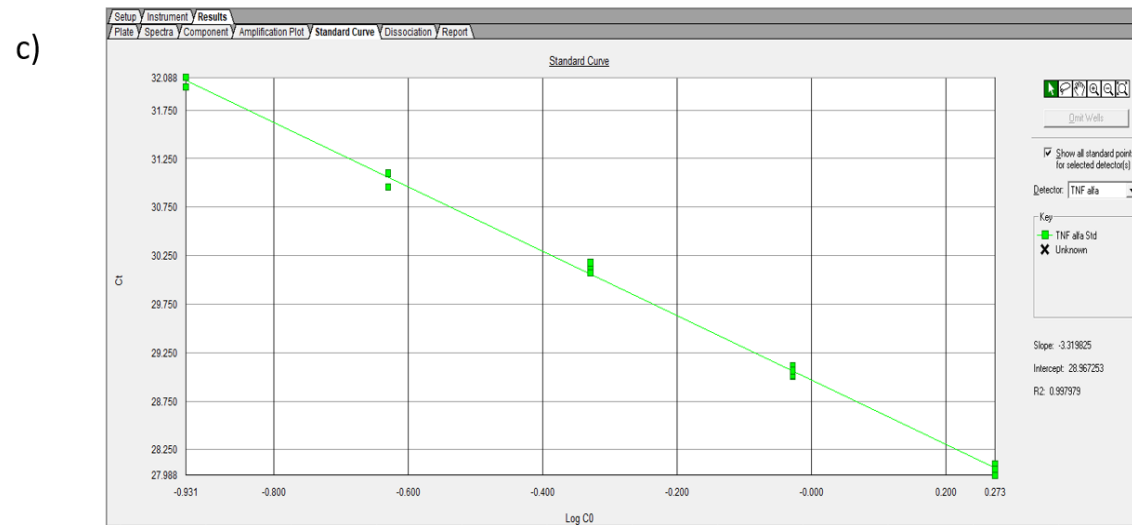
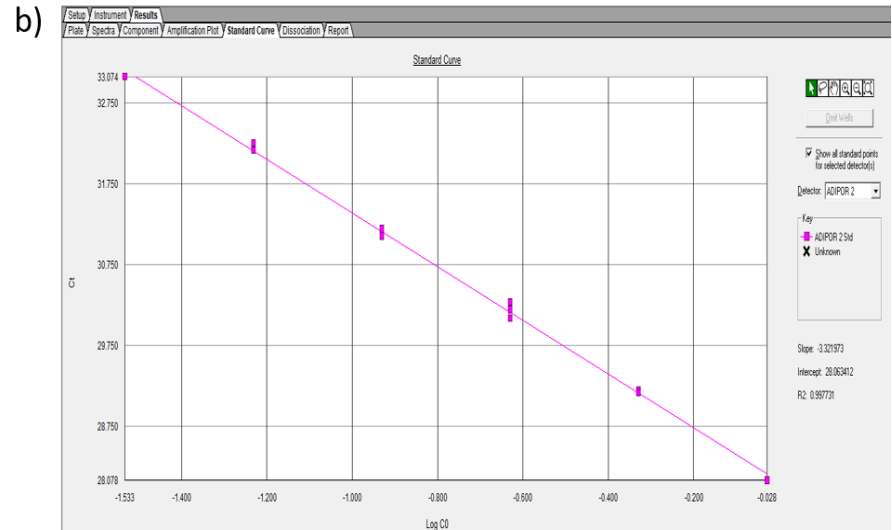
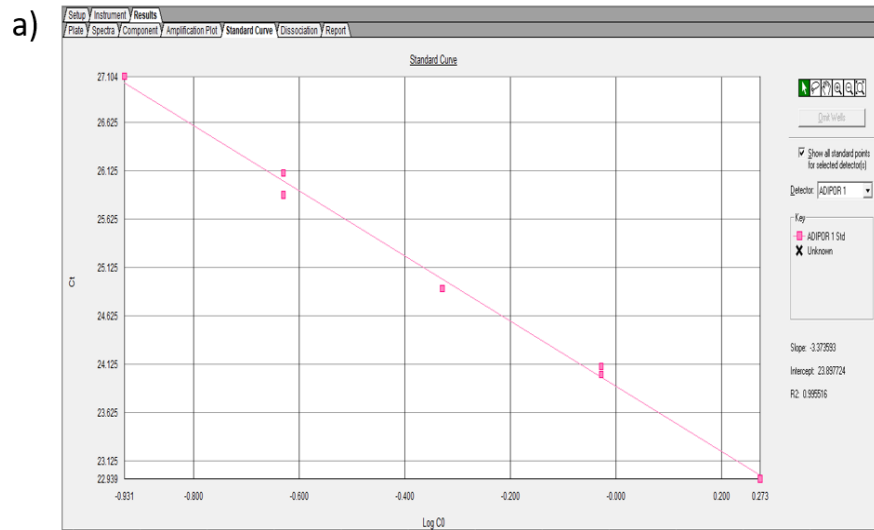
a)



b)



Slika 25. Primer standardne krive za određivanje: a) genske ekspresije rezistina (nagib -3,31 $R^2=0,991$); b) genske ekspresije CAP-1 (nagib -3,31, $R^2=0,995$)

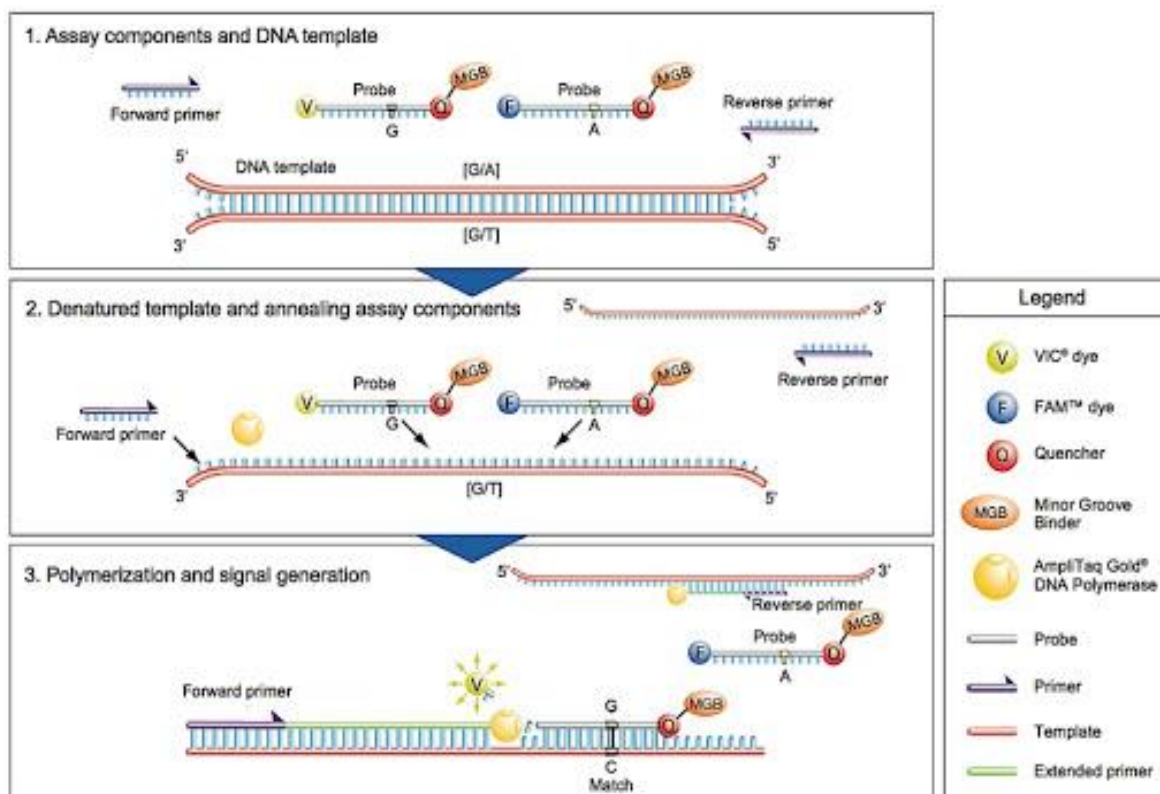


Slika 26. Primer standardne krive za određivanje: a) genske ekspresije Adipor1 (nagib -3,37, $R^2=0,995$); b) genske ekspresije Adipor2 (nagib -3,32, $R^2=0,998$); c) genske ekspresije TNF- α (nagib -3,32, $R^2=0,998$)

3.2.5.8 Ispitivanje polimorfizama pojedinačnih nukleotida

Određivanja polimorfničkih varijanti gena *RETN rs1862513*, *TNF- α rs1800620*, *IGF1 rs2946834*, *ADIPOQ rs266729*, *ADIPOR1 rs7539542* i *ADIPOR1 rs1342387* je izvršeno metodom diskriminacije alela na platformi 7500 Real-time PCR sistema (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Komercijalno dostupni eseji (Applied Biosystems™ *TaqMan® SNP Genotyping Assays*) su korišćeni u analizi, kao i 5xHOT FIREPol® *Probe qPCR Mix Plus (ROX)* Master miksa (Solis BioDyne, Tartu, Estonija). S obzirom da su Master mix i komercijalni eseji dobijeni u koncentrovanom obliku, bilo je neophodno pratiti preporuke proizvođača o dodavanju određene zapremine svake od komponenti PCR kako bi se postigla njihova željena koncentracija u finalnoj zapremini reakcione smeše od 15 μ L. Prema tome, reakcija za PCR je podrazumevala korišćenje 3 μ L Master miksa, 0,375 μ L *TaqMan®* SNP eseja za genotipizaciju, 6 μ L uzorka DNK sa sekvencom od interesa i 5,625 μ L vode PCR stepena čistoće. Uzorci izolovane DNK su bili istih koncentracija (20 ng/ μ l). Na svakoj ploči je za potrebe kontrole kontaminacije reagenasa aplikovana i NTC. Uzorci poznatih genotipova (homozigoti i heterozigoti) su na pločama postavljeni kao pozitivne kontrole.

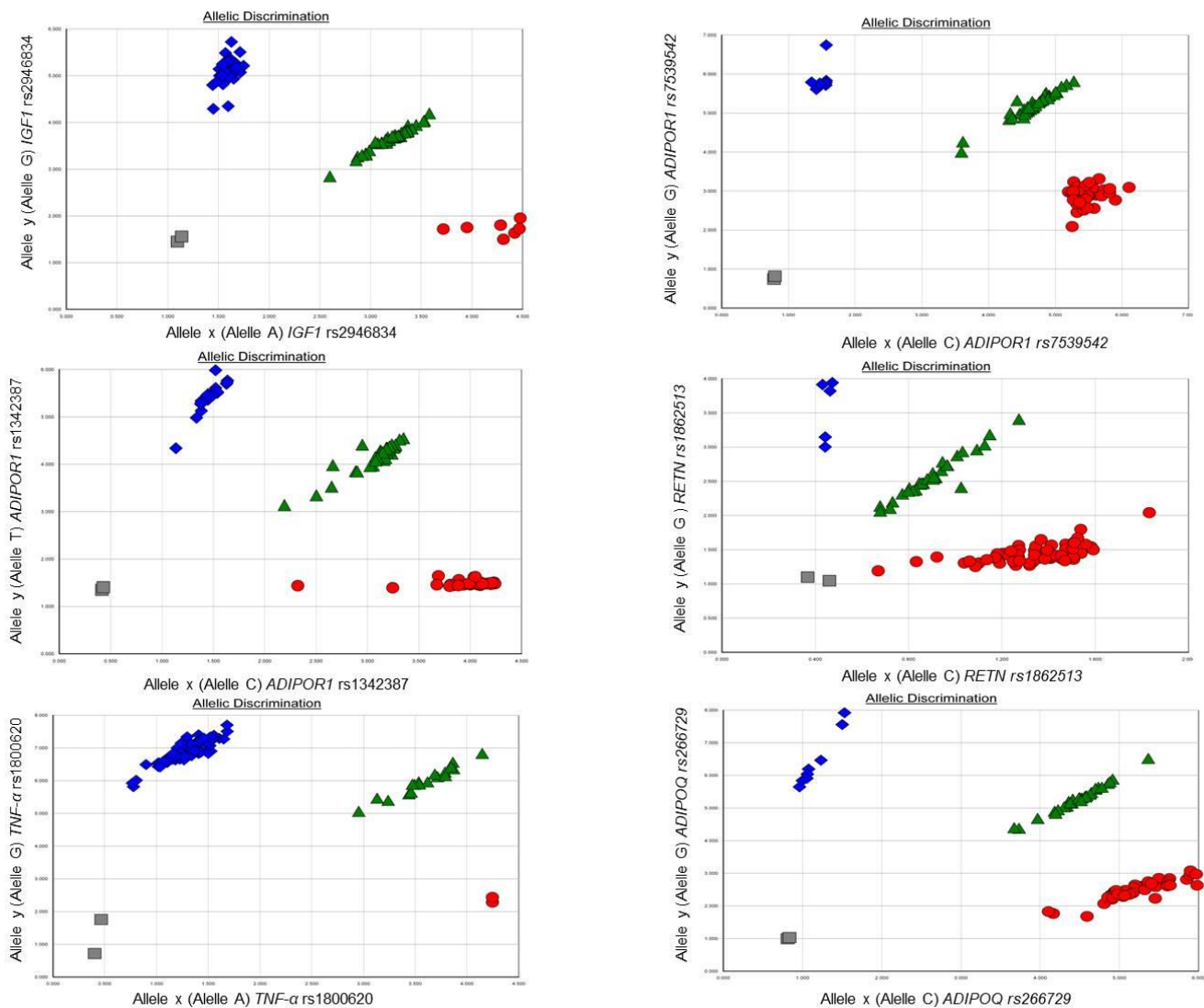
TaqMan® SNP eseji su bili zasnovani na *TaqMan®* 5' nukleaza hemiji, koja je služila za amplifikaciju i detekciju polimorfizma od interesa u prečišćenim uzorcima DNK (slika 27). U okviru eseja su se nalazili *forward* i *reverse* prajmeri za amplifikaciju polimorfne sekvence i dve *TaqMan®* MGB probe. Jedna od proba, obeležena VIC™ fluorescentom bojom je služila za detekciju alela 1 a druga obeležena FAM™ bojom za detekciju alela 2.



Slika 27. Diskriminacija alela se postiže selektivnim vezivanjem TaqMan[®] MGB probe.

Preuzeto iz: http://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/cms_040597.pdf

Termalne inkubacije su bile sledeće: inicijalna aktivacija HOT FIREPol[®] DNK polimeraze: 95°C, 15 min, 1 ciklus; denaturacija DNK: 95°C, 15 sekundi, 40 ciklusa; vezivanje prajmera, proba i polimerizacija: 60°C, 1 min, 40 ciklusa. Nakon završenih 40 ciklusa PCR detektovano je uvećanje fluorescencije. Ukoliko je uvećanje poticalo od samo jedne od VIC[™] ili FAM[™] boja, ispitanik je klasifikovan kao homozigot za taj alel. Ukoliko je uvećanje fluorescencije poticalo i od VIC[™] i od FAM[™] boje, ispitanik je klasifikovan kao heterozigot. Aleli su automatski povezivani sa uzorcima. SDS softver (verzija 1.4.0.25) je pozicionirao rezultate razdvajanja alela: alel 1, odnosno VIC[™] boju naspram alela 2 odnosno FAM[™] boje. Ovakav grafički prikaz razdvajanja alela formira klaster homozigota, heterozigota i NTC (slika 28).



Slika 28. Prikaz softverske diskriminacije alela uz korišćenje *TaqMan*® *SNP Genotyping* eseja

Oznake eseja korišćenih u ispitivanju SNP:

RETN SNP ID: rs1862513; Human Chr.19: C__1394112_10; *TNF-α* SNP ID: rs1800620; Human Chr.6: C__7514884_30; *IGF1* SNP ID: rs2946834 Human Chr.12: C__2801121_10; *ADIPOQ* SNP ID: rs266729 Human Chr.3: C__2412786_10; *ADIPOR1* SNP ID: rs7539542 Human Chr.1: C__30041594_10; *ADIPOR1* SNP ID: rs1342387 Human Chr.1: C__37350_10

3.3 Statistička obrada podataka

3.3.1 *In silico* analiza

Javno dostupni transkriptomski podaci GSE47756 [184] i GSE44076 [185] su preuzeti iz NCBI *Gene Ekspresion Omnibus* (GEO) baze u unapred obrađenom obliku sa normalizovanim vrednostima genskih ekspresija predstavljenim na log₂ skali. Da bi se eliminisao uticaj višestrukih proba, skupovi podataka su obrađeni primenom *Gene Set Enrichment Analysis* (GSEA) softvera (Broad Institute, UC San Diego, <https://www.gsea-msigdb.org/gsea/index.jsp>) [186]. U okviru skupa podataka GSE44076, formirane su tri grupe: 50 zdravih kontrolnih uzoraka i 98 odgovarajućih uzoraka tkiva tumora kolona stadijuma II i susedne mukoze. Razlike u nivoima ekspresija Adipor1, Adipor2 i TNF- α između grupa su analizirane korišćenjem One-way ANOVA testa i Dunnet-ovog testa za višestruko upoređivanje u *GraphPad Prism 7* programu (GraphPad Software, La Jolla California USA). T-test za uparene uzorke je korišćen za uklanjanje intra-individualnih varijacija. S obzirom da nije bilo online dostupnih baza u vezi sa “genetskim otiskom” PBMC u CRC, kao drugi skup podataka za analizu je izabran GSE47756 koji je sadržao informacije o povezanosti “genetskog otiska” monocita periferne krvi (*peripheral blood monocytes*, PBM) i progresije CRC [184]. Uzorci su u okviru ovog skupa podeljeni u dve grupe: 38 uzoraka zdravih dobrovoljaca i 55 pacijenata sa CRC i analizirani Studentovim *t*-testom u *GraphPad Prism 7* programu.

Pomenuta dva skupa podataka su obrađena GSEA softverom, uz upotrebu Hallmark (h.all.v7.1.symbols.gmt) i Kegg (c2.cp.kegg.v7.1.symbols.gmt) genskih setova u svrhe pronalaženja specifičnih obrazaca aktivacije gena vezanih za signalne puteve u koje su uključeni Adipor1 i Adipor2. U ove svrhe je korišćena Pearson-ova korelaciona analiza sa 1000 permutacija, dok je za tip permutacija izabran fenotip. Genski skupovi koji su zadovoljili kriterijum za stopu lažno pozitivnog otkrivanja (*false discovery rate*, FDR) nižu od 25% su smatrani značajnim [186]. U sklopu rezultata su pored FDR predstavljeni još i normalizovani skor obogaćivanja (*Normalized Enrichment Score*, NES) sa namenom poređenja analiza kroz različite genske setove i nominalna *p* vrednost koja je ukazivala na statističku značajnost *enrichment score* (skor koji je ukazivao na prekomernu zastupljenost pojedinih gena iz određenog genskog seta na vrhu ili na dnu celokupne rangirane liste gena).

3.3.2 Statistička analiza podataka dobijenih u istraživanju

Raspodela podataka u grupama sa više od 50 ispitanika je ispitana Kolmogorov-Smirnov testom, dok je za manje podgrupe korišćen Shapiro-Wilk test. Normalno distribuirani podaci su predstavljeni kao srednja vrednost \pm standardna devijacija. Podaci koji su postigli normalnu raspodelu nakon logaritamske transformacije su predstavljeni kao geometrijska sredina sa 95% intervalom pouzdanosti (CI), dok su podaci sa asimetričnim tipom raspodele prikazani kao medijane sa interkvartilnim rasponom. Chi kvadrat (χ^2) test je korišćen za analizu kategoričkih podataka, kao i za proveru odstupanja distribucije

genotipova od Hardy-Weinbergovog principa ravnoteže. Studentov *t*-test i Mann-Whitney U test su primenjeni za procenu razlika između promenljivih koje su pratile normalnu, odnosno asimetričnu raspodelu. Od neparametarskih analiza je još primenjen i Jonckheere-Terpstra test za ispitivanja razlika u koncentracijama IGF1 i E-kadherina u odnosu na različite antropološke i kliničke karakteristike pacijenata sa CRC. Kruskal-Wallis test je korišćen kao proširena Mann-Whitney U neparametarska analiza u slučaju postojanja 3 ili više grupa podataka. ANCOVA i Quad test su korišćeni za analizu razlika između normalno, odnosno asimetrično distribuiranih promenljivih, uz korekciju za uticaj godina starosti. Korelaciona analiza je obuhvatala Pearson-ov parametarski i Spearman-ov neparametarski test, shodno raspodeli podataka. Univarijantna i multivarijantna binarna logistička regresiona analiza su upotrebljene za procenu sposobnosti parametara za predviđanje rizika za razvoj CRC. Univarijantna linearna regresiona analiza je korišćena za ispitivanje nezavisne povezanosti između promenljivih. Multivarijantna linearna regresiona analiza sa *enter* modelom je služila za procenu veličine uticaja ispitivanih parametara (odabranih nezavisnih promenljivih) na promenljivu od značaja. Diskriminacione sposobnosti ispitivanih parametara su procenjene primenom *Receiver Operating Characteristics (ROC)* krive, kao pokazatelja dijagnostičke tačnosti. Prema utvrđenim kriterijumima, površina ispod krive (*area under the curve, AUC*) je korišćena za procenu dijagnostičke tačnosti [187]. Statistički rezultati opservacione studije su dobijeni korišćenjem statističkog paketa IBM®SPSS® model 22.0 (IBM, USA), kao i korišćenjem SNPStat online dostupnog softvera (© 2006 Institut Català d'Oncologia, <https://www.snpstats.net/>). $P < 0,05$ je ukazivala na statistički značajne razlike između posmatranih podataka.

3.3.3 MDR analiza

MDR analiza praćena testiranjem permutacija je korišćena za procenu gen-gen interakcija, kao i interakcija gena sa faktorima spoljašnje sredine (MDR software, version: 3.0.2, build 2; <https://sourceforge.net/projects/mdr/>; MDRPT module, version: 1.0.2, beta 2; <https://sourceforge.net/projects/mdr/files/mdrpt/>). MDR metoda redukuje visoke-dimenzionalne genetske podatke u jednu dimenziju, što dozvoljava interakcijama da budu otkrivene i na relativno malim uzorcima, poput našeg. Shodno tome, u analizu su uključeni svi pacijenti koji su imali potpune podatke za sve prethodno navedene SNP (81 pacijent sa CRC), a radi poboljšanja statističke snage ove analize, kontrolna grupa je proširena određivanjem polimorfizama kod dodatno regrutovanih zdravih ispitanika. Finalnu kontrolnu grupu za MDR softversku analizu je činilo 175 zdravih dobrovoljaca.

Sposobnost modela da predvidi rizik za razvoj bolesti se procenjivala na osnovu dve vrednosti - tačnosti testiranja (*testing accuracy, TA*) i konzistentnosti u unakrsnoj validaciji (*Cross Validation Consistency, CVC*). Da bi model bio validan, neophodno je da TA bude 0,55 i CVC najmanje 9/10. Najboljim modelom se smatrao onaj sa najvećim CVC i TA. Statistička značajnost modela se ispitivala testiranjem permutacija MDR modela (*MDR permutation testing, MDRPT*). Model u kome je *p* vrednost MDRPT bila manja od 0,05 se smatrao statistički značajnim. Dodatno, korišćenjem opcije za konstrukciju interakcionih grafika (*Fruchterman-Rheingold graph*) bili smo u mogućnosti da

vizualizujemo i okarakterišemo interakcije između različitih SNP, kao i interakcije SNP sa faktorima spoljašnje sredine. U zavisnosti od tipa interakcije, boje interakcionih linija su se razlikovale tako da je crvena ukazivala na najviši stepen sinergizma, narandžasta na slabiji sinergizam, dok je s druge strane plava ukazivala na najviši stepen redundantnosti¹, zelena na slabiju redundantnost, dok se žuta nalazila u sredini između sinergizma i redundantnosti, odnosno upućivala je na nezavisnost interakcija. Dodatno u sklopu istraživanja interakcija SNP, primenom SNPStat online dostupnog softvera (© 2006 Institut Català d'Oncologia) ispitana je i neravnoteža vezanosti gena (*linkage disequilibrium, LD*), za polimorfizme od interesa.

¹ Genetska redundantnost se odnosi na dva ili više gena koji vrše istu funkciju, tako da inaktivacija jednog od ovih gena nema efekta na fenotip.

Sinergizam se detektuje u slučaju kada doprinos dveju mutacija fenotipu prevazilazi očekivane aditivne efekte individualnih mutacija.

4. Rezultati

4.1 Osnovne antropometrijske karakteristike i biohemijski parametri učesnika u studiji

Antropometrijski parametri i osnovni biohemijski parametri kod ispitanika su predstavljeni u Tabeli 1. Ispitivane grupe se nisu razlikovale po polu, ali je uočena značajna razlika u godinama. Imajući u vidu potencijalni uticaj godina na vrednosti nekih od analita određivanih u ovom istraživanju, izvršena je korekcija za godine primenom ANCOVA testa. Vrednosti ITM se nisu razlikovale između ispitivanih grupa. Koncentracije ukupnih proteina i albumina su bile niže kod pacijenata dok se nivoi glukoze nisu značajno razlikovali. Slične su bile i koncentracije triglicerida među grupama, dok su se ostali parametri lipidne homeostaze razlikovali, tako da su niže koncentracije UH, HDL-h i LDL-h uočene kod pacijenata sa karcinomom.

Tabela 1. Osnovni antropometrijski parametri i biohemijske analize kod pacijenata sa CRC i u kontrolnoj grupi

Parametar	CRC (N=99)	Kontrolna grupa (N=101)	p
Godine [#]	64,87±10,756	54,61 ±7,725	<0,001
Pol (m/ž) ^{&}	66/33	56/45	0,113
ITM, kg/m ²	25,172 ±3,283	25,826 ±3,324	0,052
Albumin, g/L	39,078±4,966	47,330±4,029	<0,001
Ukupni proteini, g/L	65,789±7,262	72,729±7,067	<0,001
Glukoza, mmol/L	5,806±1,425	5,495±0,900	0,567
UH, mmol/L	4,516±1,171	5,590±1,005	<0,001
TG, mmol/L [*]	1,287 (1,200-1,380)	1,241 (1,148-1,342)	0,357
HDL-h, mmol/L	1,039±0,392	1,326±0,501	<0,001
LDL-h, mmol/L	2,865±1,035	3,657±0,929	<0,001

Podaci su predstavljeni kao srednja vrednost± standardna devijacija i poređeni ANCOVA testom uz korekciju za godine starosti

*Podaci su predstavljeni kao geometrijska sredina (95% CI)

[#] Poređenje je izvršeno Studentovim *t*-testom. [&]Podaci su predstavljeni kao apsolutne frekvence i poređenje je izvršeno χ^2 testom

4.1.1 Markeri oksidativnog stresa i specifičnog lipidnog profilisanja

Rezultati upoređivanja markera specifičnog lipidnog profilisanja kod pacijenata i zdravih ispitanika su prikazani u Tabeli 2. Masena koncentracija CETP je bila niža, dok je enzimski aktivnost bila viša kod pacijenata sa CRC. Nasuprot tome, aktivnost LCAT je bila niža kod pacijenata. Kod ispitanika su određivani i parametri prooksidativnog/antioksidativnog statusa. Statistički značajne razlike su uočene u PAB i paraoksonaznoj i arilesteraznoj aktivnosti enzima PON-1. Naime, PAB je bio viši kod pacijenata sa karcinomom, dok su obe enzimski aktivnosti PON-1 bile redukovane u ovoj grupi. Iako je prevalenca fenotipa A PON-1, inače okarakterisanog nižom paraoksonaznom aktivnošću, bila viša u CRC, razlika u distribuciji fenotipova ipak nije dostigla statističku značajnost.

Tabela 2. Lipidni transferni proteini, PAB i aktivnost PON-1 aktivnost u analiziranim grupama

Parametri	Pacijenti sa CRC (N=99)	Kontrolna grupa (N=101)	p
Aktivnost LCAT, μmol/L/h	77,420 (50,002-105,710)	96,165 (72,915-116,500)	0,037
Aktivnost CETP, μmol/L/h	64,750 (40,420-100,210)	48,460 (22,310-77,375)	0,030
Masena koncentracija CETP, ng/mL	315,770 (194,722- 469,425)	597,490 (462,090-794,450)	<0,001
PAB, HKU	434,560 (183,360-739,360)	65,960 (50,893 -92,627)	<0,001
Paraoksonazna aktivnost PON-1, U/L	193,500 (136,000-574,500)	296,500 (214,250-646,000)	0,030
Arilesterazna aktivnost PON-1, kU/L	90,600 (62,500-114,800)	114,300 (101,250-134,600)	<0,001
Fenotip A PON-1(%)*	70,18	64,10	0,360

Podaci su prikazani kao medijana sa interkvartilnim rasponom i poređeni neparametarskom ANCOVA analizom sa godinama kao kovarijatom

*Podaci su prikazani kao relativne frekvence i poređeni Chi-kvadrat testom.

Dodatno su ispitivane i razlike u aktivnostima LCAT, CETP i masenoj koncentraciji CETP kod ispitanika klasifikovanih prema fenotipu PON-1. Kod pacijenata sa CRC nije bilo razlike u spomenutim parametrima, dok je kod zdravih osoba aktivnost CETP bila značajno viša ($p < 0,05$) kod osoba sa

fenotipom A PON-1 (medijana: 62,58; interkvartilni raspon: 42,25-85,08 $\mu\text{mol/L/h}$) u poređenju sa ispitanicima sa fenotipom B (medijana: 33,25; interkvartilni raspon: 21,13-57,33 $\mu\text{mol/L/h}$).

4.1.2 Analiza korelacija između antropometrijskih i biohemijskih parametara, markera oksidativnog stresa i markera specifičnog lipidnog profilisanja

Spearman-ov test je u grupi pacijenata pokazao statistički značajnu pozitivnu korelaciju između aktivnosti LCAT i CETP ($\rho=0,588$, $p<0,001$). Korelacije između paraoksonazne aktivnosti PON-1 i UH ($\rho=0,350$, $p=0,003$), kao i paraoksonazne aktivnosti i HDL-h ($\rho=0,277$, $p=0,018$) su takođe bile statistički značajne. Arilesterazna aktivnost PON-1 je pozitivno korelirala sa HDL-h ($\rho=0,285$, $p=0,016$), dok je aktivnost LCAT pozitivno korelirala sa koncentracijama UH ($\rho=0,232$, $p=0,036$). Ispitana je i povezanost nivoa PAB sa aktivnostima LCAT, CETP i PON-1. Iako kod pacijenata nije uočena statistički značajna korelacija između navedenih markera, masena koncentracija CETP je pokazala pozitivnu relaciju sa vrednostima PAB ($\rho=0,321$, $p=0,015$).

U kontrolnoj grupi ITM je pozitivno korelirao sa koncentracijom glukoze ($\rho=0,215$, $p=0,036$) i sa nivoima TG ($\rho=0,294$, $p=0,004$), dok je negativna korelacija uočena između ITM i koncentracije HDL-h ($\rho=-0,274$, $p=0,007$). Očekivano, koncentracija TG je bila u negativnoj korelaciji sa nivoom HDL-h ($\rho=-0,544$, $p<0,001$), pozitivnoj sa LDL-h ($\rho=0,354$, $p<0,001$), ali i sa aktivnošću LCAT ($\rho=0,329$, $p=0,002$). Koncentracije HDL-h su pored spomenute negativne korelacije sa TG, negativno korelirale sa nivoima LDL-h ($\rho=-0,210$, $p=0,037$), no iznenađujuće i sa aktivnošću LCAT ($\rho=-0,220$, $p=0,044$). Pozitivna korelacija je postojala između vrednosti PAB i koncentracije HDL-h ($\rho=0,352$, $p=0,011$). Aktivnosti LCAT i CETP su međusobno pozitivno korelirale ($\rho=0,412$, $p<0,001$), dok je pozitivna korelacija uočena i između aktivnosti LCAT i koncentracija LDL-h ($\rho=0,358$, $p=0,001$). PAB ni u kontrolnoj grupi nije pokazao značajnu korelaciju sa aktivnostima LCAT i CETP. Izuzev pozitivne korelacije između arilesterazne aktivnosti PON-1 i koncentracije UH ($\rho=0,216$, $p=0,038$), nije uočena nikakva značajna korelacija između ostalih parametara sa arilesteraznom ili paraoksonaznom aktivnošću PON-1 kod zdravih osoba.

4.1.3 Ispitivanje dijagnostičkog značaja markera oksidativnog stresa i specifičnog lipidnog profilisanja

Univarijantna logistička regresiona analiza je dalje sprovedena kako bi se identifikovali potencijalni prediktivni markeri za prisustvo CRC. Parametri logističke regresione analize (*odds ratio*, OR i 95% CI) za aktivnosti LCAT, CETP i PON-1, kao i za masenu koncentraciju CETP su prikazani u tabeli 3. Univarijantna analiza je izdvojila aktivnost i masenu koncentraciju CETP, koncentracije HDL-h, nivoa PAB i arilesteraznu aktivnost PON-1 kao statistički značajne varijable, dok nasuprot tome OR za aktivnost LCAT i paraoksonaznu aktivnost PON-1 nije dostigao statističku značajnost (tabela 3).

Tabela 3. Univarijantna binarna logistička regresiona analiza za ispitivanje značaja određivanih markera u predikciji pojave CRC

Parametar	OR	95% CI	P
Aktivnost CETP, $\mu\text{mol/L/h}$	1,010	1,004-1,017	0,002
Masena koncentracija CETP, ng/mL	0,994	0,992- 0,996	<0,001
Aktivnost LCAT, $\mu\text{mol/L/h}$	1,002	0,997-1,006	0,468
HDL-h, mmol/L	0,218	0,104-0,458	<0,001
Paraoksonazna aktivnost PON-1, U/L	0,999	0,998-1,000	0,058
Arilesterazna aktivnost PON-1, kU/L	0,971	0,959-0,983	<0,001
Fenotip A PON-1 (%)	0,778	0,374-1,621	0,503
PAB, HKU	1,068	1,035-1,102	<0,001

Da bi se dalje ispitaio nezavisni potencijal aktivnosti i masene koncentracije CETP u predikciji razvoja CRC, konstruisani su različiti modeli uz upotrebu multivarijantne logističke regresione analize: prvi, sa korekcijom za godine, pol, koncentraciju TG, HDL-h, LDL-h i drugi, sa korekcijom za arilesteraznu aktivnost PON-1 i PAB. Aktivnost CETP je zadržala statističku značajnost u modelu 1, međutim nakon korekcije za parametre oksidativnog statusa (model 2) nije dokazan statistički značajan potencijal ovog parametra u predviđanju pojave CRC (tabela 4).

Tabela 4. Multivarijantna binarna regresiona analiza za procenu značaja aktivnosti CETP kao nezavisnog prediktora razvoja CRC

Model 1			
Parametar	OR	95% CI	p
Aktivnost CETP, $\mu\text{mol/L/h}$	1,010	1,001-1,020	0,025
Godine	1,123	1,070-1,177	<0,001
Pol (m/ž)	0,678	0,268-1,713	0,411
LDL-h, mmol/L	0,426	0,274-0,660	<0,001
HDL-h, mmol/L	0,145	0,046-0,453	<0,001
TG, mmol/L	0,759	0,349-1,651	0,487
Model 2			
Parametar	OR	95% CI	p
Aktivnost CETP, $\mu\text{mol/L/h}$	0,984	0,961-1,007	0,160
Arilesterazna aktivnost PON-1, kU/L	0,997	0,964-1,031	0,868
PAB, HKU	1,074	1,029-1,120	0,001

Enter model. Sve varijable su kontinuirane izuzev pola: 0-žene, 1-muškarci

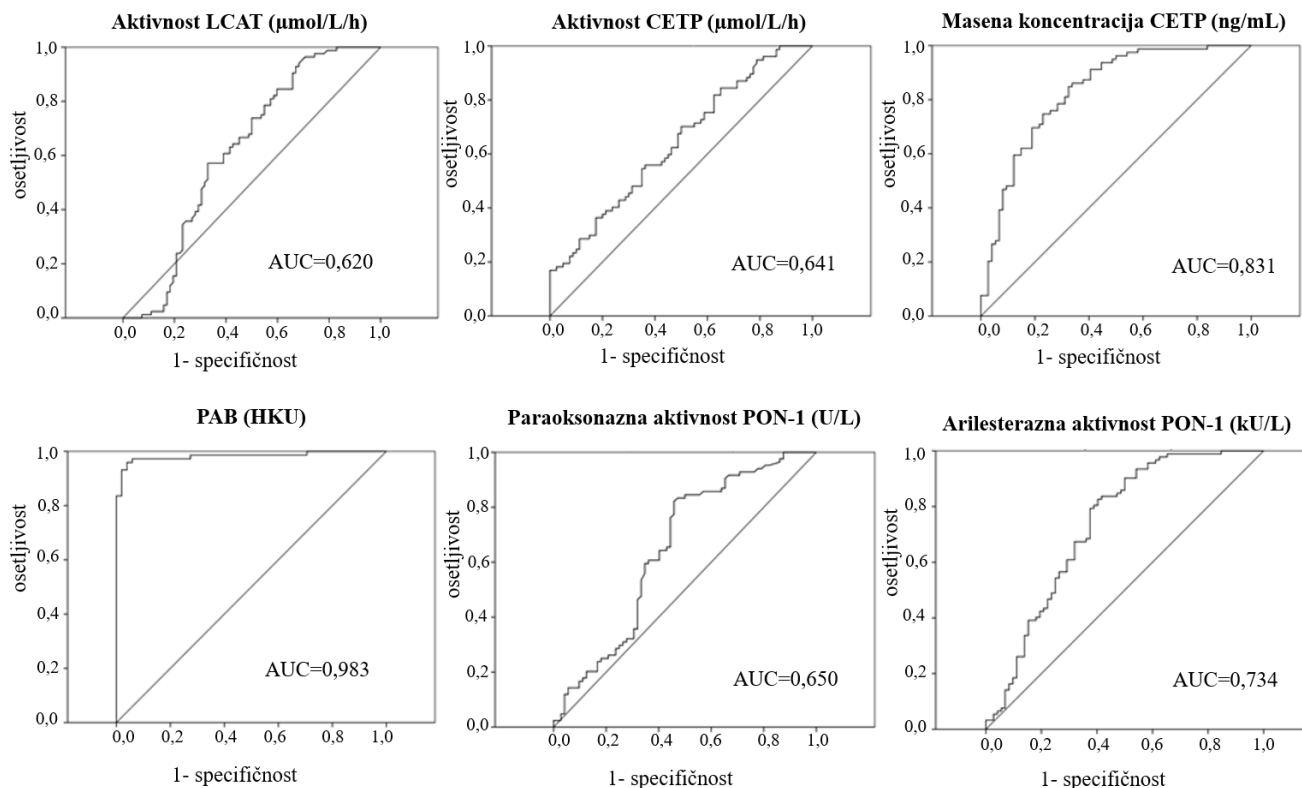
Analogno kao kod ispitivanja prognostičkog potencijala aktivnosti CETP, iste analize su izvršene i za procenu doprinosa masene koncentracije ovog enzima za predikciju rizika za razvoj CRC. Masena koncentracija CETP je pokazala statističku značajnost u modelu 1, ali i nakon uvrštavanja činilaca redoks balansa u model, ovaj parametar zadržava statističku značajnost (tabela 5). S obzirom da jetra predstavlja glavno mesto sinteze CETP, a ujedno i mesto najčešćih metastaza CRC, na kraju je urađena i korekcija za koncentracije albumina kao jednog od pokazatelja očuvanosti sintetske funkcije jetre. Masena koncentracija CETP je i dalje ostala statistički značajan prediktor rizika za razvoj CRC (OR:0,994;CI:0,990-0,998; p=0,003).

Tabela 5. Multivarijantna binarna logistička regresiona analiza za procenu značaja masene koncentracije CETP kao nezavisnog prediktora razvoja CRC

Model 1			
Parametar	OR	95% CI	p
Masena koncentracija CETP, ng/mL	0,993	0,990-0,996	<0,001
Godine	1,139	1,078-1,204	<0,001
Pol (m/ž)	0,643	0,224-1,845	0,411
LDL-h, mmol/L	0,481	0,305-0,759	0,002
HDL-h, mmol/L	0,160	0,047-0,548	0,004
TG, mmol/L	1,354	0,564-3,249	0,498
Model 2			
Masena koncentracija CETP, ng/mL	0,982	0,966-0,997	0,023
Arilesterazna aktivnost PON-1, kU/L	0,968	0,923-1,015	0,181
PAB, HKU	1,093	1,018-1,175	0,015

Sve varijable su kontinuirane izuzev pola: 0-žene, 1-muškarci

Nadalje je ispitivana dijagnostička tačnost aktivnosti LCAT, CETP i PON-1, kao i masene koncentracije CETP i nivoa PAB primenom ROC analize, tj. procenom AUC. Rezultati su predstavljeni u sklopu slike 29. Prema već uspostavljenim kriterijumima AUC između 0,7 i 0,8 definiše dobru dijagnostičku tačnost, vrednosti između 0,8 i 0,9 veoma dobru dijagnostičku tačnost, dok analit sa AUC između 0,9 i 1 predstavlja biomarker sa odličnom dijagnostičnom tačnošću. Rezultati su pokazali da PAB predstavlja potencijalni dijagnostički marker za CRC sa odličnom dijagnostičkom tačnošću, dok se dijagnostička tačnost masene koncentracije CETP mogla okarakterisati kao veoma dobra.



Slika 29. Dijagnostička tačnost markera specifičnog lipidnog profilisanja i redoks balansa kod pacijenata sa CRC

4.2 Ispitivanje značaja IGF1 i E-kadherina kao biomarkera CRC

U tabeli 6. su prikazani rezultati statističke analize razlika u koncentracijama E-kadherina i IGF1 kod pacijenata i u kontrolnoj grupi. Kako su i ovde grupe bile homogene po polu ($p=0,400$), a razlika u godinama postojala ($p<0,001$), da bi se izbegao uticaj godina, poređenje varijabli je rađeno parametarskim i neparametarskim ANCOVA testom sa korekcijom za uzrast. Analiza je ukazala na postojanje značajno nižih koncentracija IGF1 i značajno viših koncentracije E-kadherina kod pacijenata sa CRC (tabela 6). Dodatno, pacijenti sa CRC su imali značajno niže vrednosti ITM u odnosu na zdrave ispitanike (tabela 6).

Tabela 6. Uporedna analiza koncentracija IGF1 i E-kadherina kod pacijenata sa CRC i zdravih ispitanika

	CRC	Kontrolna grupa	p
N	70	75	
Godine*	64,90±11,199	54,79±7,792	<0,001
Pol (m/ž) #	44/26	42/33	0,400
ITM, kg/m ² &	25,496±3,480	26,644±3,574	0,028
IGF1, ng/mL &&	69,172 (52,876-87,179)	90,276 (79,427-106,835)	0,019
E-kadherin, ng/mL &&	121,819 (106,110-146,290)	61,036 (49,037-68,298)	<0,001

* Podaci su predstavljeni kao srednja vrednost±standardna devijacija. Poređenje je izvršeno Studentovim *t*-testom

Podaci su predstavljeni kao apsolutne frekvence i upoređeni χ^2 testom.

& Podaci su predstavljeni kao srednja vrednost±standardna devijacija. Poređenje je izvršeno parametarskim ANCOVA testom uz korekciju za godine starosti

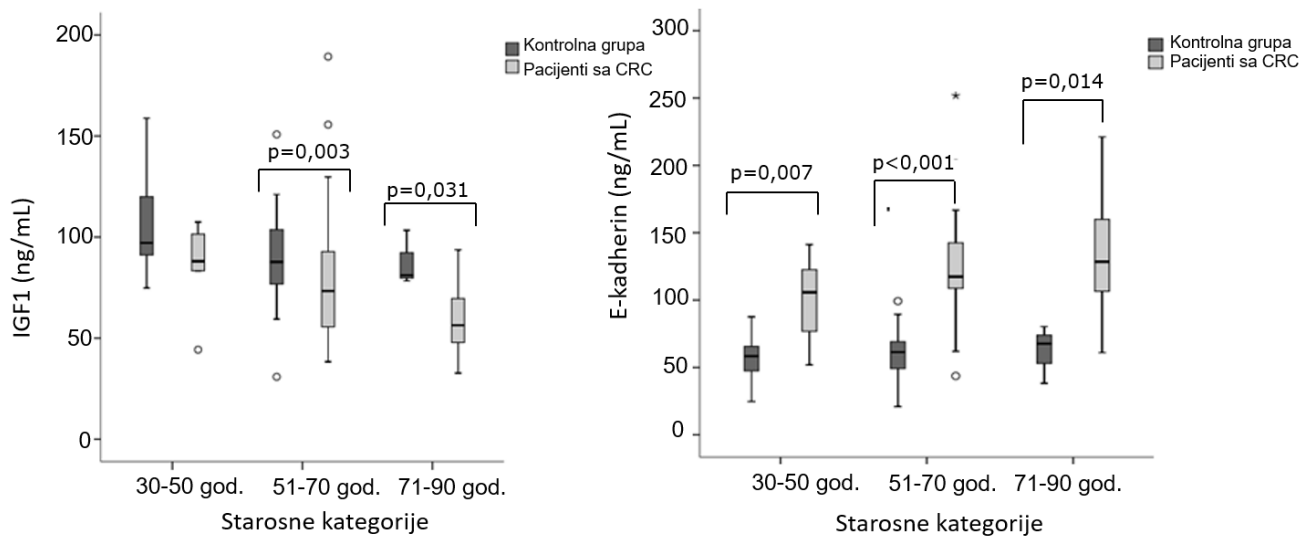
&& Podaci su predstavljeni kao medijana sa interkvartilnim opsegom. Poređenje je izvršeno neparametarskim ANCOVA testom uz korekciju za godine starosti

U pokušaju da se sveobuhvatno istraži i potvrdi potencijalni uticaj godina na uočene razlike u koncentracijama IGF1 i E- kadherina između pacijenata i kontrolne grupe, ispitanici su grupisani u tri različite starosne kategorije. Kao što je prikazano u tabeli 7 i na slici 30 nivo IGF1 se smanjuje sa godinama, s tim da su vrednosti konzistentno bile niže kod pacijenata sa CRC u poređenju sa zdravim ispitanicima. U kategoriji osoba starosti 30-50 godina, uočen je trend nižih koncentracija IGF1 kod pacijenata nego u zdravim ispitanika, ali sa graničnom statističkom značajnošću ($p=0,088$). Nadalje, vrednosti IGF1 su bile značajno niže u podgrupi pacijenata starosti od 51-70 godina i 71-90 godina u odnosu na istu starosnu kategoriju kod zdravih osoba. Koncentracije E-kadherina su nasuprot tome rasle kroz starosne podgrupe, s tim da su ustaljeno bile više u grupi pacijenata sa CRC.

Tabela 7. Razlike u koncentracijama IGF1 i E-kadherina između pacijenata sa CRC i zdravih osoba klasifikovanih u različite starosne grupe

IGF1, ng/mL				
Starosne grupe	Broj učesnika CRC/Kontrolna grupa	CRC	Kontrolna grupa	p
30-50 godina	6/20	88,072 (73,562-102,954)	97,128 (90,704-121,110)	0,088
51-70 godina	39/52	73,339 (55,108-93,355)	87,706 (76,429-104,694)	0,003
71-90 godina	25/3	56,373 (47,593-70,065)	81,140 (78,285-103,409)	0,031
E-kadherin, ng/ml				
Starosne grupe	Broj učesnika CRC/Kontrolna grupa	CRC	Kontrolna grupa	p
30-50 godina	6/20	105,715 (70,587-127,266)	58,352 (46,037-66,956)	0,007
51-70 godina	39/52	117,398 (108,320-143,448)	61,351 (49,116-69,798)	<0,001
71-90 godina	25/3	128,450 (105,715-162,393)	67,667 (38,301-80,297)	0,014

Podaci su predstavljeni kao medijana (interkvartilni raspon) i upoređivani Mann-Whitney U-testom.



Slika 30. Promene koncentracija IGF1 i E-kadherina u različitim starosnim kategorijama pacijenata sa CRC i zdravih ispitanika

Potom su ispitivane promene u nivoima IGF1 i E-kadherina u odnosu na različite karakteristike pacijenata (tabela 8). Koncentracije IGF1 su bile statistički značajno više kod muškaraca u odnosu na žene. Da bi se ispitaio uticaj pola na nivo IGF1, izvršeno je i poređenje muškaraca i žena između pacijenata i kontrola. Koncentracije IGF1 su bile niže kod muških pacijenata sa CRC ($p < 0,001$) (medijana: 73,785 ng/mL; interkvartilni raspon: 62,326-91,867 ng/mL) u odnosu na zdrave muškarce (medijana: 94,840 ng/mL; interkvartilni raspon: 86,568-113,121 ng/mL). Slično, žene sa CRC su imale značajno ($p < 0,001$) niže nivoe IGF1 (medijana: 53,992 ng/mL; interkvartilni raspon: 43,128-78,250 ng/mL) u odnosu na zdrave žene (medijana: 82,282 ng/mL; interkvartilni raspon: 76,857-93,131 ng/mL).

Razlike u koncentraciji IGF1 u odnosu na ITM ili prisustvo dijabetesa nisu nađene. Međutim nivoi IGF1 su varirali u odnosu na lokalizaciju tumora. Pacijenti sa karcinomom rektuma su imali više koncentracije IGF1 u odnosu na ispitanike sa karcinomom kolona. Nisu postojale razlike u koncentracijama IGF1 u zavisnosti od gradusa CRC, ali su rezultati ukazali na smanjenje u koncentracijama ovog parametra kroz stadijume bolesti, sa značajnom razlikom dostignutom između stadijuma B1 i D ($p = 0,042$, prema Mann-Whitney U testu). Što se tiče E-kadherina, razlike nisu nađene ni u odnosu na jednu od ispitivanih karakteristika pacijenata sa CRC (tabela 8).

Tabela 8. Razlike u koncentracijama IGF1 and E-kadherina u odnosu na različite antropološke i kliničke karakteristike pacijenata sa CRC

Kategorija CRC pacijenata	% pacije nata	IGF1, ng/mL	p	E-cadherin, ng/mL	p
Pol					
Muškarci	62,9%	73,785 (62,326-91,867)	0,003	121,977 (104,926-147,000)	0,738
Žene	37,1%	53,992 (43,128-78,250)		121,503 (107,846-143,448)	
ITM					
< 25 kg/m ²	43,5%	64,856 (44,319-92,835)	0,826	109,662 (104,926-141,238)	0,058
≥ 25 kg/m ²	56,5%	69,023 (55,332-81,822)		127,344 (111,241-147,237)	
Diabetes mellitus					
Prisustvo	15,7%	68,935 (55,927-73,765)	0,846	117,240 (104,926-146,290)	0,716
Odsustvo	84,3%	70,511 (50,867-88,965)		122,292 (106,505-146,290)	
Lokalizacija tumora					
Kolon	69,5%	62,177 (48,337-81,524)	0,048	121,345 (104,926-146,290)	0,717
Rektum	30,5%	79,441 (64,038-93,355)		119,135 (109,031-142,895)	
Gradus tumora					
Gradus I	28,8%	68,725 (55,332-86,286)	0,823	123,240 (104,926-142,501)	0,926
Gradus II	56,1%	71,404 (49,676-90,900)		116,924 (104,926-146,763)	
Gradus III	15,1%	66,940 (56,671-85,096)		127,502 (108,873-149,132)	
Stadijum tumora					
Stadijum B1	12,9%	94,918 (59,052-102,061)	0,023	122,608 (117,082-147,553)	0,948
Stadijum B2	45,7%	70,958 (55,406-83,384)		122,450 (102,558-146,053)	
Stadijum C1	8,5%	73,041 (45,500-91,346)		123,240 (88,427-178,971)	
Stadijum C2	22,9%	60,540 (48,932-89,263)		112,030 (107,373-132,554)	
Stadijum D	10,0%	53,546 (38,664-73,785)		142,501 (110,925-166,814)	

Podaci su predstavljeni kao medijana sa interkvartilnim rasponom i poređeni Mann-Whitney U-testom ili Jonckheere-Terpstra testom.

4.2.1 Ispitivanje prediktivnog i dijagnostičkog značaja IGF1 i E-kadherina

Ispitivana je i nezavisna povezanost IGF1 i E-kadherina sa rizikom za pojavu CRC. Dobijeni rezultati su predstavljeni u tabeli 9. Preliminarni rezultati univarijantne logističke regresije su ukazali da su oba markera, i IGF1 i E-kadherin značajni prediktori pojave CRC. Kako bi se dalje istražili ovi rezultati, primenjena je multivarijantna analiza. Godine, ITM i pol kao prethodno priznati faktori rizika za CRC su uključeni u model zajedno sa koncentracijama IGF1 i E-kadherina. Izvedena multivarijantna analiza je otkrila da su muški pol, ITM i koncentracije oba markera, IGF1 i E-kadherina, nezavisno povezani sa rizikom za razvoj CRC (tabela 9).

Tabela 9. Logistička regresiona analiza značaja koncentracija IGF1 i E-kadherina sa u predikciji pojave CRC

	OR	95% CI	p
Univarijantna analiza			
IGF1, ng/mL	0,964	(0,949-0,980)	<0,001
E-kadherin, ng/mL	1,109	(1,072-1,146)	<0,001
Multivarijantna analiza			
Godine	1,069	(0,977-1,170)	0,146
Pol, m/ž	12,939	(1,643-101,879)	0,015
ITM, kg/m ²	0,625	(0,456-0,858)	0,004
IGF1, ng/mL	0,965	(0,932-0,998)	0,040
E-cadherin, ng/mL	1,137	(1,075-1,203)	<0,001

Unete varijable su kontinuirane. izuzev pola (muškarci-1, žene-0)

Na kraju je ispitivana i dijagnostička tačnost IGF1 i E-kadherina ROC analizom. Dobijeni rezultati su sugerisali da je klinička tačnost za IGF1 prihvatljiva, (AUC=0,757), dok se površina ispod krive (AUC=0,954) za E-kadherin mogla smatrati odličnom. Ispitivana je i AUC za ITM i za pol, s obzirom da su ovi parametri takođe predstavljali značajne varijable prema multivarijantnoj logističkoj analizi. Međutim dobijene AUC za ITM i za pol nisu dostigle statističku značajnost (p=0,094 i p=0,476). Ukoliko se kao cut off za koncentraciju IGF1 koristi vrednost od 77,386 ng/mL, osetljivost iznosi 81,3%, a specifičnost 64,3%. Sa druge strane, kod određivanja E-kadherina, pri cut off vrednosti od 83,454 ng/mL se dostigla osetljivost od 90% i specifičnost od 94,7%. Model koji je predstavljao kombinaciju ova dva markera je imao AUC od 0,966, što je ukazalo na njegov visok dijagnostički potencijal kod CRC (tabela 10). Međutim, prilikom poređenja ROC krivi dobijenih za E-kadherin samostalno i u kombinaciji sa IGF1, nije uočena statistički značajna razlika (p=0,121).

Tabela 10. Klinička tačnost ispitivanih parametara za dijagnostiku CRC

	AUC	95% CI	p
ITM, kg/m ²	0,583	(0,487-0,679)	0,094
Pol, muškarci	0,534	(0,440-0,628)	0,476
IGF1, ng/mL	0,757	(0,677-0,837)	<0,001
E-kadherin, ng/mL	0,954	(0,917-0,991)	<0,001
IGF1 + E-kadherin	0,966	(0,935-0,996)	<0,001

4.2.2 Ispitivanje povezanosti SNP *IGF1* (rs2946834) i rizika za razvoj CRC

U nastavku smo istraživali eventualnu povezanost SNP *IGF1* (rs2946834) sa povećanim rizikom za razvoj CRC. Razlike u distribuciji genotipova između pacijenata sa CRC i kontrolne grupe nije bilo ($p=0,966$). Dalje su ispitane razlike u koncentracijama IGF1, E-kadherina, parametara lipidnog statusa i vrednostima ITM kod pacijenata sa CRC i u kontrolnoj grupi u odnosu na pomenuti polimorfizam. Statističke značajne razlike ni u jednom od ispitivanih markera između ispitanika sa GG genotipom i osoba sa GA+AA genotipom, niti u CRC, niti u kontrolnoj grupi nisu bile uočene (tabela 11). Dodatno, odstupanje od Hardy Weinbergovog principa ravnoteže nije postojalo ni u jednoj od ispitivanih grupa, a dobijene su sledeće relativne frekvence genotipova: CRC: GG=0,42 GA=0,50 AA=0,08; $\chi^2=1,041$; $p=0,307$; Kontrolna grupa: GG=0,41 GA=0,49 AA=0,10; $\chi^2=0,738$; $p=0,390$;

Tabela 11. Razlike u ispitivanim parametrima u odnosu na SNP *IGF1* (rs2946834)

Parametar	CRC			Kontrolna grupa		
	GG	GA+AA	p	GG	GA+AA	p
ITM, kg/m ²	24,745±3,583	25,339±2,932	0,506	26,073(24,923-27,271)	26,662(25,568-27,803)	0,472 ^b
TG, mmol/L	1,195 (0,951-1,440)	1,348 (1,078-1,538)	0,285 ^a	1,157 (0,889-1,354)	1,378 (1,213-1,566)	0,082 ^b
HDL-h, mmol/L	0,890 (0,766-1,035)	0,939 (0,841-1,049)	0,553 ^b	1,293 ±0,384	1,307 ±0,437	0,884
UH, mmol/L	4,257±0,926	4,458±1,225	0,485	5,396±0,968	5,691±1,090	0,233
LDL-h, mmol/L	2,729±0,827	2,862±0,963	0,574	3,523±0,887	3,717±0,993	0,390
IGF1, ng/mL	65,223 (55,424-76,736)	67,717 (60,492-75,823)	0,689 ^b	94,844 (78,285-111,403)	89,990 (80,569-100,697)	0,375 ^a
E-kadherin, ng/mL	117,192±32,105	132,283±43,156	0,137	57,919 ±14,260	61,351 ±15,094	0,324

Podaci su predstavljeni kao srednja vrednost ± standardna devijacija i upoređivani Studentovim *t*-testom.

^a Podaci su predstavljeni kao medijana (interkvartilni raspon) i upoređivani Mann-Whitney *U*- testom.

^b Podaci su predstavljeni kao geometrijska sredina (95% CI)

4.3 Ispitivanje markera adiponektinskog statusa i njihove povezanosti sa metaboličkim i imunološkim parametrima kod pacijenata sa CRC i u kontrolnoj grupi

Istraživanje je izvedeno u uzorcima 73 pacijenata sa CRC i 80 zdravih ispitanika. Grupe su bile homogene po polu, a pacijenti su i ovde bili značajno stariji i imali niži ITM od zdravih osoba. Ispitivanje nivoa genske ekspresije Adipor1 i 2 u PBMC je pokazalo da su nivoi iRNK Adipor1 bili niži kod pacijenata sa CRC, dok se nivo iRNK Adipor2 nije razlikovao između grupa (tabela 12). Od imunoloških parametara ispitivana je razlika u nivoima genske ekspresije TNF- α . Redukcija u nivoima iRNK TNF- α je takođe zapažena kod pacijenata sa CRC (tabela 12).

Tabela 12. Razlike u nivoima genske ekspresije Adipor1, Adipor2 i TNF- α između pacijenata sa CRC i kontrolne grupe

Parametar	CRC (N=73)	Kontrolna grupa (N=80)	P
Godine ^a	66,5 (58-74)	53 (50,2-58)	<0,001
Pol (ž/m)	24/49	38/42	0,066
ITM, kg/m ²	24,695±2,925	26,202±3,984	0,010
Adipor1 iRNK ^a	0,535 (0,446-0,748)	0,849 (0,706-1,088)	<0,001
Adipor2 iRNK ^b	0,978 (0,913-1,047)	0,939 (0,869-1,016)	0,442
TNF- α iRNK ^b	0,792 (0,688-0,912)	0,962 (0,877-1,056)	0,023

^a Podaci su prikazani kao medijana (interkvartilni raspon), dok je poređenje urađeno Mann-Whitney U- testom.

^b Podaci su prikazani kao geometrijska sredina i 95% CI, dok je poređenje urađeno Studentovim *t*- testom

4.3.1 Analiza korelacija između antropometrijskih i lipidnih parametara, adiponektinskih receptora i TNF- α

Korelaciona analiza odnosa između ispitivanih varijabli je pokazala da u grupi pacijenata sa CRC pozitivno koreliraju nivo iRNK TNF- α i koncentracija HDL-h, dok je negativna veza uočena između HDL-h i nivoa genske ekspresije Adipor1 (tabela 13). Sa druge strane u kontrolnoj grupi nivoi iRNK TNF- α i Adipor1 su negativno korelirali sa UH, dok je pozitivna korelacija uočena između

iRNK TNF- α i Adipor1 (tabela 13). Nivoi iRNK Adipor1 i Adipor2 su pozitivno korelirali u obe ispitivane grupe (tabela 13).

Tabela 13. Značajne korelacije između Adipor1 i Adipor2, TNF- α iRNK i parametara lipidne homeostaze

CRC		
Parametar	HDL-h, mmol/L	Adipor1 iRNK
TNF- α iRNK	$r = 0,238$; $p=0,043$	$\rho = 0,142$; $p=0,230$
Adipor2 iRNK	$r = -0,129$; $p=0,278$	$\rho = 0,268$; $p=0,022$
Adipor1 iRNK	$\rho = -0,262$; $p=0,025$	/
Kontrolna grupa		
Parametar	UH, mmol/L	Adipor1 iRNK
TNF- α iRNK	$\rho = -0,228$; $p=0,043$	$r = 0,619$; $p<0,001$
Adipor2 iRNK	$\rho = -0,204$; $p=0,072$	$r = 0,634$; $p<0,001$
Adipor1 iRNK	$\rho = -0,230$; $p=0,042$	/

4.3.2 Ispitivanje povezanosti SNP *ADIPOQ* (rs266729) i rizika za razvoj CRC

Statistički značajna razlika u distribuciji genotipova u slučaju *ADIPOQ* (rs266729) polimorfizma između CRC pacijenata i kontrola nije postojala ($p=0,492$). Ispitivano je postojanje razlika u nivoima genske ekspresije TNF- α , Adipor1 i Adipor2, kao i u vrednostima lipidnih markera i ITM u odnosu na određeni genotip rs266729 polimorfizma (zasebno u CRC i u kontrolnoj grupi). Niža ekspresija TNF- α je zabeležena u grupi CRC pacijenata sa CG i GG genotipom u poređenju sa CC genotipom sa graničnom statističkom značajnošću ($p=0,053$). Kada su u pitanju ostali parametri, nisu uočene značajne razlike ni u jednom od ispitivanih analiza između osoba sa CC genotipom i osoba sa CG+GG genotipom, niti u CRC, niti u kontrolnoj grupi (tabela 14). Odstupanje od Hardy Weinbergovog principa ravnoteže nije postojalo ni u jednoj od ispitivanih grupa, a dobijene su sledeće relativne frekvence genotipova CRC: CC=0,52 CG=0,36 GG=0,12; $\chi^2=1,735$; $p=0,188$; kontrolna grupa: CC=0,44 CG=0,45 GG=0,11; $\chi^2=0,003$; $p=0,955$.

Tabela 14. Razlike u ispitivanim parametrima u odnosu na SNP *ADIPOQ* (rs266729)

Parametar	CRC			Kontrolna grupa		
	CC	CG+GG	p	CC	CG+GG	p
ITM, kg/m ²	24,570±3,201	24,826±2,646	0,725	26,254±3,802	26,159±4,170	0,917
TG, mmol/L	1,284 (1,168-1,413)	1,195 (1,061-1,345)	0,335 ^b	1,272 (1,119-1,444)	1,223 (1,067-1,403)	0,685 ^b
HDL-h, mmol/L	0,995 (0,883-1,120)	0,975 (0,875-1,086)	0,803 ^b	1,276 (1,126-1,446)	1,264 (1,120-1,425)	0,910 ^b
UH, mmol/L	4,454 (4,058-4,889)	4,263 (3,934-4,619)	0,475 ^b	5,808±1,047	5,503±1,028	0,199
LDL-h, mmol/L	2,786 (2,456-3,160)	2,611 (2,302-2,961)	0,463 ^b	3,828±0,960	3,539±0,989	0,196
Adipor1 iRNK	0,526 (0,448-0,646)	0,549 (0,401-0,885)	0,903 ^a	0,802 (0,661-1,100)	0,876 (0,728-1,083)	0,385 ^a
Adipor2 iRNK	1,024 (0,923-1,137)	0,931 (0,852-1,017)	0,166 ^b	0,885 (0,729-1,145)	0,872 (0,679-1,192)	0,812 ^a
TNF- α iRNK	0,939 (0,680-1,302)	0,704 (0,468-1,171)	0,053 ^a	0,987 (0,643-1,393)	0,977 (0,776-1,163)	0,687 ^a

Podaci su predstavljeni kao srednja vrednost \pm standardna devijacija i upoređivani Studentovim *t*-testom.

^a Podaci su predstavljeni kao medijana (interkvartilni raspon) i upoređivani Mann-Whitney *U*- testom.

^b Podaci su predstavljeni kao geometrijska sredina (95% CI) i upoređeni Studentovim *t*-testom

4.3.3 Ispitivanje povezanosti SNP *ADIPOR1* (rs7539542) i rizika za razvoj CRC

Analogno prethodnom ispitivanju, iste analize su izvedene za polimorfizam *ADIPOR1* (rs7539542). Razlika u distribuciji genotipova nije nađena između pacijenata i kontrola ($p=0,778$). Ispitivanje razlika između parametara u grupama pacijenata i zdravih ispitanika je pokazalo da pacijenti sa CRC sa CG i GG genotipom imaju niže koncentracije HDL-h, LDL-h i UH, dok zdravi ispitanici sa istim genotipom imaju povišene nivoe TG (tabela 15). Odstupanje od Hardy-Weinbergovog principa ravnoteže nije postojalo ni u jednoj od grupa, a dobijene su sledeće relativne frekvence genotipova CRC: CC=0,48 CG=0,45 GG=0,07; $\chi^2=0,563$; $p=0,453$; kontrolna grupa: CC=0,51 CG=0,40 GG=0,09; $\chi^2=0,045$; $p=0,832$.

Tabela 15. Razlike u ispitivanim parametrima u odnosu na SNP *ADIPOR1* (rs7539542)

Parametar	CRC			Kontrolna grupa		
	CC	CG+GG	p	CC	CG+GG	p
ITM, kg/m ²	25,279±2,606	24,073±3,153	0,094	26,030±3,546	26,383±4,439	0,698
TG, mmol/L	1,275 (1,167-1,391)	1,210 (1,073-1,365)	0,489 ^b	1,098 (0,965-1,251)	1,413 (1,244-1,605)	0,006 ^b
HDL-h, mmol/L	1,140±0,437	0,952±0,241	0,029	1,276 (1,111-1,464)	1,262 (1,136-1,403)	0,904 ^b
UH, mmol/L	4,839 (4,472-5,237)	3,963 (3,648- 4,306)	0,001 ^b	5,601±1,037	5,668±1,056	0,777
LDL-h, mmol/L	3,068 (2,751-3,423)	2,401 (2,114-2,727)	0,004 ^b	3,663±0,963	3,664±1,013	0,996
Adipor1 iRNK	0,535 (0,454-0,674)	0,528 (0,399- 0,794)	0,453 ^a	0,870 (0,691-1,096)	0,834 (0,725-1,073)	0,866 ^a
Adipor2 iRNK	0,979 (0,885-1,085)	0,977 (0,887-1,075)	0,961 ^b	0,792 (0,668-1,192)	0,939 (0,776-1,145)	0,220 ^a
TNF-α iRNK	0,837 (0,647-1,219)	0,794 (0,579-1,204)	0,651 ^a	0,954 (0,825-1,104)	0,971 (0,862-1,093)	0,856 ^b

Podaci su predstavljeni kao srednja vrednost ± standardna devijacija i upoređivani Studentovim *t*-testom.

^a Podaci su predstavljeni kao medijana (interkvartilni raspon) i upoređivani Mann-Whitney *U*- testom.

^b Podaci su predstavljeni kao geometrijska sredina (95% CI) i upoređeni Studentovim *t*-testom

4.3.4 Ispitivanje povezanosti SNP *TNF- α* (rs1800629) i rizika za razvoj CRC

Dodatno je ispitana povezanost polimorfnihi varijanti *TNF- α* (rs1800629) sa nivoima genskih ekspresija adiponektinskih receptora i samog *TNF- α* , kao i povezanost ovog polimorfizma sa parametrima lipidnog statusa i ITM zasebno kod pacijenata i u kontrolnoj grupi. Razlike u distribuciji genotipova između pacijenata i kontrola nije bilo ($p=0,614$). U grupi ispitanika sa CRC nije bio prisutan nijedan homozigot AA, dok je samo jedan nosilac ovog genotipa bio uočen u kontrolnoj grupi. Nivoi genskih ekspresija, kao i lipidni parametri se nisu razlikovali po genotipu, kako kod pacijenata sa CRC, tako i kod zdravih osoba (tabela 16). Odstupanje od Hardy-Weinbergovog principa ravnoteže nije postojalo ni u jednoj od formiranih grupa, a dobijene su sledeće relativne frekvence genotipova CRC: GG=0,79 GA=0,21 AA=0; $\chi^2=0,957$; $p=0,328$; kontrolna grupa: GG=0,80 GA=0,19 AA=0,01; $\chi^2=0,013$; $p=0,909$.

Tabela 16. Razlike u ispitivanim parametrima u odnosu na SNP *TNF- α* (rs1800629)

Parametar	CRC			Kontrolna grupa		
	GG	GA+AA	p	GG	GA+AA	p
ITM, kg/m ²	24,848±3,067	24,173±2,400	0,436	26,208±4,127	26,178±3,492	0,978
TG, mmol/L	1,242 (1,143-1,349)	1,236 (1,026-1,488)	0,957 ^b	1,258 (1,134-1,396)	1,190 (0,941-1,505)	0,636 ^b
HDL-h, mmol/L	1,041 ±0,342	1,045 ±0,432	0,976	1,314 ±0,490	1,545 ±0,602	0,112
UH, mmol/L	4,323 (4,051-4,612)	4,514 (3,792-5,375)	0,568 ^b	5,587±1,092	5,822±0,808	0,424
LDL-h, mmol/L	2,680 (2,449-2,934)	2,780 (2,124-3,641)	0,738 ^b	3,658±1,050	3,682±0,673	0,912
Adipor1 iRNK	0,530 (0,444-0,794)	0,568 (0,449-0,631)	0,594 ^a	0,832 (0,704-1,074)	0,909 (0,725-1,269)	0,361 ^a
Adipor2 iRNK	0,989 (0,916-1,067)	0,939 (0,790-1,117)	0,548 ^b	0,887 (0,668-1,186)	0,869 (0,742-1,155)	0,540 ^a
TNF- α iRNK	0,810 (0,624-1,304)	0,683 (0,422-1,067)	0,445 ^a	0,972 (0,885-1,068)	0,923 (0,683-1,246)	0,656 ^b

Podaci su predstavljeni kao srednja vrednost \pm standardna devijacija i upoređivani Studentovim *t*-testom.

^a Podaci su predstavljeni kao medijana (interkvartilni raspon) i upoređivani Mann-Whitney *U*- testom.

^b Podaci su predstavljeni kao geometrijska sredina (95% CI) i upoređivani Studentovim *t*-testom

4.3.5 Ispitivanje nezavisnog doprinosa polimorfni varijanti *ADIPOQ* i *ADIPOR1* promenama nivoa ekspresije gena TNF- α i koncentracija lipidnih markera

S obzirom na postavljenu hipotezu prema kojoj polimorfizmi gena povezanih sa nivoom i funkcijom adiponektina mogu biti od značaja za razvoj inflamatornog odgovora i dislipidemije u CRC, ispitivali smo doprinos polimorfni varijanti *ADIPOQ* i *ADIPOR1* promenama nivoa ekspresije gena TNF- α i koncentracija lipidnih markera (UH, HDL-h, LDL-h). Najpre je izvedena univarijantna linearna regresija koja je ukazala na statistički značajnu povezanost između ITM i genske ekspresije TNF- α , zatim između koncentracija TG i UH, kao i TG i LDL-h (tabela 17). Na osnovu rezultata univarijantne regresione analize i prethodno uočenih razlika u nivoima genske ekspresije TNF- α i koncentracijama lipidnih parametara u okviru genotipskih podgrupa (CC i CG+GG) (tabele 14 i 15) polimorfizama *ADIPOQ* i *ADIPOR1*, formirani su modeli multivarijantne linearne regresije. Ova analiza je rađena samo u grupi pacijenata sa CRC, s obzirom da nas je ishod zanimao prvenstveno u karcinomu. Model 1 u koji su bili uključeni ITM i SNP *ADIPOQ* rs266729 je objasnio 9,9 % varijacije nivoa iRNK TNF- α , pri čemu su obe promenljive predstavljale nezavisne i značajne prediktore promena u zavisnoj promenljivoj (tabela 18). U Modelu 2 SNP *ADIPOR1* rs7539542 i koncentracija TG, su bili odgovorni za 16,4 % varijacije u koncentraciji LDL-h, dok je model 3 sa statistički značajnim kovarijatama (SNP *ADIPOR1* rs7539542 i koncentracija TG) mogao da se dovede u vezu sa 26,8 % varijacija u koncentraciji UH (tabela 18). U modelu koji je uključivao HDL-h, prediktor *ADIPOR1* rs7539542 nije pokazao statističku značajnost, te ovi rezultati u okviru doktorata nisu istaknuti.

Tabela 17. Univarijantna linearna regresiona analiza značajne povezanosti između ITM i nivoa genske ekspresije TNF- α , koncentracije TG i UH i koncentracije TG i LDL-h kod pacijenata sa CRC

	Standardizovan koeficijent β (Standardna greška)	p	Korigovano R ² ; p
ITM, kg/m ² *	0,267 (0,619)	0,030	R ² =0,057; p=0,030
TG, mmol/L**	0,306 (0,133)	0,008	R ² =0,081; p=0,008
TG, mmol/L [#]	0,404 (0,089)	<0,001	R ² =0,151; p<0,001

*Univarijantna linearna regresija: TNF- α iRNK zavisna promenljiva, nezavisna promenljiva ITM, kg/m²

**Univarijantna linearna regresija: LDL-h zavisna promenljiva, nezavisna promenljiva TG, mmol/L

[#]Univarijantna linearna regresija: UH zavisna promenljiva, nezavisna promenljiva TG, mmol/L

Nezavisne i zavisne promenljive su nakon logaritamske transformacije pratile normalnu raspodelu

Tabela 18. Multivarijantna linearna regresiona analiza za ispitivanje nezavisnog doprinosa polimorfni varijanti *ADIPOQ* i *ADIPOR1* promenama nivoa ekspresije gena TNF- α i koncentracije lipidnih markera kod pacijenata sa CRC

Model 1	Standardizovan koeficijent β	p	Korigovano R^2; p
(Standardna greška)			
ITM, kg/m ²	0,280 (0,605)	0,021	$R^2=0,099$; $p=0,014$
SNP <i>ADIPOQ</i>	-0.237 (0.062)	0.049	
Model 2	Standardizovan koeficijent β	p	Korigovano R^2; p
(Standardna greška)			
TG, mmol/L	0,281 (0,127)	0,011	$R^2=0,164$; $p=0,001$
SNP <i>ADIPOR1</i>	-0,307 (0,035)	0,006	
Model 3	Standardizovan koeficijent β	p	Korigovano R^2; p
(Standardna greška)			
TG, mmol/L	0,375 (0,083)	<0,001	$R^2=0,268$; $p<0,001$
SNP <i>ADIPOR1</i>	-0,355 (0,023)	0,001	

Model 1: Zavisna promenljiva: TNF- α iRNK

Model 2: Zavisna promenljiva: LDL-h

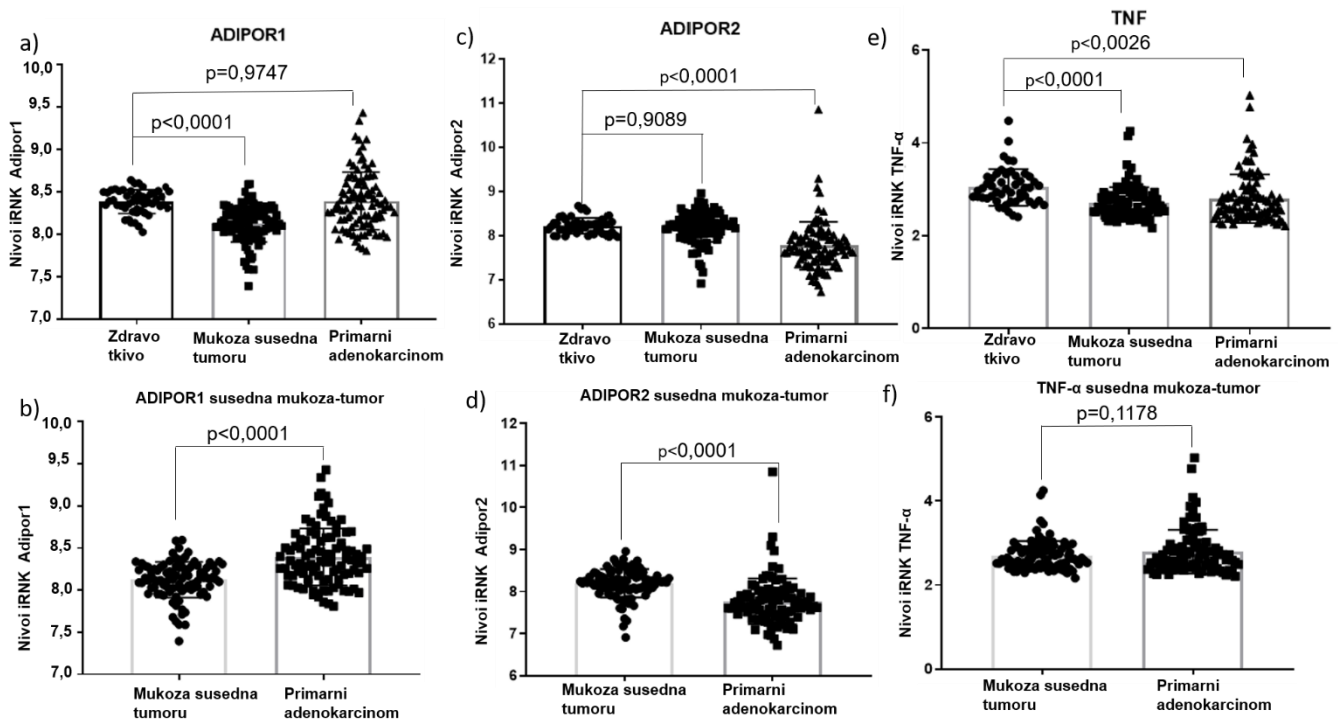
Model 3: Zavisna promenljiva: UH

Nezavisne i zavisne kontinuirane promenljive korišćene za pravljenje modela multiple regresione analize su nakon logaritamske transformacije pratile normalnu raspodelu

4.3.6 *In silico* analiza javno dostupnih baza transkriptomskih podataka, GSE44076 i GSE47756

Prema analizi GSE44076 baze podataka, nivoi iRNK *Adipor1* su bili povišeni u primarnim tumorima kolorektuma u odnosu na vrednosti uočene u normalnoj susednoj mukozi, dok su nivoi iRNK *Adipor2* bili sniženi u CRC ($p<0,0001$; slika 31b, 31d). Nivoi genske ekspresije TNF- α se u okviru grupa nisu razlikovali ($p=0,1178$, slika 31f). U tkivu tumora, GSEA je pokazala da nivoi genske ekspresije *Adipor2* pozitivno koreliraju sa genskim setovima vezanim za metaboličke puteve, prvenstveno za homeostazu holesterola, glikolizu, biosintezu steroida i PPAR signalne puteve (tabela 19). Sa druge strane, nivoi iRNK *Adipor1* su negativno korelirali sa TNF- α NF- κ B i *mechanistic target of rapamycin kinase (MTORC1)* signalnim putevima u grupi pacijenata sa CRC (tabela 19). Dalja analiza je pokazala da postoji statistički značajna razlika u nivoima genske ekspresije *Adipor1* i TNF- α između zdrave i

normalne susedne mukoze. Nivoi iRNK Adipor1 i TNF- α su bili niži u normalnoj susednoj mukozi, u poređenju sa potpuno zdravim tkivom ($p < 0,0001$; slika 31a i 31e), dok se genska ekspresija Adipor2 nije razlikovala ($p = 0,9089$, slika 31c). GSEA je pokazala da genska ekspresija Adipor1 negativno korelira sa genskim setovima vezanim za miogenezu i EMT u normalnoj susednoj mukozi (tabela 19). Takođe, poređenjem nivoa iRNK Adipor1, Adipor2 i TNF- α između maligno izmenjenog i potpuno zdravog tkiva uočena je niska genska ekspresija Adipor2 u karcinomu ($p < 0,0001$, slika 31c), kao i niski nivoi iRNK TNF- α ($p < 0,0026$, slika 31e), dok se iRNK Adipor1 nije razlikovala značajno između grupa ($p = 0,9747$, slika 31a).



Slika 31. Statistički značajne razlike u nivoima genske ekspresije Adipor1, Adipor2 i TNF- α između malignog tkiva, normalne susedne mukoze i zdravog tkiva prema bazi transkriptomskih podataka GSE4407

Tabela 19. GSEA analiza GSE44076 baze podataka. Korelacija nivoa iRNK Adipor2 i genskih setova vezanih za homeostazu holesterola, glikolizu, biosintezu steroida i PPAR signalizaciju u malignom tkivu. Korelacija nivoa iRNK Adipor1 i genskih setova vezanih za TNF- α NF- κ B i *MTORC1* signalizaciju u malignom tkivu. Korelacija nivoa iRNK Adipor1 i genskih setova vezanih za miogenezu i EMT u tumor-susednoj mukozi

Korelacije ekspresije gena Adipor1, Adipor 2 i genskih setova vezanih za određene signalne puteve	NES	Nom. p vrednost	FDR
Značajne korelacije Adipor1 u tumor-susednoj mukozi			
HALLMARK_MIOGENEZA	-1,669	0,036	0,209
HALLMARK_EPITELNA_MEZENHIMALNA_TRANZICIJA	-1,737	0,037	0,236
Značajne korelacije Adipor1 u maligno izmenjenom tkivu			
HALLMARK_TNFA_SIGNALIZACIJA_PREKO_NFKB	-1,752	0,033	0,092
HALLMARK_MYC_TARGETI_V1	-1,787	0,013	0,092
HALLMARK_E2F_TARGETI	-1,789	0,017	0,135
HALLMARK_KRAS_SIGNALIZACIJA_DN	1,753	0,004	0,158
HALLMARK_MTORC1_SIGNALIZACIJA	-1,580	0,059	0,189
HALLMARK_INTERFERON_GAMA_ODGOVOR	-1,594	0,084	0,202
HALLMARK_MYC_TARGETI_V2	-1,610	0,063	0,221
HALLMARK_G2M_KONTROLNA_TACKA	-1,804	0,018	0,243
KEGG_MISMATCH_REPAIR	-1,768	0,009	0,247
Značajne korelacije Adipor2 u tumor-susednoj mukozi	/	/	/
Značajne korelacije Adipor2 u maligno izmenjenom tkivu			
HALLMARK_HOLESTEROL_HOMEOSTAZA	1,835	0,010	0,101
HALLMARK_GLIKOLIZA	1,848	0	0,172
KEGG_GALAKTOZA_METABOLIZM	1,976	0	0,056
KEGG_GLIKOLIZA_GLUKONEOGENEZA	1,943	0	0,059
KEGG_SKROB_I_SAHAROZA_METABOLIZAM	1,729	0,010	0,199
KEGG_STERODI_BIOSINTEZA	1,740	0,020	0,203
KEGG_PPAR_SIGNALNI_PUT	1,657	0,018	0,233

Sve prikazane korelacije su značajne (uslov FDR<0,25). Boldovan prikaz se odnosi na korelacije koje su naglašene u istraživanju

U GSE47756 bazi podataka koja je obuhvatala PBM, nije bilo statistički značajnih razlika u nivoima genske ekspresije Adipor1, Adipor2 i TNF- α između pacijenata sa CRC i zdravih ispitanika ($p=0,1109$; $p=0,3268$; $p=0,6618$, sledstveno). Rezultati GSEA su pokazali direktnu povezanost između nivoa iRNK Adipor1 i genskih setova vezanih za homeostazu holesterola, glikolizu, insulinski signalni put u PBM pacijenata sa CRC (tabela 20). Nivoi genske ekspresije Adipor1 su takođe pozitivno korelirali sa genskim setovima vezanim za signalni put TNF- α NF- κ B i komponente komplemента (tabela 20) u uzorcima karcinoma.

Tabela 20. GSEA analiza GSE47756 baze podataka. Korelacija nivoa iRNK Adipor1 i genskih setova vezanih za homeostazu holesterola, glikolizu i insulinski signalni put u PBM pacijenata sa CRC. Korelacija nivoa iRNK Adipor1 i genskih setova vezanih za TNF- α NF- κ B signalizaciju i signalizaciju komponenti komplemента u PBM pacijenata sa CRC

Korelacije nivoa ekspresija gena Adipor1, Adipor 2 i genskih setova vezanih za određene signalne puteve	NES	Nom. p vrednost	FDR
Značajne korelacije Adipor1 u PBM pacijenata sa CRC			
HALLMARK_MYC_TARGETI_V2	-1,641	0,033	0,079
HALLMARK_E2F_TARGETI	-1,648	0,006	0,150
HALLMARK_KOMPLEMENT	1,461	0,033	0,175
HALLMARK_PI3K_AKT_MTOR_SIGNALIZACIJA	1,481	0,014	0,180
HALLMARK_HOLESTEROL_HOMEOSTAZA	1,310	0,104	0,205
HALLMARK_MYC_TARGETI_V1	-1,439	0,128	0,225
HALLMARK_MTORC1_SIGNALIZACIJA	1,328	0,066	0,231
HALLMARK_GLIKOLIZA	1,269	0,091	0,231
HALLMARK_IL2_STAT5_SIGNALIZACIJA	1,257	0,082	0,234
HALLMARK_TNFA_SIGNALIZACIJA_PREKO_NFKB	1,394	0,143	0,237
HALLMARK_P53_PUT	1,357	0,060	0,238
KEGG_INSULIN_SIGNALNI_PUT	1,716	0,002	0,124
KEGG_ADIPOCITOKINI_SIGNALNI_PUT	1,450	0,008	0,188
KEGG_KOLOREKTALNI_KARCINOM	1,484	0,024	0,191
KEGG_T_ĆELIJSKI_RECEPTOR_SIGNALNI_PUT	1,433	0,030	0,226
KEGG_GLIKOLIZA_GLUKONEOGENEZA	1,443	0,055	0,221
KEGG_INTESTINALNA_IMUNSKA_MREŽA_ZA_PRODUKCIJU_IGA	-1,526	0,079	0,145
KEGG_PRIRODNIM_ĆELIJAMA_UBICAMA_POSREDOVANA_CITOTOKSIČNOST	1,327	0,082	0,242
Značajne korelacije Adipor2 u PBM pacijenata sa CRC			
HALLMARK_SEKRECIJA_PROTEINA	-1,632	0,010	0,136

Sve prikazane korelacije su značajne (uslov $FDR < 0,25$). Boldovan prikaz se odnosi na korelacije koje su naglašene u istraživanju.

4.4 Ispitivanje postojanja razlika u plazmatskim koncentracijama rezistina, nivoima genske ekspresije rezistina i CAP-1 kod pacijenata sa CRC i u kontrolnoj grupi

U ispitivanju razlika u plazmatskim koncentracijama rezistina i nivoima genskih ekspresija rezistina i CAP-1 je učestvovalo 86 pacijenata sa CRC i 75 zdravih ispitanika. Kod novoformiranih grupa je i dalje postojala razlika prema godinama, ali je sada uočena i razlika prema polu. Muškarci su bili zastupljeniji u grupi pacijenata koja je očekivano bila i starija i imala niži ITM u odnosu na zdravu populaciju. Značajno više koncentracije rezistina, paralelno sa sniženom PBMC genskom ekspresijom rezistina su uočene kod pacijenata (tabela 21). Odnos plazmatskih koncentracija rezistina i iRNK rezistina je bio viši u karcinomu u odnosu na kontrolnu grupu. Viša genska ekspresija CAP-1 je zabeležena takođe u PBMC pacijenata sa CRC.

Tabela 21. Razlike u koncentraciji rezistina i nivoima PBMC genske ekspresije rezistina, CAP-1 između pacijenata sa CRC i kontrolne grupe

Parametar	CRC pacijenti (N=86)	Kontrolna grupa (N=75)	p
Godine	64,66±10,999	54,67±7,792	<0,001
Pol (ž/m)	26/60	37/38	0,013
ITM, kg/m ²	25,105±3,126	26,256±3,966	0,048
Rezistin, ng/mL ^a	19,692 (14,192-28,282)	10,537 (7,838-17,860)	<0,001
CAP-1 iRNK ^a	0,931 (0,789-1,143)	0,862 (0,732-1,012)	0,025
Rezistin iRNK ^a	0,444 (0,312-0,643)	0,693 (0,508-1,209)	<0,001
Koncentracija rezistina/iRNK rezistina ^a	42,519 (23,514- 63,179)	13,937 (10,199-24,492)	<0,001

Podaci su predstavljeni kao srednja vrednost ± standardna devijacija i upoređeni Studentovim- *t*-test.

^a Podaci su predstavljeni kao medijana (interkvartilni raspon) i poređenje je izvedeno Mann-Whitney U- testom.

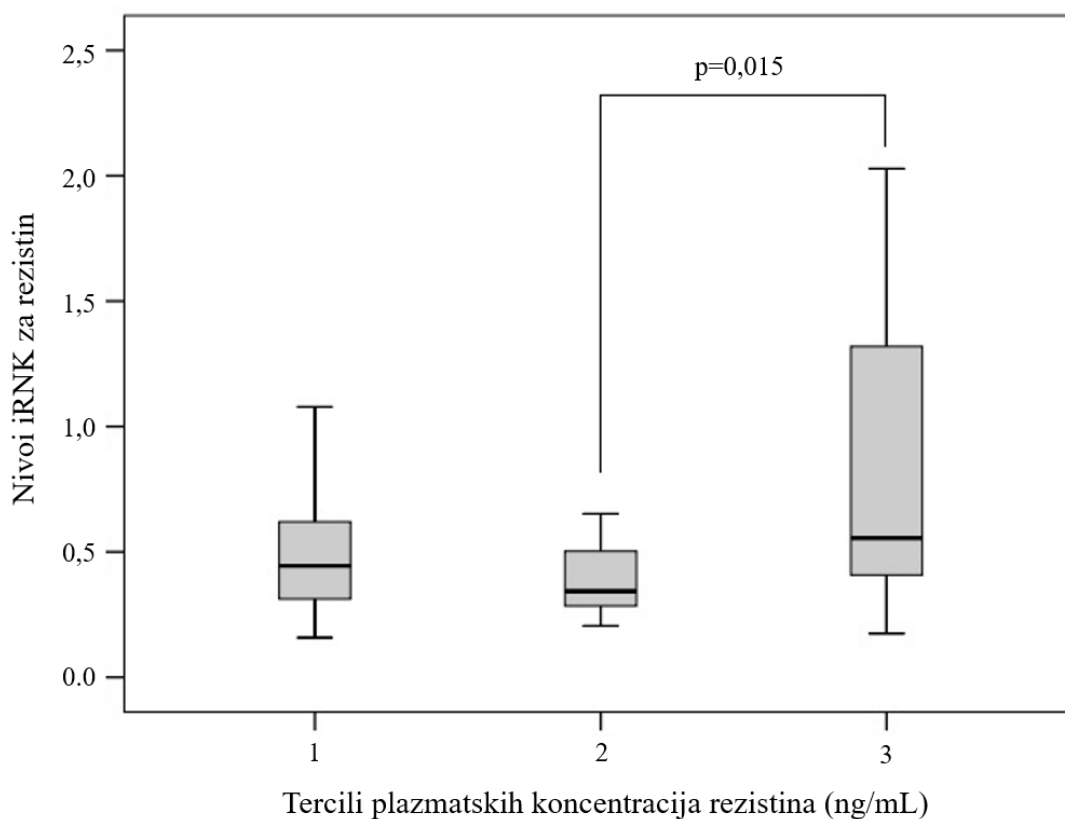
4.4.1 Analiza korelacija između antropometrijskih i lipidnih parametara, plazmatskih koncentracija rezistina i nivoa genske ekspresije rezistina i CAP-1

Korelaciona analiza je pokazala pozitivnu asocijaciju koncentracije rezistina sa vrednostima ITM i koncentracijom TG u grupi zdravih osoba (tabela 22). Kod pacijenata sa CRC je postojala pozitivna korelacija između ITM i nivoa iRNK CAP-1, dok su ITM i nivo HDL-h negativno korelirali sa plazmatskim koncentracijama rezistina. Dodatno, pozitivna korelacija je uočena između koncentracije rezistina i iRNK rezistina, no bez dostizanja statističke značajnosti (tabela 22).

Tabela 22. Značajne korelacije plazmatske koncentracije rezistina i nivoa genske ekspresije CAP-1 sa ITM i parametrima lipidnog statusa kod pacijenata sa CRC i zdravih ispitanika

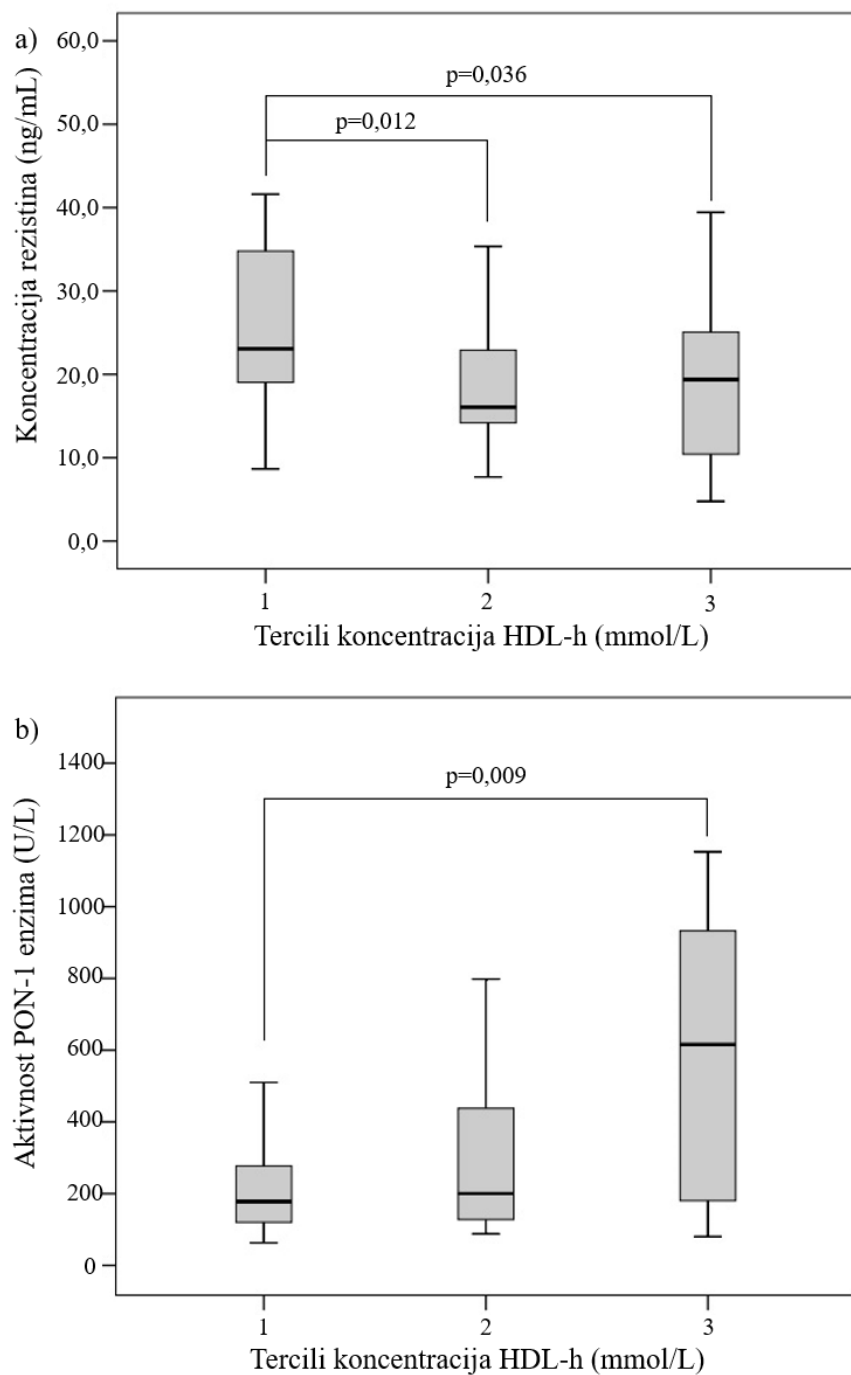
CRC		
Parametar	Rezistin, ng/mL	CAP-1 iRNK
ITM, kg/m ²	$\rho = -0,245$; $p=0,036$	$\rho = 0,222$; $p=0,05$
HDL-h, mmol/L	$\rho = -0,280$; $p=0,011$	$\rho = 0,062$; $p=0,571$
Rezistin iRNK	$\rho = 0,204$; $p=0,076$	$\rho = 0,083$; $p=0,458$
Kontrolna grupa		
Parametar	Rezistin, ng/mL	CAP-1 iRNK
ITM, kg/m ²	$\rho = 0,434$; $p<0,001$	$\rho = 0,069$; $p=0,564$
TG, mmol/L	$\rho = 0,277$; $p=0,021$	$\rho = 0,003$; $p=0,977$
Rezistin iRNK	$\rho = 0,078$; $p=0,521$	$\rho = 0,132$; $p=0,259$

S obzirom na graničnu povezanost koncentracije rezistina i nivoa iRNK rezistina, pacijenti sa CRC su klasifikovani u tri grupe u odnosu na tercile plazmatskih koncentracija rezistina. U ovoj analizi uočen je porast u nivoima genske ekspresije rezistina u odnosu na tercile koncentracije rezistina, sa statističkom značajnošću dostignutom između drugog i trećeg tercila (slika 32).



Slika 32. Promene u nivoima iRNK rezistina kroz tercile plazmatskih koncentracija rezistina kod pacijenata sa CRC.

Da bi se dodatno istražila korelacija koja je postojala između koncentracija HDL-h i rezistina, pacijenti su klasifikovani u tercile definisane prema koncentraciji HDL-h. Značajan porast koncentracije rezistina je uočen za koncentracije HDL-h koje su pripadale najnižem tercilu u odnosu na srednji i gornji tercil (slika 33a). Pozitivna korelacija koja je postojala između koncentracije HDL-h i enzimske aktivnosti PON-1 ($\rho=0,322$, $p=0,010$) u analiziranoj grupi, je usloвила istu klasifikaciju ispitanika, s tim da je ispitana enzimska aktivnost PON-1 kroz tercile HDL-h. Uočeno je da je aktivnost PON-1 bila statistički značajno povišena kada se radilo o koncentracijama HDL-h koje su pripadale najvišem tercilu u odnosu sa najnižim tercil (slika 33b).



Slika 33. Promene u plazmatskim koncentracijama rezistina i aktivnosti PON-1 kroz tercile koncentracija HDL-h kod pacijenata sa CRC: a) Promene u koncentracijama rezistina kroz tercile koncentracija HDL-h; b) Promene u aktivnosti PON-1 kroz tercile koncentracije HDL-h

4.4.2 Ispitivanje prediktivnog i dijagnostičkog značaja koncentracije rezistina, iRNK rezistina i CAP-1

U nastavku je ispitana nezavisna povezanost plazmatskih koncentracija rezistina i nivoa ekspresije gena rezistina i CAP-1 sa rizikom za nastanak CRC primenom univarijantne i multivarijantne binarne logističke regresione analize (tabele 23 i 24). Više koncentracije rezistina kao i viša genska ekspresija CAP-1, zajedno sa nižom genskom ekspresijom rezistina su se izdvojili kao potencijalni značajni prediktori povišenog rizika za razvoj CRC u univarijantnoj analizi, iako je širok interval pouzdanosti dobijen u slučaju iRNK CAP-1, najverovatnije kao posledica male veličine uzorka.

Tabela 23. Univarijantna binarna logistička regresiona analiza za ispitivanje značaja koncentracije rezistina, nivoa iRNK rezistina i CAP-1 u predikciji pojave CRC

Parametar	OR	95% CI	p
Rezistin, ng/mL	1,071	1,031-1,112	<0,001
Rezistin iRNK	0,325	0,160-0,661	0,002
CAP-1 iRNK	4,476	1,124-17,824	0,033

Nakon korekcije za godine starosti, pol, ITM i koncentracije, HDL-h i LDL-h u multivarijantnoj analizi (tabela 24), iRNK CAP-1 gubi svoj prediktivni potencijal, dok koncentracija rezistina ostaje statistički značajan prediktor uvećanog rizika za razvoj CRC. Nivoi iRNK rezistina nisu zadovoljili uslove Hosmer-Lemeshov-og testa u univarijantnoj regresionoj analizi, te ovaj parametar nije korišćen za formiranje modela u multivarijantnoj logističkoj regresiji.

Tabela 24. Multivarijantna binarna logistička regresiona analiza za procenu značaja plazmatske koncentracija rezistina kao nezavisnog prediktora razvoja CRC

Parametar	OR	95% CI	p
Godine	1,132	1,071-1,196	<0,001
Pol (ž/m)	1,366	0,477-3,907	0,561
ITM, kg/m ²	0,800	0,688-0,931	0,004
HDL-h, mmol/L	0,263	0,092-0,748	0,012
LDL-h, mmol/L	0,449	0,282-0,715	<0,001
Rezistin, ng/mL	1,055	1,009-1,103	0,019
CAP-1 iRNK	5,409	0,645-45,376	0,120

Varijable u sklopu modela su kontinuirane, izuzev pola. Enter model.

Dodatno je ispitana dijagnostička tačnost određivanih markera i klastera parametara (tabela 25). AUC>0,7 je dobijen za sve parametre sem za gensku ekspresiju CAP-1, dok je AUC>0,8 dobijen za odnos koncentracije rezistina/iRNK rezistina i za kombinaciju svih nezavisnih prediktora CRC identifikovanih prethodno u logističkoj regresionoj analizi.

Tabela 25. Površine ispod ROC krive za procenu kliničke tačnosti ispitivanih markera

Parametar	AUC	CI	p
Rezistin, ng/mL	0,741	0,663-0,820	<0,001
CAP-1 iRNK	0,603	0,515-0,690	0,025
Koncentracija resistina/iRNK rezistina	0,821	0,754-0,889	<0,001
Model 1	0,748	0,668-0,828	<0,001
Model 2	0,757	0,671-0,843	<0,001
Model 3	0,898	0,845-0,950	<0,001

Model 1: CAP-1 iRNK, rezistin (ng/mL)

Model 2: rezistin (ng/mL), aktivnost PON-1 (U/L), HDL-h (mmol/L)

Model 3: uključeni svi nezavisni prediktori CRC identifikovani multivarijantnom logističkom regresionom analizom ((godine, ITM (kg/m²), HDL-h (mmol/L), LDL-h (mmol/L), rezistin (ng/ml))

4.4.3 Ispitivanje povezanosti SNP *RETN* rs1862513 i rizika za razvoj CRC

Na kraju je analizirana i povezanost polimorfizma *RETN* rs1862513 sa plazmatskim koncentracijama rezistina i nivoima genske ekspresije rezistina i CAP-1. Razlika u distribuciji genotipova između pacijenata i kontrola nije postojala ($\chi^2 = 0,210$; $p = 0,900$). Kruskal-Wallis test nije pokazao značajne razlike u koncentraciji rezistina, nivoima iRNK rezistina i CAP-1 između ispitanika sa CC, CG i GG genotipom, ni kod pacijenata (koncentracija rezistina: $p = 0,361$; nivoi iRNK rezistina: $p = 0,509$; nivoi iRNK CAP-1: $p = 0,147$), ni u kontrolnoj grupi (rezistin: $p = 0,439$; iRNK rezistina: $p = 0,074$; iRNK CAP-1: $p = 0,860$). Odstupanje od Hardy-Weinbergovog principa ravnoteže nije postojalo ni u jednoj od prijavljenih grupa, a dobijene su sledeće relativne frekvence genotipova CRC: CC = 0,55; CG = 0,35; GG = 0,1; $\chi^2 = 1,196$ $p = 0,274$; kontrolna grupa: CC = 0,57; CG = 0,35; GG = 0,08; $\chi^2 = 0,525$ $p = 0,469$.

S obzirom da se statistička značajnost za povezanost polimorfizma *RETN* rs1862513 i nivoa ekspresije gena rezistina u kontrolnoj grupi mogla okarakterisati kao granična ($p=0,074$), analogno ranijim analizama SNP, ispitanici sa GG genotipom su pridruženi grupi CG heterozigota. Ponovo je ispitana povezanost polimorfizma *RETN* rs1862513 i plazmatskih koncentracija rezistina, nivoa ekspresije gena rezistina i CAP-1, uz dodatno ispitivanje povezanosti SNP i parametara lipidnog statusa, aktivnosti PON-1 i ITM zasebno u grupi pacijenata i kontrola. Nivoi genskih ekspresija, kao i ostali ispitivani parametri se nisu razlikovali prema genotipu, ni kod pacijenata sa CRC, ni kod zdravih osoba (tabela 26).

Tabela 26. Razlike u ispitivanim parametrima u odnosu na SNP *RETN* rs1862513

Parametar	CRC			Kontrolna grupa		
	CC	CC+CG	p	CC	CC+CG	p
ITM, kg/m ²	24,379±2,919	25,307±2,806	0,172	25,862±3,025	26,789±4,972	0,362
TG, mmol/L	1,231 (1,102-1,375)	1,314 (1,182-1,460)	0,397 ^b	1,245 (1,106-1,402)	1,383 (1,185-1,615)	0,266 ^b
HDL-h, mmol/L	0,943 (0,848-1,048)	0,996 (0,885-1,120)	0,486 ^b	1,329 (1,172-1,507)	1,225 (1,060-1,416)	0,395 ^b
UH, mmol/L	4,169 (3,834-4,532)	4,530 (4,153-4,940)	0,170 ^b	5,762±1,116	5,623±0,914	0,567
LDL-h, mmol/L	2,587 (2,325-2,879)	2,786 (2,436-3,186)	0,378 ^b	3,709±1,044	3,646±0,910	0,789
Rezistin iRNK	0,451 (0,312-0,639)	0,424 (0,306-0,787)	0,944 ^a	0,806 (0,685-0,949)	0,723 (0,595-0,879)	0,387 ^b
CAP-1 iRNK	0,972±0,264	0,944±0,238	0,626	0,869 (0,814-0,928)	0,874 (0,804-0,950)	0,920 ^b
Rezistin, ng/mL	18,235 (15,353-21,662)	22,506 (17,738-28,556)	0,141 ^b	10,987 (9,053-13,332)	12,615 (10,037-15,856)	0,350 ^b
Paraoksonazna aktivnost PON-1, U/L	284 (208-388)	244 (170-349)	0,508 ^b	253 (175-654)	316 (215,5-568)	0,345 ^a
Koncentracija resistina/iRNK resistina	37,179 (29,985-46,089)	44,937 (32,263-62,589)	0,318 ^b	13,580 (10,478-17,603)	17,108 (12,870-22,740)	0,231 ^b

Podaci su predstavljeni kao srednja vrednost ± standardna devijacija i upoređivani Studentovim *t*-testom.

^a Podaci su predstavljeni kao medijana (interkvartilni raspon) i upoređivani Mann-Whitney *U*- testom.

^b Podaci su predstavljeni kao geometrijska sredina (95% CI) i upoređivani Studentovim *t*-testom

4.4.4 Rezultati evaluacije gensko-genskih interakcija i interakcija gena sa faktorima spoljašnje sredine primenom MDR softvera

MDR analiza je izvršena na osnovu podataka o genotipizaciji 81 pacijenata sa CRC i 175 zdravih ispitanika. Ovom analizom su bili obuhvaćeni sledeći polimorfizmi: *RETN* rs1862513, *ADIPOR1* rs1342387, *ADIPOR1* rs7539542, *IGF1* rs2946834, *ADIPOQ* rs266729, dok su od faktora spoljašnje sredine bili uključeni pušački status, alkohol i fizička aktivnost. Polimorfizam *TNF- α* rs1800629 nije razmatran u ovom delu istraživanja s obzirom na nedostatak AA genotipa u grupi pacijenata sa CRC, dok su modeli sa SNP *ADIPOR1* rs7539542 bili lošijih performansi i nisu pokazali zadovoljavajuće interakcione grafike. Uz to, utvrđeno je da između dva polimorfizma *ADIPOR1* postoji LD (tabela 27). S obzirom da pojedini autori [188] ukazuju na pad u osetljivosti MDR analize za detekciju direktne povezanosti SNP i rizika za razvoj bolesti, poželjno je za pravilno ispitivanje SNP-SNP interakcija izbegavati LD, pogotovo visok LD.

Usled proširenja kontrolne grupe za MDR softversku analizu, ponovo je ispitana distribucija genotipova kao i odstupanje od Hardy-Weinbergovog principa ravnoteže. Razlike u distribuciji genotipova polimorfizama za prikazane relativne frekvence ni ovde nije bilo (tabela 28). Odstupanje od Hardy-Weinbergovog principa ravnoteže nije postojalo ni u jednoj od analiziranih grupa: [*RETN* rs1862513 (CRC: $\chi^2=0,810$, $p=0,368$; kontrolna grupa: $\chi^2=0,006$, $p=0,940$); *ADIPOQ* rs266729 (CRC: $\chi^2=0,103$, $p=0,748$; kontrolna grupa: $\chi^2=1,822$, $p=0,177$); *ADIPOR1* rs1342387 (CRC: $\chi^2=2,763$, $p=0,096$; kontrolna grupa: $\chi^2=0,000$, $p=0,993$); *ADIPOR1* rs7539542 (CRC: $\chi^2=0,162$, $p=0,687$; kontrolna grupa: $\chi^2=0,445$, $p=0,505$); *IGF1* rs2946834 (CRC: $\chi^2=0,025$, $p=0,875$; kontrolna grupa: $\chi^2=0,027$, $p=0,870$).

Tabela 27. Koeficijenti analize LD između polimorfizama: *ADIPOQ* rs266729, *ADIPOR1* rs1342387, *ADIPOR1* rs7539542, *RETN* rs1862513, *IGF1* rs2946834

	<i>ADIPOQ</i> rs266729	<i>IGF1</i> rs2946834	<i>ADIPOR1</i> rs1342387	<i>ADIPOR1</i> rs7539542
<i>RETN</i> rs1862513	0,067 0,061 0,167	0,108 -0,042 0,340	0,110 -0,060 0,173	0,063 0,055 0,212
<i>ADIPOQ</i> rs266729		0,407 -0,174 8,1e ⁻⁰⁵	0,010 -0,006 0,889	0,061 0,058 0,187
<i>IGF1</i> rs2946834			0,030 0,021 0,627	0,224 -0,100 0,024
<i>ADIPOR1</i> rs1342387	D' r p			0,244 -0,151 0,001

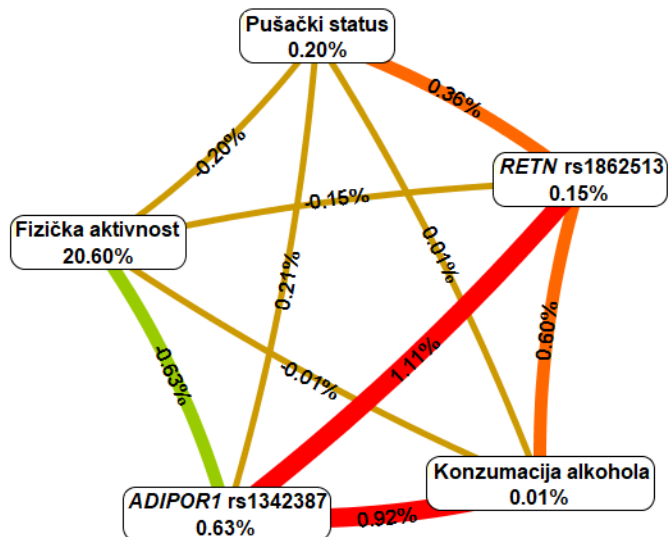
U tabeli 27. su prikazani koeficijenti LD: D', korelacioni koeficijent r i p vrednost za sve polimorfizme od interesa. D'<0,2 ukazuje da nema LD između dva lokusa, D'>0,5 ukazuje na slabiji LD, D'>0,8 na postojanje LD između dva lokusa, dok je vrednost od 1 označavala potpuni LD.

Tabela 28. Relativne frekvence genotipova za *RETN* rs1862513, *ADIPOQ* rs266729, *ADIPOR1* rs1342387, *ADIPOR1* rs7539542 i *IGF1* rs2946834

SNP	Genotip	CRC (N=81)	Kontrolna grupa (N=175)	p
<i>RETN</i>_rs1862513	C/C	46 (57,0%)	99 (57,0%)	0,764
	C/G	28 (35,0%)	65 (37,0%)	
	G/G	7 (9,0%)	11 (6,0%)	
<i>ADIPOQ</i>_rs266729	C/C	45 (56,0%)	82 (47,0%)	0,375
	C/G	30 (37,0%)	81 (46,0%)	
	G/G	6 (7,0%)	12 (7,0%)	
<i>ADIPOR1</i>_rs1342387	C/C	25 (31,0%)	51 (29,0%)	0,325
	C/T	33 (41,0%)	87 (50,0%)	
	T/T	23 (28,0%)	37 (21,0%)	
<i>ADIPOR1</i>_rs7539542	CC	43 (53,0%)	79 (45,0%)	0,441
	CG	33 (41,0%)	80 (46,0%)	
	GG	5 (6,0%)	16 (9,0%)	
<i>IGF1</i>_rs2946834	GG	35 (43,0%)	86 (49,0%)	0,527
	GA	36 (44,0%)	74 (42,0%)	
	AA	10 (12,0%)	15 (9,0%)	

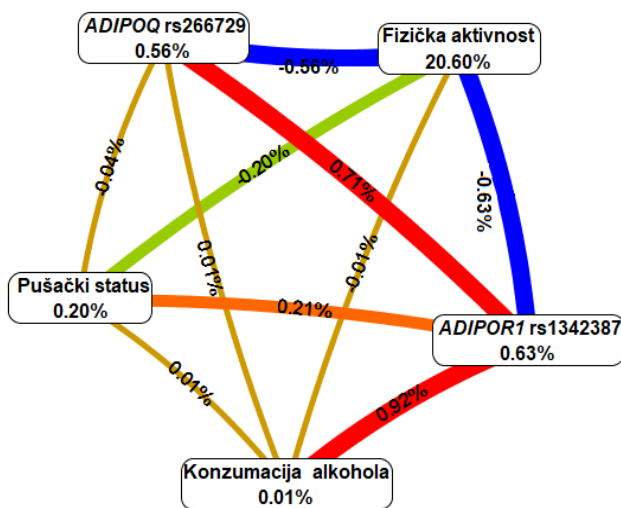
MDR analizom su se izdvojila dva adekvatna modela za predikciju razvoja CRC, u odnosu na preostale potencijalne kombinacije. Oba modela su uključivala po 5 atributa. U sklopu Modela 1 su bili uključeni: polimorfizmi gena za rezistin i Adipor1 (*RETN* rs1862513 i *ADIPOR1* rs1342387), dok su od faktora spoljašnje sredine bili obuhvaćeni pušački status, konzumacija alkohola i fizička aktivnost ispitanika (TA: 0,7175; CVC: 10/10). Drugi model je podrazumevao polimorfizme gena za adiponektin i Adipor1 (*ADIPOQ* rs266729 i *ADIPOR1* rs1342387), dok su faktori spoljašnje sredine ostali isti kao u Modelu 1 (TA: 0,6508; CVC: 10/10). U prikazanim modelima je poštovana preporuka za LD (tabela 27).

Nakon izbora najboljih modela, kreirani su grafici interakcija kako bi se ispitala vrsta i jačina veze između samih SNP, odnosno SNP i faktora spoljašnje sredine. Prvi grafik (slika 34) je pokazao sinergizam između SNP gena za rezistin i Adipor1 (*ADIPOR1* rs1342387 i *RETN* rs1862513), ali i sinergizam između *ADIPOR1* rs1342387 i upotrebe alkohola. Slabiji sinergizam je postojao u slučaju interakcije SNP *RETN* rs1862513 i konzumacije alkohola, kao i kada se radilo o interakciji SNP *RETN* rs1862513 i pušačkog statusa. Nezavisnost u interakcijama je uočena između SNP *ADIPOR1* rs1342387 i pušačkog statusa, stepena fizičke aktivnosti i pušenja, kao i stepena fizičke aktivnosti i alkohola, pušenja i alkohola, te SNP *RETN* rs1862513 i fizičke aktivnosti. Redundantnost je postojala između SNP *ADIPOR1* rs1342387 i fizičke aktivnosti.



Slika 34. Fruchterman-Rheingold grafik interakcije ADIPOR1 rs1342387 i RETN rs1862513, konzumacije alkohola, fizičke aktivnosti i pušačkog statusa.

U zavisnosti od tipa interakcije, boje interakcionih linija se razlikuju tako da crvena ukazuje na najviši stepen sinergizma, a narandžasta ukazuje slabiji stepen sinergizma. Plava ukazuje na najviši stepen redundantnosti, zelena na slabiju redundantnost, dok se žuta se nalazi u sredini između sinergizma i redundantnosti i ukazuje na nezavisnost.



Slika 35. Fruchterman-Rheingold grafik interakcije ADIPOR1 rs1342387 i ADIPOQ rs266729, konzumacije alkohola, fizičke aktivnosti i pušačkog statusa.

U zavisnosti od tipa interakcije, boje interakcionih linija se razlikuju tako da crvena ukazuje na najviši stepen sinergizma, a narandžasta ukazuje slabiji stepen sinergizma. Plava ukazuje na najviši stepen redundantnosti, zelena na slabiju redundantnost, dok se žuta se nalazi u sredini između sinergizma i redundantnosti i ukazuje na nezavisnost.

Drugi *Fruchterman-Rheingold* grafik (slika 35) je ukazao na značajan sinergizam između *ADIPOQ* rs266729 i *ADIPOR1* rs1342387, kao i ispitivanog polimorfizma *ADIPOR1* i konzumacije alkohola. Slabiji sinergizam je uočen između polimorfizma *ADIPOR1* rs1342387 i pušenja, dok je značajna redundantnost postojala između polimorfizama *ADIPOQ* rs266729 i stepena fizičke aktivnosti, kao i polimorfizma *ADIPOR1* rs1342387 i stepena fizičke aktivnosti. Takođe je uočen slabiji stepen redundantnosti između vežbanja i pušačkog statusa. Nezavisan odnos je postojao između polimorfizma *ADIPOQ* rs266729 i konzumiranja alkohola, te *ADIPOQ* rs266729 i pušačkog statusa. Nezavisnost je uočena i kada su bile u pitanju interakcije samih faktora spoljašnje sredine, i to u kombinacijama alkohol-pušački status, alkohol- fizička aktivnost.

5. Diskusija

Porast incidence CRC, zajedno sa povećanom stopom mortaliteta, upozorava da su potrebne nove strategije za ranu detekciju ovog oboljenja. Istovremeno, zabrinjava i relativno loš obuhvat opšte populacije dostupnim skrining i dijagnostičkim procedurama, koje su mahom invazivne i neprijatne za pacijenta. Stoga se naglasak u istraživanjima sve više stavlja na detekciju i evaluaciju novih, brzih i pouzdanih biomarkera CRC, uz istovremeno smanjenje invazivnosti dijagnostičkih postupaka. U tom smislu, markeri koji se određuju u perifernoj krvi imaju najveći značaj. Međutim, dosadašnji naponi da se identifikuje visoko osetljiv i tačan rani serumski marker CRC uglavnom nisu dali zadovoljavajuće rezultate. Novi istraživački pristup se zato okreće kombinovanju lako dostupnih biomarkera, u cilju da se prevaziđu ograničenja koja nosi primena pojedinačnih parametara u ranoj dijagnostici i proceni rizika za nastanak oboljenja. Budući da je CRC bolest sa kompleksnom i još uvek nepotpuno razjašnjenom etiologijom, multimarkerski pristup bi otvorio nove perspektive u prevenciji, dijagnostici, ali i lečenju ovog stanja. Integracija parametara lipidnog metabolizma, inflamacije, imunog odgovora i oksidativnog statusa u evaluaciji rizične populacije i pacijenata sa CRC bi mogla značajno unaprediti dijagnostiku, ali i otvoriti mogućnost individualizovanog tretmana obolelih. S obzirom na kompleksnost malignih bolesti, već je pretpostavljeno da samo sveobuhvatni pristup, koji se sastoji od integrativne multiparametarske analize može dovesti do detaljnog razumevanja karcinogeneze i osigurati adekvatnu prediktivnu, preventivnu i personalizovanu medicinsku praksu [45, 189].

Iako se poremećaji lipidnog statusa neretko mogu sresti u CRC, evidentan je nedostatak studija koje bi analizirale sve aspekte proširenog lipidnog profila. Imajući u vidu značaj i prevalencu oboljenja u savremenom svetu, detaljan uvid u promene metabolizma lipoproteina kod pacijenata sa CRC bi mogao biti važan za bolje razumevanje etiologije i prognozu ovog stanja. Naime, rutinsko određivanje parametara lipidnog statusa u našoj studiji je ukazalo na snižene vrednosti UH, LDL-h i HDL-h u grupi pacijenata sa CRC (tabela 1). Ovakvi rezultati su i od ranije predmet rasprava u naučnoj zajednici, s obzirom da su brojna istraživanja istakla značaj povišenih koncentracija UH i LDL-h kod pacijenata sa CRC [190]. Prikazani rezultati (tabela 1) bi mogli predstavljati posledicu slabog nutritivnog statusa koji je uobičajen kod pacijenata sa tumorom, što dalje ukazuje na činjenicu da su poremećaji u lipidnom profilu pre posledica maligne bolesti, nego mogući faktor rizika [191].

S druge strane, danas se posebna pažnja posvećuje istraživanju efekata holesterola na razvoj, preživljavanje, progresiju i metastaziranje različitih ćelija karcinoma. Sagledavaju se i mehanizmi pomoću kojih metaboliti holesterola menjaju signalne puteve tako da “rade u njihovu korist” [192]. Značajno je istaći i da promene u metabolizmu holesterola ometaju različite terapijske strategije, što dovodi u pitanje pretpostavku o holesterolu kao posledici maligniteta i podstiče istraživanje njegovog potencijalnog nezavisnog uticaja na razvoj CRC [192]. Dosadašnji rezultati analiza povezanosti lipidnog statusa sa pojavom i tokom bolesti su vrlo raznoliki, od pretpostavki da su povišeni nivoi lipidnih parametara povezani sa metastazama tumora [190], do toga da nishodno regulisana sinteza UH utiče na

preživljavanje ćelija CRC [193]. Nedavno objavljeni zaključci istraživanja Abaz i sar. su slični našim. Naime, u pomenutoj studiji je uočeno sniženje koncentracija UH, HDL-h i LDL-h kod pacijenata sa CRC, zajedno sa sniženim nivoima TG i ApoA1 i B-100 [194]. Pored verovatnog uticaja lošijeg nutritivnog statusa, moguće je da smanjenje koncentracija lipida nastaje kao posledica pojačanih potreba malignih ćelija za holesterolom, koji one dalje koriste za sopstveni rast i proliferaciju [195]. Pojačana potrošnja holesterola od strane malignih ćelija bi svakako dovela do deprivacije njegovih plazmatskih koncentracija.

Promene nivoa HDL-h u malignim bolestima su posebno zanimljive. U brojnim studijama smanjeni nivoi HDL-h su konstantno povezivani sa razvojem adenomatoznih polipa i CRC [196, 197]. Pored toga, studija Wang i sar. je ukazala na evidentan porast nivoa HDL-h nakon adjuvantne hemoterapije kod pacijenata sa CRC [198]. Interesovanje za ulogu HDL-h kao prognostičkog markera se dodatno povećalo nakon otkrića da se njegova zaštitna uloga u malignim bolestima ostvaruje, između ostalog i antiangiogenim efektima, preko ApoA1 posredovane inhibicije matriks-metaloproteinaze 9 i mijeloidnih supresorskih ćelija [199]. Međutim, uprkos brojnim dokazima koji povezuju nivo HDL-h sa protektivnim ulogama u karcinomu, nedostaju studije o promenama koncentracije i aktivnosti ključnih modulatora HDL čestica.

U okviru opsežnog istraživanja potencijala novih biomarkera za predikciju rizika za razvoj CRC i primenu integrativnog analitičkog pristupa, određene su aktivnosti enzima odgovornih za remodelovanje i anti-oksidativnu funkciju HDL čestica. LCAT je glavni enzim odgovoran za esterifikaciju holesterola u plazmi i brojne studije su ukazale na njegov značaj u kardiovaskularnim bolestima [200]. U našem istraživanju je uočena snižena aktivnost LCAT kod pacijenata sa CRC (tabela 2). Poznato je da se nedostatak LCAT povezuje sa poremećajima u sazrevanju HDL čestica i posledično sa sniženim nivoima HDL-h [64]. Ovakvi rezultati sugerišu da bi jedan od mogućih razloga za smanjenje koncentracije HDL-h u CRC mogla biti upravo snižena aktivnost LCAT. Zanimljivo je da je aktivnost LCAT pozitivno korelirala sa nivoom UH kod pacijenata sa CRC ($p=0,036$). Stoga bismo mogli da pretpostavimo da smanjenje koncentracija holesterola u plazmi, možda predstavlja pokretačku silu za smanjenje aktivnosti LCAT, što će na kraju rezultirati nižom koncentracijom HDL-h. Štaviše, Xin Zhang i sar. [68] su pokazali da su nivoi slobodnog holesterola u serumu bili značajno viši u CRC paralelno sa nižom koncentracijom UH, što predstavlja potvrdu naše hipoteze. Međutim, tačni molekularni mehanizmi koji dovode do smanjenja aktivnosti LCAT kod ove grupe pacijenata još uvek nisu razjašnjeni. Neočekivano, aktivnost LCAT je negativno korelira sa koncentracijom HDL-h ($p=0,044$), ali pozitivno sa nivoima TG ($p=0,002$) kod zdravih ispitanika. Ovakva povezanost je već ranije opisana [201] i može se objasniti kao kompenzatorno povišenje aktivnosti LCAT u pokušaju da se poveća niska koncentracija HDL-h.

Kako je prethodno navedeno, CETP predstavlja enzim koji je uključen u prenos holesterol estara sa HDL čestica na lipoproteine vrlo male gustine (VLDL) i LDL, u zamenu za TG. Aktivnost CETP je u velikoj meri istražena u kardiovaskularnim bolestima [202, 203], ali do sada nema podataka koji se

odnose na nivo i aktivnost ovog proteina u CRC. Naši rezultati su pokazali da uprkos sniženju u koncentracijama CETP, aktivnost ovog proteina ostaje značajno povišena (tabela 2) kod pacijenata sa CRC, što potencijalno ukazuje na značaj ovog enzima u razvoju maligniteta. Budući da je jetra glavno mesto sinteze CETP, za očekivati je da masena koncentracija CETP bude snižena u uslovima koje karakteriše narušena sintetska funkcija jetre, kao u slučaju CRC. Niske koncentracije ukupnih proteina i albumina uočenih kod naših pacijenata sa CRC (tabela 1) potvrđuju prethodno. CETP je nedavno identifikovan kao jedan od činilaca razvoja raka dojke [204], uglavnom zahvaljujući njegovoj ulozi u ćelijskom preuzimanju holesterola [205]. Naime, pokazano je da pored olakšanog ćelijskog preuzimanja holesterola, CETP pojačava transport holesterola i njegovo skladištenje u okviru samih ćelija [206, 207]. Istraživanjima se došlo do zaključka da CETP olakšava transport holesterol estara sa HDL na ćelije raka jetre HepG2 [208], što je potvrđeno studijom Huang i sar. [209], koji su istakli nishodno regulisanu ekspresiju CETP kao uzročnika sniženog preuzimanja HDL-holesterol estara od strane HepG2 ćelija, SR-BI posredovanim transportom. Činjenica je da sve kancerogene ćelije imaju pojačanu potrebu za holesterolom [205], te se malopredloženi opisani mehanizmi mogu smatrati odgovornim i za ulogu CETP u razvoju CRC.

Međutim, treba istaći da je poznato da aktivnost CETP može da varira nezavisno od nivoa proteina, kao odgovor na promene u mikrookolini i prisustvo aktivatora ili inhibitora. Stoga je moguće da promene uočene u našoj studiji predstavljaju ishod promena koje nastaju u plazmi pacijenata sa CRC. Ne treba zanemariti ulogu CETP u remodelovanju HDL čestice. Naime, povećana aktivnost CETP dovodi do obogaćivanja HDL sa TG, čime se narušava i struktura i funkcija ovog lipoproteina [210]. Disfunkcionalni HDL nije u stanju da pruži adekvatnu antioksidativnu i antiinflamatornu zaštitu, što pokreće kaskadu događaja koji su uključeni u aterogenezu [210], ali je isto tako pokazano da sličan prooksidativni i proinflamatorni milje doprinosi i razvoju CRC [211, 212].

Povišene vrednosti PAB pružaju dokaze o povišenom oksidativnom stresu u CRC, dok snižena paraoksonazna i arilesterazna aktivnost PON-1 ilustruje redukciju antioksidativne funkcije HDL (tabela 2). PON-1 je biomolekul od posebnog značaja, jer predstavlja direktnu sponu između lipidnog statusa i oksidativnog stresa. Snižena aktivnost PON-1, zajedno sa smanjenom aktivnošću LCAT i povećanom aktivnošću CETP može se posmatrati kao indikator nepoželjnih promena u strukturi i funkciji HDL. Naime, poznato je da izmenjena struktura ovog lipoproteina može ugroziti i njegova funkcionalna svojstva [210]. U ovom kontekstu, važno je napomenuti da je povećana aktivnost CETP zabeležena kod zdravih ispitanika sa niskoaktivnim fenotipom A PON-1, dok su kod pacijenata sa CRC visoke vrednosti PAB korelirale sa većom masenom koncentracijom CETP ($p=0,015$). Iako nismo bili u mogućnosti da direktno izmerimo kapacitet vezivanja PON-1 za HDL, naši rezultati ukazuju na potencijalnu povezanost između izmenjenih aktivnosti proteina za transfer lipida, promene u strukturi HDL i posledičnih štetnih efekata na antioksidativna svojstva HDL, što se ogleda kroz nižu aktivnost PON-1. Sveukupno, posmatrani rezultati sugerišu da bi čestice HDL mogle biti postavljene u središte složene interakcije dislipidemije i oksidativnog stresa tokom razvoja CRC. Shodno tome, strukturalna i funkcionalna analiza

ovog lipoproteina mogu pružiti važne podatke o individualnoj sklonosti ka razvoju karcinoma, kao i podatke o njegovoj ulozi u prognozi i lečenju bolesti.

U cilju daljeg istraživanja, analizirali smo mogući doprinos koncentracija HDL-h i CETP, kao i aktivnosti LCAT, CETP i PON-1 predikciji pojave CRC. Multivarijantna analiza je pokazala da aktivnost CETP ima potencijal za predviđanje rizika za razvoj CRC, čak i kada se izvrši korekcija za tradicionalne faktore rizika, kao što su starost, pol i lipidni status (tabela 4, model 1). Međutim, uključivanje markera oksidativnog stresa u potpunosti je poništilo nezavisni doprinos povećane aktivnosti CETP predikciji razvoja CRC, sugerirajući da su uočene promene u aktivnosti ovog proteina verovatno rezultat generalizovanih poremećaja intravaskularne homeostaze koji se mogu pripisati samoj bolesti (tabela 4, model 2). Sa druge strane, interesantni rezultati su dobijeni kada je primenjena ista analiza za masenu koncentraciju CETP u serumu. Naime, korekcija za stepen oksidativnog stresa nije ugrozila mogući nezavisni doprinos sniženih koncentracija CETP predikciji rizika za razvoj CRC (tabela 5, modeli 1 i 2). Dalje, nakon korekcija za koncentracije serumskog albumina, kao jednog od indikatora sintetske funkcije jetre, masena koncentracija CETP zadržava svoj značaj, što sugerise da uočeni pad u koncentraciji CETP verovatno nije rezultat samo narušene funkcije jetre. Umesto toga, snižene koncentracije CETP bi mogle imati nezavisan potencijal za predviđanje CRC, što bi trebalo proceniti budućim prospektivnim studijama. U skladu sa prethodnim navodima, nivo CETP je prepoznat kao marker sa mogućim dijagnostičkim potencijalom (slika 29). Pored oksidativnog stresa, koji su, kako prethodni tako i naši rezultati, kontinuirano isticali kao važno obeležje CRC, naše istraživanje daje pretpostavku da CETP kao modulator lipidne homeostaze takođe predstavlja potencijalni relevantan biomarker za rano predviđanje rizika za nastanak i rano prepoznavanje početka bolesti.

U sklopu otkrivanja novih biomarkera metaboličke homeostaze sa adekvatnom osetljivošću i specifičnošću, nastojali smo da ispitamo eventualnu povezanost IGF1 i E-kadherina sa nastankom i progresijom CRC. Dobijeni rezultati su ukazali na značajne razlike u serumskim koncentracijama IGF1 i E-kadherina između pacijenata i zdravih ispitanika (tabela 6), što ukazuje na njihovu potencijalnu korist kao biomarkera CRC. Prekomerna ekspresija IGF1 je ranije prepoznata kao faktor rizika za razvoj CRC, ali je već nekoliko studija ukazalo na postojanje sniženih koncentracija IGF1 kod ovih pacijenata [106, 107]. Mi smo takođe uočili niže nivoe IGF1 kod ispitanika sa CRC u poređenju sa kontrolnom grupom (tabela 6). Važno je napomenuti da na razlike u nivoima IGF1 između grupa nije uticala neusklađenost u godinama, jer su pacijenti konzistentno imali niže koncentracije IGF1 u odnosu na zdrave ispitanike u podgrupama istog uzrasta (tabela 7, slika 30). Smanjenje koncentracije IGF1 najverovatnije predstavlja posledicu nehranjenosti i kaheksije. Poznato je da oko 50% pacijenata sa rakom debelog creva razvije kaheksiju [213]. Iako u ovoj studiji nismo procenjivali stepen kaheksije, činjenica je da 43,5% naših pacijenata imalo ITM < 25 kg/m², dok je 14,5% pacijenata imalo ITM < 20 kg/m². Budući da je ITM jedan od markera kaheksičnog stanja, dobijeni rezultati ukazuju na povećanu prevalencu ovog stanja u CRC. Poznato je da je kaheksija praćena narušenom funkcijom jetre [214]. Laboratorijski rezultati naših pacijenata su ukazali na sniženu sintetsku funkciju u više od polovine ispitanika sa CRC (tabela 1). S

obzirom da se IGF1 pretežno sintetiše u jetri, za očekivati je da bi narušena funkcija jetre mogla dovesti do nižih koncentracija IGF1. U prilog tome govore i analize koje su ukazale na postepeni pad koncentracija IGF1 kroz stadijume CRC (tabela 8). Jasno je da je napredovanje bolesti praćeno intenzivnim pogoršanjem funkcionalnih svojstava jetre, posebno u poodmakloj fazi kada su u ovom organu već prisutni sekundarni depoziti. Shodno dobijenim rezultatima, sniženje vrednosti IGF1 kroz faze CRC može biti odraz pomenutih procesa. Značajne razlike između nivoa IGF1 su postojale između pacijenata sa stadijumom B1 i ispitanika sa metastatskom bolešću, što sugerise moguću upotrebu ovog parametra kao markera progresije karcinoma, a što bi trebalo potvrditi daljim studijama. Sa druge strane, nismo uočili razlike u koncentracijama IGF1 među ispitanicima sa različitim gradusima CRC (tabela 8). Ovi rezultati mogu implicirati da varijacije u koncentraciji IGF1 prvenstveno zavise od agresivnosti i dužine trajanja bolesti, kao i od posledičnih sistemskih efekata.

Budući da je poznato da na IGF1 utiču opšte karakteristike pojedinaca, uključujući starost, pol, uhranjenost i prisustvo dijabetesa, ispitanice su razlike u nivoima IGF1 u okviru različitih kategorija pacijenata sa CRC (tabele 7 i 8). U našoj studiji je uočeno smanjenje koncentracija IGF1 paralelno sa starenjem, što predstavlja rezultat u skladu sa prethodnim istraživanjima [215, 216]. Pored toga, IGF1 je bio niži kod žena sa CRC u poređenju sa muškarcima. Istraživanje razlika u odnosu na pol je prema dostupnoj literaturi dalo nekonzistentne rezultate, s tim da je uočeno da je sniženje koncentracije IGF1 tokom starenja izraženije kod žena, najverovatnije zbog pada nivoa estrogena [215]. Kada smo upoređivali koncentraciju IGF1 u podgrupama starijih i mlađih pacijenata sa CRC u odnosu na zdrave učesnike, kao i kada je poređenje vršeno između muškaraca i žena sa karcinomom i bez njega (tabela 7), utvrdili smo da je niži nivo IGF1 konstantno bio prisutan kod pacijenata sa CRC. Takvi rezultati impliciraju postojanje intrinzičke povezanosti između CRC i IGF1, nezavisno od ostalih karakteristika ispitanika. Štaviše, u ovoj studiji koncentracije IGF1 su bile uporedive kod CRC pacijenata sa dijabetesom i bez njega (tabela 8), što bi moglo da potvrdi da CRC utiče na IGF1, bez obzira na druge pridružene bolesti.

Kod pacijenata sa CRC su takođe utvrđene povišene serumske koncentracije E-kadherina (tabela 6), što je u skladu sa studijama koje su analizirale solubilnu formu ovog markera. Naime, pokazano je da se koncentracija solubilnog fragmenta E-kadherina povećava u cirkulaciji usled tumorom posredovane proteolize intaktnog E-kadherina [115]. Naša detaljna analiza kod pacijenata sa CRC (tabela 8) je pokazala da na nivoe E-kadherina u serumu ne utiču pol, ITM ili istovremeno prisustvo dijabetesa, što implicira potencijalnu upotrebu serumskog E-kadherina kao stabilnog i pouzdanog biomarkera CRC. Pored toga, nismo pronašli razlike u koncentraciji E-kadherina u serumu u odnosu na lokalizaciju CRC, gradus ili stadijum bolesti (tabela 8). Prethodne studije su ukazale na povezanost smanjene ekspresije E-kadherina u uzorcima tkiva CRC sa starijim životnim dobom i agresivnijim oblikom bolesti [217], kao i sa lošijom prognozom [218]. Pored toga, Weiss i sar. [219] su ukazali na povišene koncentracije E-kadherina u serumu pacijenata sa višim stadijumima CRC. Međutim, nedavna studija je pokazala da nema razlike u nivoima E-kadherina u serumu pacijenata sa CRC i kontrolne grupe [220]. Rezultati iste

studije su pokazali da ne postoje razlike u koncentraciji E-kadherina u odnosu na gradus i stadijum CRC. No, važno je napomenuti da su analize u većini navedenih istraživanja rađene na relativno malom uzorku, tako da je dobijene rezultate potrebno potvrditi u većoj populaciji ispitanika.

Dodatno je procenjen prognostički potencijal IGF1 i E-kadherina. Dobijeni podaci su korigovani za starost, pol i ITM ispitanika, ali su i u takvim modelima niže koncentracije IGF1 i više koncentracije E-kadherina ostale nezavisno povezane sa rizikom za razvoj CRC (tabela 9). Ovi preliminarni rezultati bi mogli predstavljati temelj budućim studijama za sveobuhvatno istraživanje prediktivnog potencijala obećavajućih biomarkera poput IGF1 i E-kadherina. Ipak, u svetlu svih dobijenih rezultata (tabela 8), mogli bismo zaključiti da IGF1 predstavlja pouzdaniji prediktor uznapredovale forme CRC, dok se u slučaju E-kadherina prediktivni i dijagnostički kapaciteti mogu razmatrati u odnosu na samo prisustvo CRC, pre nego u sklopu predviđanja gradusa ili stadijuma bolesti. Naši rezultati takođe impliciraju da bi E-kadherin mogao biti koristan za ranu dijagnozu CRC, ali bi ovu hipotezu trebalo potvrditi većim studijama koje bi obuhvatile pre svega pacijente u ranoj fazi bolesti.

U sklopu detaljnijeg ispitivanja IGF1 ose, izvršena je i genotipizacija ispitanika za SNP *IGF1* rs2946834. Prethodni podaci su ukazali na povezanost ovog polimorfizma kako sa promenama koncentracije IGF1 [108], tako i sa lošijom stopom preživljavanja u CRC [221], ali i u HER2-pozitivnom karcinomu dojki [222]. Pretragom literature je uočeno više studija koje su istraživale vezu ovog polimorfizma sa razvojem maligniteta specifičnih za ženski pol [223-225], dok su studije u CRC bile retke. Razlike u distribuciji genotipova između kontrola i pacijenata nije bilo ($p=0,966$), te veza sa CRC u našoj studiji nije uočena. Dodatno, zasebna analiza u genotipskim podgrupama zdravih ispitanika i pacijenata nije ukazala na povezanost prisustva rizičnog alela sa promenama parametara lipidne homeostaze, niti sa koncentracijom IGF1 (tabela 11).

Na kraju, preliminarno smo procenili dijagnostičku tačnost IGF1 i E-kadherina. Nedavna studija [106] je analizirala dijagnostičku tačnost IGF1 i dobijeni rezultati za AUC su bili slični našim (tabela 10), ukazujući da bi IGF1 mogao predstavljati koristan marker za dijagnozu CRC. Ipak, definisane granične vrednosti su se značajno razlikovale (154 ng/mL vs 77,386 ng/mL u našoj studiji). Takva razlika bi mogla nastati kao posledica činjenice da su ispitanici u našoj studiji bili znatno stariji (već je diskutovano da starost značajno utiče na nivo IGF1). Ovi podaci sugerišu da granične vrednosti za dijagnostičku upotrebu IGF1 u CRC treba definisati u odnosu na starost pacijenata. Takođe je značajno istaći da razlike u prehranbenim i drugim životnim navikama između dve analizirane populacije mogu doprineti uočenim odstupanjima.

Treba svakako istaći rezultate naše studije koji su se odnosili na dijagnostičku tačnost E-kadherina, koji su ukazali na obećavajuća svojstva ovog glikoproteina kao biomarkera CRC (tabela 10), s obzirom da su specifičnost i osetljivost za definisanu graničnu vrednost premašili 90%. Iako su diskriminativne sposobnosti E-kadherina do sada istražene u nekoliko patoloških stanja, nedostaju podaci o dijagnostičkoj upotrebi cirkulišućeg E-kadherina u CRC. Naši rezultati sugerišu da bi solubilni E-

kadherin mogao biti izuzetno koristan kao biomarker CRC. Bitno je i napomenuti da vrednost AUC dobijena u slučaju kombinovanog određivanja IGF1 i E-kadherina nije bila značajno poboljšana u poređenju sa dijagnostičkom tačnošću pojedinačnog određivanja E-kadherina. Imajući u vidu prethodno pomenuta ograničenja IGF1 u predviđanju i dijagnozi CRC, kao i troškove višestrukih analiza, naši rezultati sugerišu da bi E-kadherin mogao biti superiorniji od IGF1 kao biomarker CRC.

Uprkos dosadašnjim naporima, metaboličke promene, ali i promene u imunom i inflamatornom okruženju u malignim bolestima još uvek nisu dovoljno razjašnjene. Analizom dostupnih bioinformatičkih baza podataka, uz paralelno izvođenje opservacione studije, smo ukazali na povezanost energetskog metabolizma i imunog odgovora, koristeći adiponektin i adiponektinske receptore kao integrativne biomarkere. Takva analiza strukturno i funkcionalno povezanih markera može postaviti temelje za razvoj novih PCR multipleks modela. Ovakva vrsta višestrukih modela bi idealno trebalo da uključuje lako dostupne biomarkere. Naime, otkriće pouzdanih neinvazivnih biomarkera u krvi, poput genetskih, bi povećalo odaziv pacijenata programima skrininga, koji je trenutno relativno nizak usled invazivnosti dostupnih skrining i dijagnostičkih alata. Da bismo se pridržavali ovog važnog principa savremene dijagnostike, koristili smo PBMC kao izvor genetskog materijala. Kako karcinom nije izolovan patološki proces, istraživanje je vršeno pod pretpostavkom da je malignitet uticao i na imune ćelije, te da PBMC koje obuhvataju većinu urođenih i adaptivnih efektoru imunog odgovora, zapravo predstavljaju pouzdan biološki materijal.

Niži nivoi iRNK Adipor1 su uočeni u PBMC pacijenata sa karcinomom u poređenju sa kontrolnom grupom, dok su slični nivoi ekspresije Adipor2 bili prisutni u ispitivanim grupama (tabela 12). Naše istraživanje je ukazalo na ovaj interesantan obrazac ekspresije gena za adiponektinske receptore. Studija Van Stijn i sar. je implicirala da sam adiponektin može povećati nivo iRNK svojih receptora u THP-1 monocitima, sa većim uticajem na ekspresiju Adipor2 nego Adipor1 [226]. Imajući u vidu prethodno uočene promene nivoa adiponektina kod pacijenata sa CRC [227, 228], naši rezultati mogu odražavati upravo učešće adiponektina u uočenoj neravnoteži genske ekspresije njegovih receptora. Takođe je primećeno da snižena regulacija signalnih puteva jetrenih x receptora (*liver x receptor, LXR*) i PPAR γ u M1 makrofagama dovodi do smanjenja nivoa oba receptora, što sugeriše da polarizacija makrofaga menja ekspresiju receptora i posledično, adiponektinom posredovan inflamatorni odgovor [226]. Dalamaga i sar. su sugerisali da se obavezno prisustvo oba receptora može očekivati u različitim tkivima, ali da obično jedna forma prevladava [128]. Naša *in silico* analiza GSE44076 baze je takođe pokazala raznolikost u genskoj ekspresiji adiponektinskih receptora. Naime, kada je susedna zdrava mukoza upoređena sa maligno transformisanom, u tumorskom tkivu je uočeno smanjenje nivoa iRNK Adipor2, uz povećane nivoe Adipor1 (slika 31d, 31b). Štaviše, kada se upoređivanje izvršilo između tkiva zdravih ispitanika i CRC, ponovo su zapaženi redukovani nivoi iRNK Adipor2 u tumoru, dok se ekspresija Adipor1 gena nije značajno razlikovala (slika 31c, 31a). Analogno sa našim rezultatima u PBMC (tabela 12), kada je tumor-susedna mukoza upoređena sa potpuno zdravim tkivom, dobijeni su

niži nivoi iRNK Adipor1 u susednoj mukozi, dok se nivoi iRNK Adipor2 nisu razlikovali (slika 31a, 31c).

Nadalje, naši eksperimentalni rezultati su bili u skladu sa prethodnim studijama koje su ukazale na smanjene nivoa ekspresije Adipor1 kod pacijenata sa uznapredovalim CRC, pogotovo sa metastazama na limfnim čvorovima [228]. Naime, većina naših pacijenata (44%) je bila u uznapredovalom stadijumu bolesti, prema Astler-Coller sistemu klasifikacije. Hioshi i sar. su postavili zanimljivu hipotezu po kojoj nishodna regulacija adiponektinskih receptora predstavlja zapravo mehanizam koji maligne ćelije koriste da bi se suprotstavile antineoplastičnim efektima adiponektina [229]. Takođe, imajući u vidu da je ushodno regulisana ekspresija Adipor1 u makrofagama transgenih miševa bila povezana sa nižim nivoima proinflamatornih citokina, možemo da pretpostavimo da bi sniženi nivoi genske ekspresije Adipor1 u PBMC naših pacijenata sa CRC mogli rezultirati pojačanom izloženošću produženom inflamatornom stanju [230]. Na osnovu prethodno rečenog, procena ekspresije u PBMC bi mogla postati deo inovativnih PCR multipleks panela za dijagnostiku i praćenje CRC, kao i monitoring efekata imunomodulatorne terapije.

Studije na životinjama su već pokazale veći značaj zaštitnih efekata adiponektina posredovanih preko Adipor1 u poređenju sa onima koji se dešavaju kroz signalnu kaskadu Adipor2 [231]. Naši GSEA rezultati za bazu podataka GSE44076 su implicirali da je Adipor2 metabolički aktivniji receptor u malignom tkivu, jer su skupovi gena koji su se odnosili na metaboličke puteve bili povezani sa genskom ekspresijom Adipor2, ali ne i sa nivoima iRNK Adipor1 (tabela 19). Ipak, nivoi genske ekspresije Adipor1 su pokazali negativnu korelaciju sa skupovima gena koji su se odnosili na puteve važne za progresiju tumora, kao što su signalni put TNF- α NF κ B i MTORC, podržavajući tako hipotezu o zaštitnoj ulozi Adipor1 u CRC (tabela 19) [232, 233]. Pored toga, negativna korelacija dobijena između nivoa iRNK Adipor1 i miogeneze i EMT u zdravoj susednoj mukozi je još jednom naglasila značaj Adipor1 kao medijatora antineoplastičnih efekata adiponektina (tabela 19) [234]. Sveukupno, naši *in silico* i eksperimentalni rezultati ukazuju na mogući nedostatak zaštitnih efekata adiponektina kod pacijenata sa CRC. Iako analiza druge baze podataka (GSE47756) nije pokazala razliku u nivoima iRNK Adipor1 u PBM pacijenata sa CRC, GSEA je pokazala da je ovaj receptor metabolički aktivan, s obzirom da su nivoi njegove geneske ekspresije pozitivno korelirali sa skupovima gena koji su se odnosili na metaboličke puteve i TNF- α NF- κ B signalnu kaskadu (tabela 20). Ova iznenađujuće pozitivna relacija između Adipor1 i TNF- α je takođe demonstrirana u našem istraživanju, ali samo u PBMC zdravih ispitanika (tabela 13). Iako su podaci iz literature ukazali na uticaj TNF- α na nivoe iRNK Adipor1 [235, 236], mi nismo pronašli takvu vezu kod naših pacijenata (tabela 13). Dodatno, dobijeni rezultati u GSE47756 bazi podataka su se isključivo zasnivali na populaciji monocita, te treba pretpostaviti da bi i druge subpopulacije, kao što su CD4 i CD8, B limfociti i NK ćelije, takođe trebalo uzeti u obzir pre donošenja bilo kakvih konačnih zaključaka u vezi sa procenom odnosa između Adipor1 i TNF- α , kao i njihovih genskih ekspresija. Brojni dokazi podržavaju imunomodulatorne efekte adiponektina ostvarene

i preko ovih subpopulacija ćelija [139, 141, 237]. Stoga bi PBMC trebalo razmotriti za buduća istraživanja u ovoj oblasti.

Niži nivoi iRNK TNF- α su uočeni u PBMC kod pacijenata sa CRC u našem istraživanju (tabela 12). Razlike u nivoima iRNK TNF- α su takođe uočene i prilikom analize GSE44076 baze podataka, i to između maligno transformisanog tkiva i zdrave mukoze u kontrolnoj grupi, kao i između zdrave mukoze i mukoze koja je susedna tumoru (slika 31e). Iako su neki od autora ukazali na vezu između veće stope preživljavanja od CRC i ushodno regulisane ekspresije TNF- α u tumor-infiltrirajućim limfocitima, drugi su povišene nivoe genske ekspresije TNF- α u uzorcima malignog tkiva povezivali sa uznapredovalim stadijumima CRC [238, 239]. Treba napomenuti i da su Ganapathi i sar. pokazali da se niža ekspresija TNF- α u PBMC kod pacijenata sa CRC može javiti i usled mikrosatelitske nestabilnosti [240].

Pored svega navedenog, naše istraživanje je sugerisalo i povezanost polimorfizma *ADIPOQ* rs266729 i nivoa genske ekspresije TNF- α kod pacijenata sa CRC (tabela 14). Ovaj SNP je prethodno bio povezan sa nižim rizikom za razvoj CRC [143]. U našoj studiji uočili smo niži nivo genske ekspresije TNF- α kod pacijenata sa CRC sa CG+GG genotipom ovog polimorfizma (tabela 14). Slična povezanost nije uočena u kontrolnoj grupi. Sprovedenjem višestruke linearne regresione analize smo uvideli da polimorfizam *ADIPOQ* rs266729 zajedno sa ITM objašnjava 9,9% varijacija u nivoima genske ekspresije TNF- α (tabela 18). Divella i sar. su pokazali da pacijenti sa *ADIPOQ* rs266729 CG i GG genotipom imaju više koncentracije TNF- α i niže koncentracije adiponektina u cirkulaciji [146]. Ovi rezultati potvrđuju efekte polimorfizma *ADIPOQ* rs266729 na imuni sistem, ostvarene kako kroz promene koncentracije, tako i kroz nivoe genske ekspresije TNF- α .

S obzirom na njegovu poziciju u 3' netranslatornom regionu gena *ADIPOR1*, GG genotip trećeg ispitivanog polimorfizma u ovoj studiji, *ADIPOR1* rs7539542, je povezan sa redukcijom od 30-40% u nivoima genske ekspresije *Adipor1* u PBMC [241]. Ipak, u našem istraživanju nismo utvrdili takav tip funkcionalne zavisnosti (tabela 15). Umesto toga, naša grupa pacijenata koji su nosioci G alela (genotipovi CG i GG) je imala niže koncentracije UH, LDL-h i HDL-h u poređenju sa pacijentima sa CC genotipom (tabela 15). Povezanost ovog SNP sa lipidnim parametrima je bila evidentna i kod zdravih ispitanika, s obzirom da su viši nivoi TG primećeni kod nosilaca rizičnog alela (CG i GG genotip) (tabela 15). Da bismo potvrdili nezavisan uticaj SNP rs7539542 na promene u koncentraciji UH i LDL-h, koristili smo višestruku linearnu regresionu analizu. Model koji je uključivao ispitivani SNP i koncentraciju TG je objašnjavao 16,4% varijacija u koncentraciji LDL-h i 26,8% varijacija u koncentracijama UH (tabela 18). *Diabetes Heart Study* je već ukazala na povezanost *ADIPOR1* SNP rs7539542 i nivoa UH, ali u subkliničkim kardiovaskularnim bolestima, dok je ova veza retko ispitivana u malignim bolestima [242]. Osim toga, naša korelaciona analiza (tabela 13) je ukazala na negativnu relaciju između koncentracija HDL-h i nivoa ekspresije *Adipor1*. Ipak, iako naši preliminarni rezultati impliciraju povezanost polimorfizma *ADIPOR1* rs7539542 i markera lipidnog statusa, ove zaključke je potrebno proveriti u velikim prospektivnim studijama. Pored toga, kvalitet panela biomarkera se ogleda

i u njihovoj sposobnosti da otkriju nasledne predispozicije za razvoj bolesti, stoga polimorfizme *ADIPOQ* i *ADIPOR1* takođe treba razmotriti i u sklopu budućih multimarkerskih testova.

U narednom koraku je izvedena i genotipizacija ispitanika za SNP *TNF- α* rs1800629. Razlike u distribuciji genotipova između zdravih ispitanika i pacijenata sa CRC nije bilo ($p=0,614$). Frekvencija pojavljivanja AA genotipa je ukazala na nisku zastupljenost rizičnog homozigota u uzorku srpske populacije. Ovakvi rezultati su bili u skladu sa meta analizom koja je potvrdila vezu ovog polimorfizma i niskog rizika za razvoj CRC, ali u azijskoj populaciji, dok kod belaca ova relacija nije postojala [159]. S druge strane, studija na malezijskoj populaciji je ukazala na povezanost SNP *TNF- α* rs 1800629 i povišenog rizika za razvoj CRC [243]. Pokazano je i da mutacija u rs1800629 lokusu ne povećava samo rizik za pojavu inflamatornih bolesti creva, već i rizik za razvoj CRC sa osnovom u inflamatornim bolestima [244]. Zapravo, smatra se da je jedan od mogućih razloga postojanja povezanosti između SNP rs1800629 i rizika za nastanak CRC, interakcija ovog polimorfizma sa ostalim varijantama gena sa kojima se ovaj SNP nalazi u LD [245].

U ovom istraživanju je prvi put ispitivan odnos između plazmatskih koncentracija rezistina, nivoa genske ekspresije rezistina i nivoa CAP-1 u PBMC pacijenata sa CRC. Naši rezultati su pokazali više koncentracije rezistina u plazmi, praćene nižim nivoima genske ekspresije ovog biomolekula kod pacijenata sa karcinomom u poređenju sa zdravim osobama (tabela 21). Pored toga, viša ekspresija CAP-1 je uočena kod pacijenata. Nedavno je studija izvedena na monocitima sugerisala da je CAP-1 receptor za humani rezistin [173], ali je ograničen broj studija istraživao interakcije rezistina i CAP-1 u malignim bolestima. Suprotno tome, efekti koji su posredovani interakcijom rezistina i TLR4 su bili predmet opsežnih istraživanja. Wang i sar. su pokazali da interakcija rezistin-TLR4 u ćelijskim linijama karcinoma deluje na promociju razvoja karcinoma dojke [246]. Takođe je sugerisano da u ćelijama karcinoma želuca rezistin stimuliše angiogenezu kroz efekte posredovane sa TLR4 [247]. Međutim, imunohistohemijsko bojenje za CAP-1 je bilo pozitivno u preko 50% uzoraka tkiva pacijenata sa CRC [248], što implicira da bi interakcija CAP-1-rezistin mogla igrati važnu ulogu u razvoju ove bolesti. Već je pokazano da se prekomerna genska ekspresija CAP-1 u tkivu vezuje za nižu stopu preživljavanja u slučaju karcinoma dojke i karcinoma jajnika [249]. Kao protein koji veže aktin [250], CAP-1 se smatra faktorom značajnim za podsticanje metastaza, kao i medijatorom invazivnosti karcinoma [248, 249]. Naše istraživanje je pokazalo da je genska ekspresija CAP-1 ushodno regulisana kod pacijenata sa CRC u odnosu na kontrolu (tabela 21). Istovremeno povišene koncentracije rezistina u plazmi (tabela 21) mogu da ukažu na značajnu interakciju rezistin-CAP-1 u CRC, što je potrebno dalje istražiti. Na osnovu ovih preliminarnih rezultata, možemo postaviti hipotezu o postojanju karakterističnog obrasca interakcije rezistin-CAP-1, koji se razlikuje od dobro poznate interakcije rezistin-TLR4, a koja može biti od potencijalnog interesa, bilo kao biomarker ili kao potencijalni terapijski cilj. Studije su već dokazale da interakcija rezistina sa CAP-1 u monocitima dovodi do povećane proizvodnje pro-inflamatornih citokina [173]. Budući da ovi citokini pojačavaju gensku ekspresiju rezistina u PBMC [251], nastala pozitivna povratna sprega dalje promovise inflamatorno okruženje neophodno za inicijaciju i progresiju CRC.

Iako je proinflammatorna uloga rezistina posebno naglašena u brojnim studijama, njegova negativna korelacija sa HDL-h je takođe primećena u različitim patološkim stanjima, uključujući CRC [252]. Ova korelacija je izdvojena kao značajna i kod naših pacijenata (tabela 22; slika 33a). Već je predložen mehanizam putem kojeg HDL može inhibirati proizvodnju rezistina. Naime, u mišjim 3T3L1 adipocitima je pokazano da HDL čestice interaguju sa oksidovanim LDL, umanjujući na taj način akumulaciju slobodnog holesterola i stres endoplazmatskog retikuluma, što posledično dovodi do smanjenog lučenja adipocitokina [253]. Iako značajna razlika između humanog i mišijeg rezistina sprečava donošenje apsolutnih zaključaka, ovi rezultati sugerišu da bi porast u koncentraciji cirkulišućeg rezistina u ljudi mogao nastati kao posledica smanjenih nivoa HDL-h i oštećene funkcionalnosti HDL čestica. Studija Stevanović i sar. je pokazala da distribuciju HDL čestica kod pacijenata sa CRC karakteriše manji dijametar i povećani udeo manjih HDL3b čestica, što implicira narušenu funkcionalnost HDL [254]. Uočena je i promena u aktivnosti PON-1 kroz tercile HDL-h (slika 33b). Pošto je enzim PON-1, povezan sa HDL, odgovoran za razgradnju oksidovanih lipida u okviru LDL čestica, može se pretpostaviti da disfunkcionalne HDL čestice u CRC nisu u stanju da spreče povećanje sekrecije rezistina. S druge strane, rezistin pospešuje stvaranje proinflammatornog okruženja, što dalje može umanjiti funkcionalnost HDL čestica [255], doprinoseći na taj način pogoršanju početnog patološkog procesa. Nedavno su Lu i Zhan ukazali na značaj multimarkerskog modela za razumevanje etiopatogeneze malignih bolesti [45], a naši rezultati uporednog određivanja nivoa rezistina, HDL-h i aktivnosti PON-1 u CRC potvrdilo je takvo gledište i podvuklo značaj takvog pristupa za bolje razumevanje, a time i efikasno predviđanje i prevenciju razvoja CRC.

Iako su makrofage glavni izvor rezistina u plazmi kod ljudi, PBMC, odnosno monociti i limfociti, takođe proizvode rezistin i na taj način doprinose njegovoj ukupnoj koncentraciji [256]. Međutim, određivanje nivoa genske ekspresije rezistina u PBMC u našoj studiji je dalo neočekivane rezultate. Za razliku od viših koncentracija rezistina u plazmi, uočili smo niže nivoe genske ekspresije rezistina kod pacijenata sa CRC (tabela 21). Mogući razlog za takvu neusklađenost bi se mogao naći u različitoj produkciji rezistina u PBMC i u malignom tkivu. Pretpostavlja se da bi se povećana sekrecija rezistina u CRC pre mogla pripisati tumor-infiltrirajućim makrofagama, nego samim malignim ćelijama [257]. Pored toga, nedavna studija na ženama sa karcinomom dojke je pokazala da koncentracije serumskog rezistina nisu u korelaciji sa ekspresijom njegovog gena u malignom tkivu [258]. Za razliku od ustaljenog mišljenja prema kojem makrofage potiču isključivo iz monocita, pokazano je da su preteče tkivnih makrofaga, zapravo ćelije progenitori iz žumančane kese i fetalne jetre [259]. Sa druge strane, makrofage nastale iz monocita postaju brojne u tkivima tokom inflamatornog odgovora [259]. Imajući u vidu da je hronična upala povezana sa CRC [260], može se pretpostaviti da uočeni viši nivoi rezistina u plazmi naših pacijenata nastaju kao posledica njegove povećane produkcije u brojnim makrofagama koje invadiraju tumorsko tkivo. Dodatno, kod pacijenata sa CRC smo uočili i granično značajnu pozitivnu korelaciju genske ekspresije sa plazmatskim koncentracijama rezistina (tabela 22). Pored toga smo primetili i porast genske ekspresije kroz tercile serumske koncentracije rezistina (slika 32). Ukupno uzevši, možemo pretpostaviti da PBMC svakako doprinose nivou cirkulišućeg rezistina, ali verovatno

nisu jedini i najznačajniji izvor ovog proteina u CRC. Navedeni rezultati upućuju na zaključak da se nesklad između koncentracija rezistina u plazmi i nivoa genske ekspresije može koristiti kao potencijalni indikator razvoja CRC. Stoga je izračunat i analiziran odnos koncentracije rezistina/iRNK rezistina. Dobijeni rezultati značajno viših vrednosti odnosa zabeleženi su kod pacijenata sa CRC u odnosu na kontrolnu grupu (tabela 21). Štaviše, ovaj odnos je pokazao značajnu diskriminativnu sposobnost za CRC (tabela 25), što je potvrda moguće primene ovog odnosa kao biomarkera CRC. Takva otkrića mogu imati važne posledice za potencijalnu upotrebu rezistina u dijagnozi i prognozi CRC. Dakle, metode molekularne biologije i genetski testovi mogu dopuniti i poboljšati tradicionalno određivanje koncentracije proteina, što predstavlja temelj moderne biohemijske dijagnostike [261]. Pored toga, ovaj odnos se lako može odrediti u uzorcima dobijenim jednostavnim venepunkcijom, što može predstavljati značajnu prednost za potencijalnu kliničku primenu. Ipak, naše rezultate bi trebalo dalje testirati i vrednovati u osnovnim i kliničkim studijama.

Uprkos još uvek nerešenim pitanjima u vezi sa tačnom ulogom rezistina u kolorektalnoj karcinogenezi, u velikom broju studija su zabeležene visoke koncentracije rezistina u CRC [174]. Utvrđena je i povezanost između stadijuma tumora i koncentracije rezistina u serumu [252] i naglašena njegova moguća upotreba kao markera za razvoj CRC [262]. U svetlu ovih dokaza, ispitali smo prediktivni potencijal nivoa genske ekspresije rezistina i CAP-1, kao i plazmatskih koncentracija rezistina za razvoj CRC. Sva tri parametra pojedinačno su pokazala značajan prediktivni potencijal (tabela 23), dok je u multivarijantnoj binarnoj logističkoj regresiji rezistin ostao značajan prediktor rizika za nastanak CRC rizika (tabela 24). Iako je dobijeni OR sugerisao relativno mali doprinos rezistina porastu rizika za razvoj CRC, dobijena statistička značajnost i dalje ukazuje na nezavisni doprinos rezistina razvoju ove bolesti. Pored toga, naši preliminarni rezultati su pokazali da je klinička tačnost rezistina uporediva sa trenutno dostupnim laboratorijskim tumorskim markerima za CRC, kao što su serumski CA 19-9 i CEA [263]. Štaviše, paralelnim određivanjem plazmatske koncentracije i genske ekspresije rezistina i nekoliko drugih lako dostupnih antropometrijskih i laboratorijskih parametara (starost, ITM, LDL-h i HDL-h) ostvaruje se visoka klinička tačnost (tabela 25), čime se naglašava važnost multimarkerskog pristupa za predviđanje i dijagnozu CRC.

Prethodne studije su povezivale polimorfizam *RETN* rs1862513 (-420 C/G) sa višim koncentracijama rezistina i posledično sa pogoršanjem proinflatornog statusa kod pacijenata sa CRC i rakom dojke, a GG genotip je detektovan kao najznačajniji za ispoljavanje ovih efekata [178]. Osawa i sar. su pokazali povezanost polimorfizma *RETN* rs1862513 u promotorskom regionu gena sa pojačanom ekspresijom iRNK usled izmenjenog vezivanja transkripcionih faktora Sp1 / 3 [264]. Međutim, isti autori su predložili prisustvo drugih značajnih SNP, sa zaključkom da se moraju uzeti u obzir višestruki efekti različitih alela [265]. Dodatno, isti autori su pokazali da je metilacija u -420 regionu povezana sa nižom koncentracijom rezistina kod CC i CG genotipova [266]. U našoj trenutnoj studiji nismo uočili povezanost izmenjenih nivoa ekspresije gena rezistina i CAP-1, ili koncentracija rezistina sa polimorfizmom *RETN* rs1862513. Pored toga, nismo pronašli razlike u pogledu distribucije genotipova

između pacijenata sa CRC i zdravih osoba. Ukupno uzevši, možemo pretpostaviti da bi nedostatak povezanosti između ovog specifičnog SNP sa genskom ekspresijom i proteinskom koncentracijom rezistina kod naših pacijenata sa CRC mogao biti posledica drugih genetskih ili epigenetskih efekata koji prevazilaze samo jednu genetsku izmenu, a što ponovo ističe važnost sveobuhvatnijeg pristupa genetskim analizama.

Na kraju ovog istraživanja proverene su i interakcije gena, odnosno interakcije gena i faktora spoljašnje sredine korišćenjem MDR softverske analize. Polimorfizmi *ADIPOR1* rs1342387, *ADIPOQ* rs266729 i *RETN* rs1862513 su pokazali značajne uzajamne sinergističke efekte i to u kombinacijama *ADIPOR1* rs1342387- *RETN* rs 1862513 i *ADIPOR1* rs1342387- *ADIPOQ* rs266729 (slika 34, slika 35). Treba napomenuti da se polimorfizam *ADIPOR1* rs1342387 nalazio u LD sa *ADIPOR1* rs753954 (tabela 27), te nije bilo moguće ispitivati povezanost njegovih genotipova sa lipidnim faktorima rizika za razvoj CRC, ili sa parametrima adiponektinske ose (tabela 15). Ipak, ovaj polimorfizam je više studija izdvojilo kao značajan za razvoj CRC [267]. Naime, meta analiza je pokazala da se CT i TT kombinacija genotipa povezuje sa redukcijom rizika za razvoj CRC u poređenju sa CC homozigotima za SNP *ADIPOR1* rs1342387 [147], odnosno da je rizik za razvoj karcinoma niži kod nosilaca T alela, u poređenju sa CC genotipom [268]. Inače, poznato je da se ovaj polimorfizam nalazi u intronu 4 (+5843 C > T) *ADIPOR1* gena, odnosno u lokusu vezanom za proporcije tela, poput visine, težine, obima kuka, struka i ITM [147], te ovaj polimorfizam može biti od posebnog interesa kada se radi o interakciji genskih činilaca i faktora spoljašnje sredine u CRC.

Rezultati brojnih studija su pokazali suprotstavljene zaključke koji se odnose na povezanost specifičnih genskih polimorfizama sa odgovarajućim oboljenjima u različitim populacijama, što se može pripisati genetskoj heterogenosti u etničkim grupama, ograničenjima u pogledu veličine uzoraka i razlikama u primenjenim metodološkim pristupima [243]. Drugi razlog može biti pleiotropna uloga datog polimorfizma u patogenezi bolesti, odnosno njegova interakcija sa ostalim genima ili faktorima životne sredine. Takođe, objašnjenje treba tražiti i u obrascima LD, s obzirom da ispitivani gen može biti u LD sa drugom genskom varijantom od značaja za nastanak bolesti u jednoj etničkoj populaciji, ali ne obavezno i u svim ostalim populacijama [243]. Međutim, značajno je istaći da, interakcijom sa faktorima životne sredine, genetske varijante u različitom stepenu mogu da modifikuju rizik za pojavu bolesti. Za razliku od monogenskih bolesti, u patofiziološkim stanjima sa složenom etiološkom osnovom, kao što je CRC, mora se uzeti u obzir način na koji povezanost između samih gena, ali i veza gena sa faktorima sredine deluju na predispoziciju pojedinca za razvijanje bolesti [269]. U te svrhe se koriste interakcioni grafici (slika 34, slika 35), koji su u našem istraživanju pored ranije spomenutih gensko-genskih interakcija, ukazali i na značaj interakcije polimorfizama *ADIPOR1* i *RETN* sa konzumacijom alkohola u CRC, te polimorfizma *RETN* i pušenja. Dodatno, veza između *ADIPOR1* i pušačkog statusa je bila nekonzistentna između dva interakciona grafika, s tim da je prvi ukazao na nezavisan odnos, a drugi na slab sinergizam. S druge strane, konzistentna redundantnost je postojala između SNP *ADIPOR1* i fizičke aktivnosti. Na taj način, iako sami genski polimorfizmi u našoj studiji nisu bili značajni činioci rizika za

razvoj CRC, njihove međusobne interakcije, kao i interakcije sa faktorima spoljašnje sredine jesu. Pretraživanjem literature, uočili smo da su ovakvi podaci retki i to ne samo u CRC, već i u ostalim bolestima, te bi generalno bilo poželjno ispitivanju polimorfizama adipocitokina pridodati i ovu dimenziju, s obzirom da ona predstavlja još jedan od vidova multifaktorske analize.

Iz prikazanih rezultata, zaključujemo da bi lako dostupni uzorci biološkog materijala kao što su serum, plazma i PBMC mogli biti izvor integrisanih panela biomarkera povezanih sa CRC, sa značajnim prediktivnim sposobnostima i zadovoljavajućom kliničkom tačnošću. Minimalno zahtevan i relativno komforan postupak uzorkovanja biološkog materijala bi tako mogao da obezbedi multimarkersku strategiju, koja je obeležje preventivne, prediktivne i personalizovane medicinske prakse. Pored toga, naši rezultati impliciraju da bi određivanje koncentracija proteina trebalo dopuniti molekularnom detekcijom, kako bi se dobio uvid u moguće izmene genetskog koda, regulaciju ekspresije gena, posttranskripcione i posttranslacione modifikacije, kao i interakciju proteina sa receptorima. Svi ovi činioci mogu biti od značaja za razvoj CRC, pa bi sveobuhvatan analitički pristup značajno unapredio postojeću dijagnostičku praksu, a time i prevenciju i tretman bolesti.

6. Zaključci

- ❖ Naši rezultati su ukazali na snižene koncentracije UH, LDL-h, HDL-h kod pacijenata sa CRC. Povišena aktivnost i snižena masena koncentracija CETP, kao i redukovana aktivnost LCAT su uočeni u istoj grupi ispitanika, paralelno sa povišenim nivoom oksidativnog stresa i redukovanom paraoksonaznom i arilesteraznom aktivnošću antioksidativnog enzima PON-1, što sve zajedno upućuje na umanjeni funkcionalni kapacitet HDL čestica.
- ❖ Rezultati opservacionog dela istraživanja su ukazali na sniženu ekspresiju gena Adipor1, rezistina, TNF- α , nepromenjene nivoe ekspresije Adipor2 i ushodno regulisane nivoe ekspresije CAP-1 u PBMC pacijenata sa CRC.
- ❖ *In silico* analiza GSE44076 baze podataka je pokazala da je genska ekspresija Adipor1 u tumoru nepromenjena u poređenju sa zdravim tkivom, dok je nishodna regulacija genske ekspresije Adipor1 zabeležena u susednoj mukozi. Suprotno tome, nivoi genske ekspresije Adipor2 u mukozi susednoj tumoru su bili ekvivalentni nivoima u zdravim ćelijama, a viši nego u malignom tkivu. Pored toga, rezultati *in silico* analize su ukazali na snižene nivoe iRNK TNF- α u susednoj mukozi i u samom malignom tkivu u poređenju sa zdravim tkivom.
- ❖ GSEA analiza je ukazala na moguću značajnu ulogu Adipor2 u metaboličkim promenama u malignom tkivu, kao i na potencijalnu zaštitnu funkciju Adipor1 u toku progresije tumora. U analizi GSE44756 baze podataka, Adipor1 se izdvojio kao metabolički aktivan receptor u monocitima, dok je istovremeno bio u pozitivnoj korelaciji i sa skupom gena vezanih za TNF- α NF-kB signalnu kaskadu.
- ❖ Snižene koncentracije IGF1 zajedno sa povišenim koncentracijama E-kadherina i rezistina su uočene kod pacijenata sa CRC.
- ❖ U grupi pacijenata sa CRC značajne pozitivne korelacije su uočene između iRNK za TNF- α i koncentracije HDL-h, nivoa iRNK CAP-1 i vrednosti ITM. Negativne korelacije su postojale između koncentracije HDL-h i nivoa genske ekspresije Adipor1, kao i između koncentracija HDL-h i rezistina. Dobijene korelacije ukazuju na specifične obrasce povezanosti između parametara metaboličke kontrole i inflamacije.
- ❖ Analiza polimorfizama pojedinačnih nukleotida za *ADIPOQ* (rs266729), *RETN* (rs1862513), *ADIPOR1* (rs7539542, rs1342387), *TNF- α* (rs1800629) i *IGF-1* (rs2946834) nije ukazala na postojanje razlika u frekvenci genotipova između ispitanika sa CRC i zdravih osoba.
- ❖ Povezanost polimorfizama ciljnih gena sa odgovarajućim proteinima, odnosno nivoima ekspresije gena nije uočena ni u CRC ni u kontrolnoj grupi. Nasuprot tome, snižene koncentracije UH, LDL-h i HDL-h su postojale kod nosilaca G alela polimorfizma *ADIPOR1* rs7539542 u grupi pacijenata sa CRC.

- ❖ Nije bilo razlika ni u jednom od ispitivanih biomarkera u odnosu na stadijum i gradus CRC, sa izuzetkom IGF1. Rezultati su ukazali na sniženje koncentracije ovog analita kroz stadijume bolesti, sa značajnom razlikom dostignutom između stadijuma B1 i D.
- ❖ Aktivnost i masena koncentracija CETP, koncentracija HDL-h, nivoi PAB, arilesterazna aktivnost PON-1, koncentracija IGF1, E-kadherina, rezistina, kao i genska ekspresija CAP-1 i rezistin su identifikovani kao nezavisni prediktori razvoja CRC
- ❖ Multimarkerski pristup izdvojio je sledeće modele kao značajne u predikciji nastanka CRC: aktivnost CETP sa uzrastom, polom i koncentracijama LDL-h, HDL-h i TG; masena koncentracija CETP u kombinaciji sa uzrastom, polom i koncentracijama prethodno navedenih lipidnih markera, ali i u kombinaciji sa PAB i arilesteraznom aktivnošću PON-1; koncentracije IGF1 i E-kadherina u kombinaciji sa uzrastom, polom i vrednostima ITM; plazmatska koncentracija rezistina u kombinaciji sa uzrastom, polom, ITM, koncentracijom HDL-h, LDL-h i nivoima ekspresije gena CAP-1.
- ❖ Odlična dijagnostička tačnost je postignuta za vrednosti PAB i koncentraciju E-kadherina, dok je veoma dobra dijagnostička tačnost uočena u slučaju masene koncentracije CETP i odnosa koncentracija rezistina/ iRNK rezistina.
- ❖ MDR analiza je ukazala na značajne sinergističke interakcije polimorfizama *ADIPOR1* rs1342387 - *RETN* rs 1862513 i *ADIPOR1* rs1342387- *ADIPOQ* rs266729, kao i na sinergizam između SNP *ADIPOR1* rs1342387 i *RETN* rs 1862513 i konzumacije alkohola, te između SNP *RETN* rs 1862513 i pušenja kod pacijenata sa CRC.
- ❖ Uočena povezanost između analiziranih parametara inflamacije, imunog odgovora, oksidativnog stresa i lipidne homeostaze, kao i dobijeni podaci o prognostičkom i dijagnostičkom potencijalu pojedinačnih markera i njihovih kombinacija upućuju na moguću korist koju bi implementacija multimarkerskih modela donela predikciji i dijagnostici CRC. U tom smislu, rezultati ovog istraživanja predstavljaju doprinos inovativnom pristupu, koji podrazumeva primenu integrativnih panela biomarkera u laboratorijskoj dijagnostici kompleksnih oboljenja, a sve u cilju razvoja i unapređenja preventivne, prediktivne i personalizovane medicinske prakse.

7. Literatura

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2021; 71:209-249.
2. Simon K. Colorectal cancer development and advances in screening. *Clinical interventions in aging*. 2016; 11:967-976.
3. Arnold M, Sierra MS, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality. *Gut*. 2017; 66:683-691.
4. Kuipers EJ, Grady WM, Lieberman D, et al. Colorectal cancer. *Nature reviews. Disease Primers*. 2015; 1:15065. DOI: 10.1038/nrdp.2015.65
5. NACIONALNI VODIČ DOBRE KLINIČKE PRAKSE ZA DIJAGNOSTIKOVANJE I LEČENJE RAKA KOLONA I REKTUMA. Republička stručna komisija za izradu i implementaciju vodiča dobre kliničke prakse Ministarstvo zdravlja Republike Srbije
6. Dostupno na: <https://www.wcrf.org/dietandcancer/colorectal-cancer-statistics/>
7. Abancens M, Bustos V, Harvey H, McBryan J, Harvey BJ. Sexual dimorphism in colon cancer. *Frontiers in Oncology*. 2020;10. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.607909>
8. Gandomani HS, Aghajani M, Mohammadian-Hafshejani A, Tarazoj AA, Pouyesh V, Salehiniya H. Colorectal cancer in the world: incidence, mortality and risk factors. *Biomedical Research and Therapy*. 2017; 4:1656-1675.
9. De Leon MP, Di Gregorio C. Pathology of colorectal cancer. *Digestive and Liver Disease*. 2001; 33:372-388.
10. Rawla P, Sunkara T, Barsouk A. Epidemiology of colorectal cancer: incidence, mortality, survival, and risk factors. *Przeglad gastroenterologiczny*. 2019; 14:89-103.
11. Salmo E, Haboubi N. Adenoma and malignant colorectal polyp: pathological considerations and clinical applications. *Gastroenterology*. 2018; 7:92-102.
12. Wu JS. Rectal cancer staging. *Clinics in colon and rectal surgery*. 2007; 20:148-157.
13. Marzouk O, Schofield J. Review of histopathological and molecular prognostic features in colorectal cancer. *Cancers*. 2011; 3:2767-2810.
14. Emile SH. Evolution and clinical relevance of different staging systems for colorectal cancer. *Minimally Invasive Surgical Oncology*. 2017; 1:43-52.
15. Migliore L, Migheli F, Spisni R, Coppedè F. Genetics, cytogenetics, and epigenetics of colorectal cancer. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 2011;2011. doi: 10.1155/2011/792362
16. Sawicki T, Ruszkowska M, Danielewicz A, Niedźwiedzka E, Arłukowicz T, Przybyłowicz KE. A Review of Colorectal Cancer in Terms of Epidemiology, Risk Factors, Development, Symptoms and Diagnosis. *Cancers*. 2021; 13:2025. <https://doi.org/10.3390/cancers13092025>
17. Win AK, MacInnis RJ, Hopper JL, Jenkins MA. Risk prediction models for colorectal cancer: a review. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*. 2012; 21:398-410.

18. Hull MA, Rees CJ, Sharp L, Koo S. A risk-stratified approach to colorectal cancer prevention and diagnosis. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*. 2020; 17:773-780.
19. Rustgi AK. The genetics of hereditary colon cancer. *Genes & development*. 2007; 21:2525-2538.
20. Geiger TM, Ricciardi R. Screening options and recommendations for colorectal cancer. *Clinics in colon and rectal surgery*. 2009; 22:209-217.
21. Centelles JJ. General aspects of colorectal cancer. *International Scholarly Research Notices*. 2012;2012. <https://doi.org/10.5402/2012/139268>
22. Jasperson KW, Tuohy TM, Neklason DW, Burt RW. Hereditary and familial colon cancer. *Gastroenterology*. 2010; 138:2044-2058.
23. Kopacova M, Tacheci I, Rejchrt S, Bures J. Peutz-Jeghers syndrome: diagnostic and therapeutic approach. *World journal of gastroenterology: WJG*. 2009; 15:5397-5408.
24. Chow E, Macrae F. A review of juvenile polyposis syndrome. *Journal of gastroenterology and hepatology*. 2005; 20:1634-1640.
25. Pino MS, Chung DC. The chromosomal instability pathway in colon cancer. *Gastroenterology*. 2010; 138:2059-2072.
26. Rao CV, Yamada HY. Genomic instability and colon carcinogenesis: from the perspective of genes. *Frontiers in oncology*. 2013; 3:130. <https://doi.org/10.3389/fonc.2013.00130>
27. Mármol I, Sánchez-de-Diego C, Pradilla Dieste A, Cerrada E, Rodriguez Yoldi MJ. Colorectal carcinoma: a general overview and future perspectives in colorectal cancer. *International journal of molecular sciences*. 2017; 18:197. [10.3390/ijms18010197](https://doi.org/10.3390/ijms18010197)
28. Cefalì M, Epistolio S, Palmarocchi MC, Frattini M, De Dosso S. Research progress on KRAS mutations in colorectal cancer. *Journal of Cancer Metastasis and Treatment*. 2021;7. <http://dx.doi.org/10.20517/2394-4722.2021.61>
29. Chung DC. The genetic basis of colorectal cancer: insights into critical pathways of tumorigenesis. *Gastroenterology*. 2000; 119:854-865.
30. Ewing I, Hurley JJ, Josephides E, Millar A. The molecular genetics of colorectal cancer. *Frontline gastroenterology*. 2014; 5:26-30.
31. Hahn MM, De Voer RM, Hoogerbrugge N, Ligtenberg MJ, Kuiper RP, van Kessel AG. The genetic heterogeneity of colorectal cancer predisposition-guidelines for gene discovery. *Cellular Oncology*. 2016; 39:491-510.
32. Law PJ, Timofeeva M, Fernandez-Rozadilla C, Broderick P, Studd J, Fernandez-Tajes J, Farrington S, Svinti V, Palles C, Orlando G, Sud A. Association analyses identify 31 new risk loci for colorectal cancer susceptibility. *Nature communications*. 2019; 10:1-5.
33. Jiao S, Hsu L, Berndt S, Bézieau S, Brenner H, Buchanan D, Caan BJ, Campbell PT, Carlson CS, Casey G, Chan AT. Genome-wide search for gene-gene interactions in colorectal cancer. *PloS one*. 2012;7: e52535. doi: [10.1371/journal.pone.0052535](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0052535)

34. Song N, Lee J, Cho S, Kim J, Oh JH, Shin A. Evaluation of gene-environment interactions for colorectal cancer susceptibility loci using case-only and case-control designs. *BMC cancer*. 2019; 19:1-10.
35. Slattery ML, Curtin K, Anderson K, Ma KN, Ballard L, Edwards S, Schaffer D, Potter J, Leppert M, Samowitz WS. Associations between cigarette smoking, lifestyle factors, and microsatellite instability in colon tumors. *Journal of the National Cancer Institute*. 2000; 92:1831-1836.
36. Amitay EL, Carr PR, Jansen L, Roth W, Alwers E, Herpel E, Kloor M, Bläker H, Chang-Claude J, Brenner H, Hoffmeister M. Smoking, alcohol consumption and colorectal cancer risk by molecular pathological subtypes and pathways. *British journal of cancer*. 2020; 122:1604-1610.
37. Fedirko V, Tramacere I, Bagnardi V, Rota M, Scotti L, Islami F, Negri E, Straif K, Romieu I, La Vecchia C, Boffetta P. Alcohol drinking and colorectal cancer risk: an overall and dose-response meta-analysis of published studies. *Annals of oncology*. 2011; 22:1958-1972.
38. Hamada T, Keum N, Nishihara R, Ogino S. Molecular pathological epidemiology: new developing frontiers of big data science to study etiologies and pathogenesis. *Journal of gastroenterology*. 2017; 52:265-275.
39. Ogino S, Chan AT, Fuchs CS, Giovannucci E. Molecular pathological epidemiology of colorectal neoplasia: an emerging transdisciplinary and interdisciplinary field. *Gut*. 2011; 60:397-411.
40. Oh S, Lee J, Kwon MS, Weir B, Ha K, Park T. A novel method to identify high order gene-gene interactions in genome-wide association studies: gene-based MDR. In *BMC bioinformatics* 2012; 13:1-9. BioMed Central
41. Issa IA, Noureddine M. Colorectal cancer screening: An updated review of the available options. *World journal of gastroenterology*. 2017; 23:5086-5096.
42. Sovich JL, Sartor Z, Misra S. Developments in screening tests and strategies for colorectal cancer. *BioMed research international*. 2015; 2015. doi: 10.1155/2015/326728
43. Sandoval JL, Relecom A, Ducros C, Bulliard JL, Arzel B, Guessous I. Screening Status as a Determinant of Choice of Colorectal Cancer Screening Method: A Population-Based Informed Survey. *Gastrointestinal Tumors*. 2021; 8:63-70.
44. Kim SY, Kim HS, Park HJ. Adverse events related to colonoscopy: Global trends and future challenges. *World journal of gastroenterology*. 2019; 25:190-204.
45. Lu M, Zhan X. The crucial role of multiomic approach in cancer research and clinically relevant outcomes. *EPMA Journal*. 2018; 9:77-102
46. Bishehsari F, Mahdavinia M, Vacca M, Malekzadeh R, Mariani-Costantini R. Epidemiological transition of colorectal cancer in developing countries: environmental factors, molecular pathways, and opportunities for prevention. *World journal of gastroenterology: WJG*. 2014; 20:6055-6072.
47. Markman JL, Shiao SL. Impact of the immune system and immunotherapy in colorectal cancer. *Journal of gastrointestinal oncology*. 2015; 6:208-223.

48. Poh CM, Zheng J, Channappanavar R, Chang ZW, Nguyen TH, Rénia L, Kedzierska K, Perlman S, Poon LL. Multiplex Screening Assay for Identifying Cytotoxic CD8+ T Cell Epitopes. *Frontiers in immunology*. 2020; 11:400. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00400>
49. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *cell*. 2011; 144:646-674.
50. Neitzel C, Demuth P, Wittmann S, Fahrer J. Targeting altered energy metabolism in colorectal cancer: oncogenic reprogramming, the central role of the TCA cycle and therapeutic opportunities. *Cancers*. 2020; 12:1731. doi: 10.3390/cancers12071731.
51. Brown RE, Short SP, Williams CS. Colorectal cancer and metabolism. *Current colorectal cancer reports*. 2018; 14:226-241.
52. Radišauskas R, Kuzmickienė I, Milinavičienė E, Everatt R. Hypertension, serum lipids and cancer risk: A review of epidemiological evidence. *Medicina*. 2016; 52:89-98.
53. Mamtani R, Lewis J, Scott F, Ahmad T, Goldberg D, Datta J, Yang Y, Boursi B. Disentangling the Association between Statins, Cholesterol, and Colorectal Cancer: A Nested Case-Control Study. *PLOS MEDICINE*. 2016; <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1002007>
54. Ding X, Zhang W, Li S, Yang H. The role of cholesterol metabolism in cancer. *American journal of cancer research*. 2019; 9:219-227.
55. Swan R, Alnabulsi A, Cash B, Alnabulsi A, Murray GI. Characterisation of the oxysterol metabolising enzyme pathway in mismatch repair proficient and deficient colorectal cancer. *Oncotarget*. 2016; 7:46509- 46527.
56. Wang C, Li P, Xuan J, Zhu C, Liu J, Shan L, Du Q, Ren Y, Ye J. Cholesterol enhances colorectal cancer progression via ROS elevation and MAPK signaling pathway activation. *Cellular Physiology and Biochemistry*. 2017; 42:729-742.
57. Xie C, Wen P, Su J, Li Q, Ren Y, Liu Y, Shen R, Ren J. Elevated serum triglyceride and low-density lipoprotein cholesterol promotes the formation of colorectal polyps. *BMC gastroenterology*. 2019; 19:1-6.
58. Hong TT, Shen D, Chen XP, Wu XH, Hua D. Preoperative serum lipid profile and outcome in nonmetastatic colorectal cancer. *Chronic diseases and translational medicine*. 2016; 2:241-249.
59. Coppola JA, Shrubsole MJ, Cai Q, Smalley WE, Dai Q, Ness RM, Fazio S, Zheng W, Murff HJ. Plasma lipid levels and colorectal adenoma risk. *Cancer Causes & Control*. 2015; 26:635-643.
60. Yao X, Tian Z. Dyslipidemia and colorectal cancer risk: a meta-analysis of prospective studies. *Cancer causes & control*. 2015; 26:257-268.
61. Park YM, Kim HS, Park JJ, Baik SJ, Youn YH, Kim JH, Park H. A simple scoring model for advanced colorectal neoplasm in asymptomatic subjects aged 40-49 years. *BMC Gastroenterology*. 2017; 17: 7. doi: 10.1186/s12876-016-0562-9
62. Yan G, Li L, Zhu B, Li Y. Lipidome in colorectal cancer. *Oncotarget*. 2016; 7:33429-33439.
63. Bonizzi A, Piuri G, Corsi F, Cazzola R, Mazzucchelli S. HDL Dysfunctionality: Clinical Relevance of Quality Rather Than Quantity. *Biomedicines*. 2021; 9:729. doi: 10.3390/biomedicines9070729

64. Kunnen S, Van Eck M. Lecithin: cholesterol acyltransferase: old friend or foe in atherosclerosis? *Journal of lipid research*. 2012; 53:1783-1799.
65. Tall AR. Functions of cholesterol ester transfer protein and relationship to coronary artery disease risk. *Journal of clinical lipidology*. 2010; 4:389-393.
66. Jafri H, Alsheikh-Ali AA, Karas RH. Baseline and on-treatment high-density lipoprotein cholesterol and the risk of cancer in randomized controlled trials of lipid-altering therapy. *Journal of the American College of Cardiology*. 2010; 55:2846-2854.
67. Dessì S, Batetta B, Pulisci D, Spano O, Anchisi C, Tessitore L, Costelli P, Baccino FM, Aroasio E, Pani P. Cholesterol content in tumor tissues is inversely associated with high-density lipoprotein cholesterol in serum in patients with gastrointestinal cancer. *Cancer*. 1994; 73:253-258.
68. Zhang X, Zhao XW, Liu DB, Han CZ, Du LL, Jing JX, Wang Y. Lipid levels in serum and cancerous tissues of colorectal cancer patients. *World Journal of Gastroenterology: WJG*. 2014; 20:8646-8652.
69. Healy LA, Howard JM, Ryan AM, Beddy P, Mehigan B, Stephens R, Reynolds JV. Metabolic syndrome and leptin are associated with adverse pathological features in male colorectal cancer patients. *Colorectal Disease*. 2012; 14:157-165.
70. Wang Y, Sun XQ, Lin HC, Wang DS, Wang ZQ, Shao Q, Wang FH, Yan SM, Liang JY, Zeng ZL, Ju HQ. Correlation between immune signature and high-density lipoprotein cholesterol level in stage II/III colorectal cancer. *Cancer medicine*. 2019; 8:1209-1217.
71. Tabuso M, Christian M, Kimani PK, Gopalakrishnan K, Arasaradnam RP. KRAS Status is Associated with Metabolic Parameters in Metastatic Colorectal Cancer According to Primary Tumour Location. *Pathology & Oncology Research*. 2020; 26:2537-2548.
72. Soran H, Hama S, Yadav R, Durrington PN. HDL functionality. *Current opinion in lipidology*. 2012; 23:353-366.
73. Vaisar T. Proteomics investigations of HDL: challenges and promise. *Current vascular pharmacology*. 2012; 10:410-421.
74. Georgila K, Vyrla D, Drakos E. Apolipoprotein AI (ApoA-I), immunity, inflammation and cancer. *Cancers*. 2019; 11:1097. doi: 10.3390/cancers11081097.
75. Lee MK, Moore XL, Fu Y, Al-Sharea A, Dragoljevic D, Fernandez-Rojo MA, Parton R, Sviridov D, Murphy AJ, Chin-Dusting JP. High-density lipoprotein inhibits human M1 macrophage polarization through redistribution of caveolin-1. *British Journal of Pharmacology*. 2016; 173:741-751.
76. Bains Y, Caccavello R, Kotani K, Gugliucci A. Paraoxonase 1, HDL subclasses and post surgery acute inflammation: A pilot study. *Antioxidants*. 2019; 8:192. doi: 10.3390/antiox8060192
77. Crespo-Sanjuan J, Calvo-Nieves MD, Aguirre-Gervas B, Herreros-Rodriguez J, Velayos-Jiménez B, Castro-Alija MJ, Munoz-Moreno MF, Sanchez D, Zamora-González N, Bajo-Graneras R, Garcia-Centeno RM. Early detection of high oxidative activity in patients with adenomatous intestinal polyps and colorectal adenocarcinoma: myeloperoxidase and oxidized low-density lipoprotein in serum as new markers of oxidative stress in colorectal cancer. *Laboratory medicine*. 2015; 46:123-135.

78. Ahmed NS, Shafik NM, Elraheem OA, Abou-Elnoeman SE. Association of paraoxonase-1 (Q192R and L55M) gene polymorphisms and activity with colorectal cancer and effect of surgical intervention. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 2015; 16:803-809.
79. Carini F, Mazzola M, Rappa F, Jurjus A, Geagea AG, Al Kattar S, Bou-Assi T, Jurjus R, Damiani P, Leone A, Tomasello G. Colorectal carcinogenesis: role of oxidative stress and antioxidants. *Anticancer research*. 2017; 37:4759-4766.
80. Klatt P, Lamas S. Regulation of protein function by S-glutathiolation in response to oxidative and nitrosative stress. *European journal of biochemistry*. 2000; 267:4928-4944.
81. Evans MD, Dizdaroglu M, Cooke MS. Oxidative DNA damage and disease: induction, repair and significance. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*. 2004; 567:1-61.
82. Skrzydlewska E, Sulkowski S, Koda M, Zalewski B, Kanczuga-Koda L, Sulkowska M. Lipid peroxidation and antioxidant status in colorectal cancer. *World journal of gastroenterology: WJG*. 2005; 11:403-406.
83. Strzelczyk JK, Wielkoszyński T, Krakowczyk Ł, Adamek B, Zalewska-Ziob M, Gawron K, Kasperczyk J, Wiczkowski A. The activity of antioxidant enzymes in colorectal adenocarcinoma and corresponding normal mucosa. *Acta Biochimica Polonica*. 2012;59: 549-556.
84. Liu H, Liu X, Zhang C, Zhu H, Xu Q, Bu Y, Lei Y. Redox imbalance in the development of colorectal cancer. *Journal of Cancer*. 2017; 8:1586-1597.
85. Chang D, Wang FA, Zhao YS, Pan HZ. Evaluation of oxidative stress in colorectal cancer patients. *Biomedical and Environmental Sciences*. 2008; 21:286-289.
86. Alamdari DH, Paletas K, Pegiou T, Sarigianni M, Befani C, Koliakos G. A novel assay for the evaluation of the prooxidant–antioxidant balance, before and after antioxidant vitamin administration in type II diabetes patients. *Clinical biochemistry*. 2007; 40:248-254.
87. Kontush A, Chapman MJ. Antiatherogenic function of HDL particle subpopulations: focus on antioxidative activities. *Current opinion in lipidology*. 2010; 21:312-318.
88. Camps J, Marsillach J, Joven J. The paraoxonases: role in human diseases and methodological difficulties in measurement. *Critical reviews in clinical laboratory sciences*. 2009; 46:83-106.
89. Manolescu BN, Busu C, Badita D, Stanculescu R, Berteanu M. Paraoxonase 1—an update of the antioxidant properties of high-density lipoproteins. *Maedica*. 2015; 10:173-177.
90. Laron Z. Insulin-like growth factor 1 (IGF-1): a growth hormone. *Molecular Pathology*. 2001; 54:311-316.
91. Giovannucci E. Insulin, insulin-like growth factors and colon cancer: a review of the evidence. *The Journal of nutrition*. 2001; 131:3109-3120.
92. Williams AC, Smartt H, H-Zadeh AM, Macfarlane M, Paraskeva C, Collard TJ. Insulin-like growth factor binding protein 3 (IGFBP-3) potentiates TRAIL-induced apoptosis of human colorectal carcinoma cells through inhibition of NF-κ B. *Cell Death & Differentiation*. 2007; 14:137-145.
93. Baxter RC. Signalling pathways involved in antiproliferative effects of IGFBP-3: a review. *Molecular Pathology*. 2001; 54:145-148.

94. Hassan AB, Macaulay VM. The insulin-like growth factor system as a therapeutic target in colorectal cancer. *Annals of oncology*. 2002; 13:349-356.
95. Vigneri PG, Tirrò E, Pennisi MS, Massimino M, Stella S, Romano C, Manzella L. The insulin/IGF system in colorectal cancer development and resistance to therapy. *Frontiers in oncology*. 2015; 5:230. <https://doi.org/10.3389/fonc.2015.00230>
96. Clayton PE, Banerjee I, Murray PG, Renehan AG. Growth hormone, the insulin-like growth factor axis, insulin and cancer risk. *Nature Reviews Endocrinology*. 2011; 7:11-24.
97. Zhang R, Xu GL, Li Y, He LJ, Chen LM, Wang GB, Lin SY, Luo GY, Gao XY, Shan HB. The role of insulin-like growth factor 1 and its receptor in the formation and development of colorectal carcinoma. *Journal of international medical research*. 2013; 41:1228-1235.
98. Sekharam M, Zhao H, Sun M, Fang Q, Zhang Q, Yuan Z, Dan HC, Boulware D, Cheng JQ, Coppola D. Insulin-like growth factor 1 receptor enhances invasion and induces resistance to apoptosis of colon cancer cells through the Akt/Bcl-xL pathway. *Cancer research*. 2003;63:7708-7716.
99. Reinmuth N, Fan F, Liu W, Parikh AA, Stoeltzing O, Jung YD, Bucana CD, Radinsky R, Gallick GE, Ellis LM. Impact of insulin-like growth factor receptor-I function on angiogenesis, growth, and metastasis of colon cancer. *Laboratory investigation*. 2002; 82:1377-1389.
100. Nahor I, Abramovitch S, Engeland K, Werner H. The p53-family members p63 and p73 inhibit insulin-like growth factor-I receptor gene expression in colon cancer cells. *Growth hormone & IGF research*. 2005; 15:388-96.
101. Jochem C, Leitzmann M. Obesity and colorectal cancer. *Obesity and Cancer*. 2016; 208: 17-41.
102. Viesti A, Collares R, Salgado Jr W, Pretti da Cunha Tirapelli D, dos Santos JS. The expression of LEP, LEPR, IGF1 and IL10 in obesity and the relationship with microRNAs. *PLoS One*. 2014;9: e93512. DOI: 10.1371/journal.pone.0093512
103. Tarasiuk A, Mosińska P, Fichna J. The mechanisms linking obesity to colon cancer: An overview. *Obesity research & clinical practice*. 2018; 12:251-259.
104. Hu J, Liu X, Chi J, Che K, Feng Y, Zhao S, Wang Z, Wang Y. Expressions of IGF-1, ERK, GLUT4, IRS-1 in metabolic syndrome complicated with colorectal cancer and their associations with the clinical characteristics of CRC. *Cancer Biomarkers*. 2018; 21:883-891.
105. Li ZJ, Ying XJ, Chen HL, Ye PJ, Chen ZL, Li G, Jiang HF, Liu J, Zhou SZ. Insulin-like growth factor-1 induces lymphangiogenesis and facilitates lymphatic metastasis in colorectal cancer. *World Journal of Gastroenterology: WJG*. 2013; 19:7788- 7794.
106. Yosry A, Omran D, Yousef M, Salah M, Omar H, Hamdy S, Shaker O, Elsherif Y, Marie MS. SNPs in the insulin-like growth factor gene and obesity impact on colorectal cancer in Egyptians. *Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP*. 2017; 18:2959-2964.
107. Joshi P, Joshi RK, Kim WJ, Lee SA. Insulin-like growth factor-1, IGF-binding protein-3, C-peptide and colorectal cancer: a case-control study. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 2015; 16:3735-3740.

108. D'Aloisio AA, Schroeder JC, North KE, Poole C, West SL, Travlos GS, Baird DD. IGF-I and IGFBP-3 polymorphisms in relation to circulating levels among African American and Caucasian women. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*. 2009; 18:954-966.
109. Schirripa M, Zhang W, Heinemann V, Cao S, Okazaki S, Yang D, Loupakis F, Berger MD, Ning Y, Miyamoto Y, Suenaga M. Single nucleotide polymorphisms in the IGF-IRS pathway are associated with outcome in mCRC patients enrolled in the FIRE-3 trial. *International journal of cancer*. 2017; 141:383-392.
110. Yu W, Yang L, Li T, Zhang Y. Cadherin signaling in cancer: its functions and role as a therapeutic target. *Frontiers in oncology*. 2019; 9:989. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00989>
111. Christou N, Perraud A, Blondy S, Jauberteau MO, Battu S, Mathonnet M. E-cadherin: A potential biomarker of colorectal cancer prognosis. *Oncology letters*. 2017; 13:4571-4576.
112. Daulagala AC, Bridges MC, Kourtidis A. E-cadherin beyond structure: a signaling hub in colon homeostasis and disease. *International journal of molecular sciences*. 2019; 20:2756. [10.3390/ijms20112756](https://doi.org/10.3390/ijms20112756)
113. Lamouille S, Xu J, Derynck R. Molecular mechanisms of epithelial–mesenchymal transition. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2014; 15:178-196.
114. Kwak JM, Min BW, Lee JH, Choi JS, Lee SI, Park SS, Kim J, Um JW, Kim SH, Moon HY. The prognostic significance of E-cadherin and liver intestine-cadherin expression in colorectal cancer. *Diseases of the colon & rectum*. 2007; 50:1873-1880.
115. Repetto O, De Paoli P, De Re V, Canzonieri V, Cannizzaro R. Levels of soluble E-cadherin in breast, gastric, and colorectal cancers. *BioMed research international*. 2014;2014. <https://doi.org/10.1155/2014/408047>
116. Okugawa Y, Toiyama Y, Inoue Y, Iwata T, Fujikawa H, Saigusa S, Konishi N, Tanaka K, Uchida K, Kusunoki M. Clinical significance of serum soluble E-cadherin in colorectal carcinoma. *Journal of Surgical Research*. 2012;175: e67-73.
117. Pittard AJ, Banks RE, Galley HF, Webster NR. Soluble E-cadherin concentrations in patients with systemic inflammatory response syndrome and multiorgan dysfunction syndrome. *British journal of anaesthesia*. 1996; 76:629-631.
118. Suarez-Carmona M, Lesage J, Cataldo D, Gilles C. EMT and inflammation: inseparable actors of cancer progression. *Molecular oncology*. 2017; 11:805-823.
119. Le Coz V, Zhu C, Devocelle A, Vazquez A, Boucheix C, Azzi S, Gallerne C, Eid P, Lecourt S, Giron-Michel J. IGF-1 contributes to the expansion of melanoma-initiating cells through an epithelial-mesenchymal transition process. *Oncotarget*. 2016; 7:82511- 82527.
120. Nagle AM, Levine KM, Tasdemir N, Scott JA, Burlbaugh K, Kehm J, Katz TA, Boone DN, Jacobsen BM, Atkinson JM, Oesterreich S. Loss of E-cadherin Enhances IGF1–IGF1R pathway activation and sensitizes breast cancers to anti-IGF1R/InsR inhibitors. *Clinical Cancer Research*. 2018; 24:5165-5177.

121. Nurwidya F, Takahashi F, Kobayashi I, Murakami A, Kato M, Minakata K, Nara T, Hashimoto M, Yagishita S, Baskoro H, Hidayat M. Treatment with insulin-like growth factor 1 receptor inhibitor reverses hypoxia-induced epithelial–mesenchymal transition in non-small cell lung cancer. *Biochemical and biophysical research communications*. 2014; 455:332-338.
122. Zhu H, Zhang Y, Geng Y, Lu W, Yin J, Li Z, Huang L, Liu H, Xu N. IGFBP2 promotes the EMT of colorectal cancer cells by regulating E-cadherin expression. *International journal of clinical and experimental pathology*. 2019; 12:2559-2565
123. Playford MP, Bicknell D, Bodmer WF, Macaulay VM. Insulin-like growth factor 1 regulates the location, stability, and transcriptional activity of β -catenin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2000; 97:12103-12108.
124. Riondino S, Roselli M, Palmirota R, Della-Morte D, Ferroni P, Guadagni F. Obesity and colorectal cancer: role of adipokines in tumor initiation and progression. *World journal of gastroenterology: WJG*. 2014; 20:5177-5190.
125. Coelho, Marisa, Teresa Oliveira, and Ruben Fernandes. "Biochemistry of adipose tissue: an endocrine organ." *Archives of medical science: AMS* 2013; 9.2: 191-200.
126. Schwartz B, Yehuda-Shnaidman E. Putative role of adipose tissue in growth and metabolism of colon cancer cells. *Frontiers in oncology*. 2014; 4:164. doi: 10.3389/fonc.2014.00164
127. Srivani G, Dariya B, Nagaraju G.P, Alam A. Adiponectin Signaling in Colorectal Cancer. In: Raju GS, Bhaskar LV, editors. *Theranostics Approaches to Gastric and Colon Cancer. Diagnostics and Therapeutic Advances in GI Malignancies*. Springer Nature; 2020; 29-48.
128. Dalamaga M, Diakopoulos KN, Mantzoros CS. The role of adiponectin in cancer: a review of current evidence. *Endocrine reviews*. 2012; 33:547-594.
129. Stern JH, Rutkowski JM, Scherer PE. Adiponectin, leptin, and fatty acids in the maintenance of metabolic homeostasis through adipose tissue crosstalk. *Cell metabolism*. 2016; 23:770-784.
130. Choi HM, Doss HM, Kim KS. Multifaceted physiological roles of adiponectin in inflammation and diseases. *International journal of molecular sciences*. 2020; 21:1219. doi: 10.3390/ijms21041219.
131. Wang ZV, Scherer PE. Adiponectin, the past two decades. *Journal of molecular cell biology*. 2016; 8:93-100.
132. Holland WL, Miller RA, Wang ZV, Sun K, Barth BM, Bui HH, Davis KE, Bikman BT, Halberg N, Rutkowski JM, Wade MR. Receptor-mediated activation of ceramidase activity initiates the pleiotropic actions of adiponectin. *Nature medicine*. 2011; 17:55-63.
133. Khoramipour K, Chamari K, Hekmatikar AA, Ziyaiyan A, Taherkhani S, Elguindy NM, Bragazzi NL. Adiponectin: Structure, physiological functions, role in diseases, and effects of nutrition. *Nutrients*. 2021; 13:1180. doi: 10.3390/nu13041180.
134. Wei EK, Giovannucci E, Fuchs CS, Willett WC, Mantzoros CS. Low plasma adiponectin levels and risk of colorectal cancer in men: a prospective study. *Journal of the National Cancer Institute*. 2005; 97:1688-1694.

135. Xu XT, Xu Q, Tong JL, Zhu MM, Huang ML, Ran ZH, Xiao SD. Meta-analysis: Circulating adiponectin levels and risk of colorectal cancer and adenoma. *Journal of digestive diseases*. 2011; 12:234-244.
136. Williams CJ, Mitsiades N, Sozopoulos E, Hsi A, Wolk A, Nifli AP, Tseleni-Balafouta S, Mantzoros CS. Adiponectin receptor expression is elevated in colorectal carcinomas but not in gastrointestinal stromal tumors. *Endocrine-related cancer*. 2008; 15:289-299.
137. Byeon JS, Jeong JY, Kim MJ, Lee SM, Nam WH, Myung SJ, Kim JG, Yang SK, Kim JH, Suh DJ. Adiponectin and adiponectin receptor in relation to colorectal cancer progression. *International journal of cancer*. 2010; 127:2758-2767.
138. Otani K, Ishihara S, Yamaguchi H, Muroto K, Yasuda K, Nishikawa T, Tanaka T, Kiyomatsu T, Hata K, Kawai K, Nozawa H. Adiponectin and colorectal cancer. *Surgery today*. 2017; 47:151-158.
139. Procaccini C, De Rosa V, Galgani M, Carbone F, La Rocca C, Formisano L, Matarese G. Role of adipokines signaling in the modulation of T cells function. *Frontiers in immunology*. 2013; 4:332. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00332>
140. Ohashi K, Parker JL, Ouchi N, Higuchi A, Vita JA, Gokce N, Pedersen AA, Kalthoff C, Tullin S, Sams A, Summer R. Adiponectin promotes macrophage polarization toward an anti-inflammatory phenotype. *Journal of Biological Chemistry*. 2010; 285:6153-6160.
141. Luo Y, Liu M. Adiponectin: a versatile player of innate immunity. *Journal of molecular cell biology*. 2016;8:120-128.
142. Lovren F, Pan Y, Quan A, Szmítko PE, Singh KK, Shukla PC, Gupta M, Chan L, Al-Omran M, Teoh H, Verma S. Adiponectin primes human monocytes into alternative anti-inflammatory M2 macrophages. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 2010; 299:656-663.
143. Kaklamani VG, Wisinski KB, Sadim M, Gulden C, Do A, Offit K, Baron JA, Ahsan H, Mantzoros C, Pasche B. Variants of the adiponectin (ADIPOQ) and adiponectin receptor 1 (ADIPOR1) genes and colorectal cancer risk. *Jama*. 2008; 300:1523-1531.
144. Obeid S, Wankell M, Charrez B, Sternberg J, Kreuter R, Esmaili S, Ramezani-Moghadam M, Devine C, Read S, Bhathal P, Lopata A. Adiponectin confers protection from acute colitis and restricts a B cell immune response. *Journal of Biological Chemistry*. 2017; 292:6569-6582.
145. Yang X, Li J, Cai W, Yang Q, Lu Z, Yu J, Yu H, Zhang N, Sun D, Qu Y, Guo H. Adiponectin gene polymorphisms are associated with increased risk of colorectal cancer. *Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research*. 2015; 21:2595-2606.
146. Divella R, Daniele A, Mazzocca A, Abbate I, Casamassima P, Caliandro C, Ruggeri E, Naglieri E, Sabbà C, De Luca R. ADIPOQ rs266729 G/C gene polymorphism and plasmatic adipocytokines connect metabolic syndrome to colorectal cancer. *Journal of Cancer*. 2017; 8:1000-1008.
147. Ou Y, Chen P, Zhou Z, Li C, Liu J, Tajima K, Guo J, Cao J, Wang H. Associations between variants on ADIPOQ and ADIPOR1 with colorectal cancer risk: a Chinese case-control study and updated meta-analysis. *BMC medical genetics*. 2014; 15:1-10.

148. Ye J, Jiang L, Wu C, Liu A, Mao S, Ge L. Three ADIPOR1 polymorphisms and cancer risk: a meta-analysis of case-control studies. *PloS one*. 2015 Jun 5;10(6): e0127253.
149. Terzić J, Grivennikov S, Karin E, Karin M. Inflammation and colon cancer. *Gastroenterology*. 2010; 138:2101-2114.
150. Osório-Costa F, Carvalheira JB. TNF- α in obesity-associated colon cancer. *Translational Gastrointestinal Cancer*. 2013; 2:179-193.
151. Bertazza L, Mocellin S. The dual role of tumor necrosis factor (TNF) in cancer biology. *Current medicinal chemistry*. 2010; 17:3337-3752.
152. Mercogliano MF, Bruni S, Mauro F, Elizalde PV, Schillaci R. Harnessing Tumor Necrosis Factor Alpha to Achieve Effective Cancer Immunotherapy. *Cancers*. 2021; 13:564. <https://doi.org/10.3390/cancers13030564>
153. Waters JP, Pober JS, Bradley JR. Tumour necrosis factor and cancer. *The Journal of pathology*. 2013; 230:241-248.
154. Balkwill F. TNF- α in promotion and progression of cancer. *Cancer and Metastasis Reviews*. 2006; 25:409-416.
155. Wang X, Lin Y. Tumor necrosis factor and cancer, buddies or foes? *Acta Pharmacologica Sinica*. 2008; 29:1275-1288.
156. Maeda N, Shimomura I, Kishida K, Nishizawa H, Matsuda M, Nagaretani H, Furuyama N, Kondo H, Takahashi M, Arita Y, Komuro R. Diet-induced insulin resistance in mice lacking adiponectin/ACRP30. *Nature medicine*. 2002; 8:731-737.
157. Kappes A, Löffler G. Influences of ionomycin, dibutyryl-cycloAMP and tumour necrosis factor-alpha on intracellular amount and secretion of apM1 in differentiating primary human preadipocytes. *Hormone and Metabolic Research*. 2000; 32:548-554.
158. Wang Y, Wang X, Lau WB, Yuan Y, Booth D, Li JJ, Scalia R, Preston K, Gao E, Koch W, Ma XL. Adiponectin inhibits tumor necrosis factor- α -induced vascular inflammatory response via caveolin-mediated ceramidase recruitment and activation. *Circulation research*. 2014; 114:792-805.
159. Mandal RK, Khan MA, Hussain A, Akhter N, Jawed A, Dar SA, Wahid M, Panda AK, Lohani M, Mishra BN, Haque S. A trial sequential meta-analysis of TNF- α -308G> A (rs1800629) gene polymorphism and susceptibility to colorectal cancer. *Bioscience reports*. 2019;39. doi: 10.1042/BSR20181052
160. Senhaji N, Serrano A, Badre W, Serbati N, Karkouri M, Zaid Y, Nadifi S, Martin J. Association of inflammatory cytokine gene polymorphisms with inflammatory bowel disease in a Moroccan cohort. *Genes & Immunity*. 2016; 17:60-65.
161. Li Z, Li SA, Sun Y, Liu Y, Li WL, Yang L, Duan Y, Li J, Guo H, Zou TN, Li Y. TNF- α -308 A allele is associated with an increased risk of distant metastasis in rectal cancer patients from Southwestern China. *PLoS One*. 2017;12: e0178218.
162. Jamaluddin MS, Weakley SM, Yao Q, Chen C. Resistin: functional roles and therapeutic considerations for cardiovascular disease. *British journal of pharmacology*. 2012; 165:622-632.

163. Schwartz DR, Lazar MA. Human resistin: found in translation from mouse to man. *Trends in Endocrinology & Metabolism*. 2011; 22:259-265.
164. Acquarone E, Monacelli F, Borghi R, Nencioni A, Odetti P. Resistin: A reappraisal. *Mechanisms of ageing and development*. 2019; 178:46-63.
165. Geyikli İ, Keskin M, Kör Y, Akan M. Increased resistin serum concentrations in patients with type 1 diabetes mellitus. *Journal of clinical research in pediatric endocrinology*. 2013; 5:189-193.
166. Asgary S, SamsamShariat SZ, Ghorbani A, Keshvari M, Sahebkar A, Sarrafzadegan N. Relationship between serum resistin concentrations with metabolic syndrome and its components in an Iranian population. *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews*. 2015; 9:266-270.
167. Konrad A, Lehrke M, Schachinger V, Seibold F, Stark R, Ochsenkühn T, Parhofer KG, Göke B, Broedl UC. Resistin is an inflammatory marker of inflammatory bowel disease in humans. *European journal of gastroenterology & hepatology*. 2007; 19:1070-1074.
168. Feng Z, Zhang H. Resistin and cancer risk: a mini-review. *Endocrinology and Metabolic Syndrome*. 2011; 4:003.
169. Dalamaga M. Resistin as a biomarker linking obesity and inflammation to cancer: potential clinical perspectives. *Biomarkers in medicine*. 2014; 8:107-118.
170. Daquinag AC, Zhang Y, Amaya-Manzanares F, Simmons PJ, Kolonin MG. An isoform of decorin is a resistin receptor on the surface of adipose progenitor cells. *Cell stem cell*. 2011; 9:74-86.
171. Sanchez-Solana B, Laborda J, Baladron V. Mouse resistin modulates adipogenesis and glucose uptake in 3T3-L1 preadipocytes through the ROR1 receptor. *Molecular endocrinology*. 2012; 26:110-127.
172. Tarkowski A, Bjersing J, Shestakov A, Bokarewa MI. Resistin competes with lipopolysaccharide for binding to toll-like receptor 4. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2010; 14:1419-1431.
173. Lee S, Lee HC, Kwon YW, Lee SE, Cho Y, Kim J, Lee S, Kim JY, Lee J, Yang HM, Mook-Jung I. Adenylyl cyclase-associated protein 1 is a receptor for human resistin and mediates inflammatory actions of human monocytes. *Cell metabolism*. 2014; 19:484-497.
174. Yang G, Fan W, Luo B, Xu Z, Wang P, Tang S, Xu P, Yu M. Circulating resistin levels and risk of colorectal cancer: a meta-analysis. *BioMed research international*. 2016; 2016:1-11.
175. Munjas J, Sopić M, Spasojević-Kalimanovska V, Kalimanovska-Oštrić D, Anđelković K, Jelić-Ivanović Z. Association of adenylyl cyclase-associated protein 1 with coronary artery disease. *European journal of clinical investigation*. 2017; 47:659-666.
176. Cheng T, Zhan X. Pattern recognition for predictive, preventive, and personalized medicine in cancer. *EPMA Journal*. 2017; 8:51-60.
177. Golubnitschaja O, Baban B, Boniolo G, Wang W, Bubnov R, Kapalla M, Krapfenbauer K, Mozaffari MS, Costigliola V. Medicine in the early twenty-first century: paradigm and anticipation-EPMA position paper 2016. *EPMA Journal*. 2016; 7:1-3.

178. Hashemi M, Bahari G, Tabasi F, Moazeni-Roodi A, Ghavami S. Association between rs1862513 and rs3745367 genetic polymorphisms of resistin and risk of cancer: a meta-analysis. *Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP*. 2018; 19:2709-2716.
179. Asztalos BF, Swarbrick MM, Schaefer EJ, Dallal GE, Horvath KV, Ai M, Stanhope KL, Austrheim-Smith I, Wolfe BM, Ali M, Havel PJ. Effects of weight loss, induced by gastric bypass surgery, on HDL remodeling in obese women. *Journal of lipid research*. 2010; 51:2405-2412.
180. Richter RJ, Jarvik GP, Furlong CE. Paraoxonase 1 status as a risk factor for disease or exposure. *Paraoxonases in Inflammation, Infection, and Toxicology*. 2010; 660: 29-35.
181. Ceron JJ, Tecles F, Tvarijonaviciute A. Serum paraoxonase 1 (PON1) measurement: an update. *BMC veterinary research*. 2014; 10:1-11.
182. Krzystek-Korpacka M, Boehm D, Matusiewicz M, Diakowska D, Grabowski K, Gamian, A. Paraoxonase 1 (PON1) status in gastroesophageal malignancies and associated paraneoplastic syndromes—connection with inflammation. *Clinical Biochemistry*. 2008; 41: 804-811.
183. Vujovic A, Spasojevic-Kalimanovska V, Bogavac-Stanojevic N, Spasic S, Kotur-Stevuljevic J, Jelic-Ivanovic Z. Comparison of two RNA isolation methods for determination of SOD1 and SOD2 gene expression in human blood and mononuclear cells. *Indian Journal of Biotechnology*. 2013; 12:468–474.
184. Baza transkriptomskih podataka. Hamm A, Prenen H, Van Delm W, Di Matteo M, Wenes M, Delamarre E, Schmidt T, Weitz J, Sarmiento R, Dezi A, Gasparini G. Tumour-educated circulating monocytes are powerful candidate biomarkers for diagnosis and disease follow-up of colorectal cancer. *Gut*. 2016;65:990-1000.
185. Baza transkriptomskih podataka. Solé Acha X, Crous Bou M, Cordero Romera D, Olivares D, Guinó E, Sanz Pamplona R, Rodríguez Moranta F, Sanjuan X, Oca Burguete JD, Salazar Soler R, Moreno Aguado V. Discovery and validation of new potential biomarkers for early detection of colon cancer. *PLoS One*. 2014; 9: e106748.
186. Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, Mukherjee S, Ebert BL, Gillette MA, Paulovich A, Pomeroy SL, Golub TR, Lander ES, Mesirov JP. Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2005; 102:15545-15550.
187. Šimundić AM. Measures of Diagnostic Accuracy: Basic Definitions. *EJIFCC*. 2009; 19: 203-211.
188. Grady BJ, Torstenson ES, Ritchie MD. The effects of linkage disequilibrium in large scale SNP datasets for MDR. *BioData mining*. 2011; 4:1-3.
189. Golubnitschaja O, Costigliola V. General report & recommendations in predictive, preventive and personalised medicine 2012: white paper of the European Association for Predictive, Preventive and Personalised Medicine. *EPMA Journal*. 2012; 3:1-53.
190. Notarnicola M, Altomare DF, Correale M, Ruggieri E, D'Attoma B, Mastrosimini A, Guerra V, Caruso MG. Serum lipid profile in colorectal cancer patients with and without synchronous distant metastases. *Oncology*. 2005; 68:371-374.

191. Ziętaszka M, Krawczyk-Lipiec J, Kraj L, Zaucha R, Małgorzewicz S. Nutritional status assessment in colorectal cancer patients qualified to systemic treatment. *Contemporary Oncology*. 2017; 21:157-161.
192. Mayengbam SS, Singh A, Pillai AD, Bhat MK. Influence of cholesterol on cancer progression and therapy. *Translational Oncology*. 2021; 14:101043. <https://doi.org/10.1016/j.tranon.2021.101043>
193. Kaneko R, Tsuji N, Asanuma K, Tanabe H, Kobayashi D, Watanabe N. Survivin down-regulation plays a crucial role in 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitor-induced apoptosis in cancer. *Journal of Biological Chemistry*. 2007; 282:19273-19281.
194. Abaza H, Ghanem A, Jmal A, Harzallah L, Rahal K, Guemira F. Changes in serum lipids in patients with colorectal cancer. *La Tunisie medicale*. 2011; 89:147-150.
195. Beloribi-Djefafia S, Vasseur S, Guillaumond F. Lipid metabolic reprogramming in cancer cells. *Oncogenesis*. 2016;5(1): e189-. DOI: 10.1038/oncsis.2015.49
196. Liao F, He W, Jiang C, Yin C, Guo G, Chen X, Qiu H, Rong Y, Zhang B, Xu D, Xia L. A high LDL-C to HDL-C ratio predicts poor prognosis for initially metastatic colorectal cancer patients with elevations in LDL-C. *OncoTargets and therapy*. 2015; 8:3135-3142.
197. Li CF, Li J, Bai P, Lv YM. Characteristic analysis of plasma lipid metabolism level in patients with colorectal adenoma. *Beijing da xue xue bao. Yi xue ban= Journal of Peking University. Health Sciences*. 2011; 43:432-435.
198. Wang Y, Wang ZQ, Wang FH, Lei XF, Yan SM, Wang DS, Zhang F, Xu RH, Wang LY, Li YH. Predictive value of chemotherapy-related high-density lipoprotein cholesterol (HDL) elevation in patients with colorectal cancer receiving adjuvant chemotherapy: an exploratory analysis of 851 cases. *Oncotarget*. 2016; 7:57290-57300.
199. Zamanian-Daryoush M, Lindner D, Tallant TC, Wang Z, Buffa J, Klipfell E, Parker Y, Hatala D, Parsons-Wingter P, Rayman P, Yusufshaq MS. The Cardioprotective Protein Apolipoprotein A1 Promotes Potent Anti-Tumorigenic Effects*♦. *Journal of biological chemistry*. 2013; 288:21237-21252.
200. Ossoli A, Simonelli S, Vitali C, Franceschini G, Calabresi L. Role of LCAT in atherosclerosis. *Journal of atherosclerosis and thrombosis*. 2016; 23:119-127.
201. Murakami T, Michelagnoli S, Longhi R, Gianfranceschi G, Pazzucconi F, Calabresi L, Sirtori CR, Franceschini G. Triglycerides are major determinants of cholesterol esterification/transfer and HDL remodeling in human plasma. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 1995; 15:1819-1828.
202. Guo SX, Yao MH, Ding YS, Zhang JY, Yan YZ, Liu JM, Zhang M, Rui DS, Niu Q, He J, Guo H. Associations of cholesteryl ester transfer protein TaqIB polymorphism with the composite ischemic cardiovascular disease risk and HDL-C concentrations: a meta-analysis. *International journal of environmental research and public health*. 2016; 13:882. 10.3390/ijerph13090882
203. Bu XM, Niu DM, Wu J, Yuan YL, Song JX, Wang JJ. Elevated levels of pre β 1-high-density lipoprotein are associated with cholesterol ester transfer protein, the presence and severity of coronary artery disease. *Lipids in health and disease*. 2017; 16:1-7.

204. Esau L, Sagar S, Bangarusamy D, Kaur M. Identification of CETP as a molecular target for estrogen positive breast cancer cell death by cholesterol depleting agents. *Genes & cancer*. 2016; 7:309-322.
205. Ribas V, García-Ruiz C, Fernández-Checa JC. Mitochondria, cholesterol and cancer cell metabolism. *Clinical and translational medicine*. 2016; 5:1-24.
206. Gauthier A, Lau P, Zha X, Milne R, McPherson R. Cholesteryl ester transfer protein directly mediates selective uptake of high-density lipoprotein cholesteryl esters by the liver. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2005; 25:2177-2184.
207. Izem L, Morton RE. Possible Role for Intracellular Cholesteryl Ester Transfer Protein in Adipocyte Lipid Metabolism and Storage*♦. *Journal of Biological Chemistry*. 2007; 282:21856-21865.
208. Granot E, Tabas I, Tall AR. Human plasma cholesteryl ester transfer protein enhances the transfer of cholesteryl ester from high density lipoproteins into cultured HepG2 cells. *Journal of Biological Chemistry*. 1987; 262:3482-3487.
209. Huang Z, Inazu A, Kawashiri MA, Nohara A, Higashikata T, Mabuchi H. Dual effects on HDL metabolism by cholesteryl ester transfer protein inhibition in HepG2 cells. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. 2003;284:1210-1219.
210. Kontush A, Chapman MJ. Functionally defective high-density lipoprotein: a new therapeutic target at the crossroads of dyslipidemia, inflammation, and atherosclerosis. *Pharmacological reviews*. 2006; 58:342-374.
211. Gopčević KR, Rovčanin BR, Tatić SB, Krivokapić ZV, Gajić MM, Dragutinović VV. Activity of superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase, and glutathione reductase in different stages of colorectal carcinoma. *Digestive diseases and sciences*. 2013; 58:2646-2652.
212. Kraus S, Arber N. Inflammation and colorectal cancer. *Current opinion in pharmacology*. 2009; 9:405-410.
213. Argilés JM, Busquets S, Stemmler B, López-Soriano FJ. Cancer cachexia: understanding the molecular basis. *Nature Reviews Cancer*. 2014; 14:754-762.
214. Schwarz S, Prokopchuk O, Esefeld K, Gröschel S, Bachmann J, Lorenzen S, Friess H, Halle M, Martignoni ME. The clinical picture of cachexia: a mosaic of different parameters (experience of 503 patients). *BMC cancer*. 2017; 17:1-10.
215. Bidlingmaier M, Friedrich N, Emeny RT, Spranger J, Wolthers OD, Roswall J, Körner A, Obermayer-Pietsch B, Hübener C, Dahlgren J, Frystyk J. Reference intervals for insulin-like growth factor-1 (igf-i) from birth to senescence: results from a multicenter study using a new automated chemiluminescence IGF-I immunoassay conforming to recent international recommendations. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2014; 99:1712-1721.
216. Zhu H, Xu Y, Gong F, Shan G, Yang H, Xu K, Zhang D, Cheng X, Zhang Z, Chen S, Wang L. Reference ranges for serum insulin-like growth factor I (IGF-I) in healthy Chinese adults. *PLoS one*. 2017;12: e0185561.

217. Elzagheid A, Buhmeida A, Laato M, EL-FAITORI OM, Syrjänen K, Collan Y, Pyrhönen S. Loss of E-cadherin expression predicts disease recurrence and shorter survival in colorectal carcinoma. *Apmis*. 2012; 120:539-548.
218. Yun JA, Kim SH, Hong HK, Yun SH, Kim HC, Chun HK, Cho YB, Lee WY. Loss of E-Cadherin expression is associated with a poor prognosis in stage III colorectal cancer. *Oncology*. 2014; 86:318-328.
219. Weiß JV, Klein-Scory S, Kübler S, Reinacher-Schick A, Stricker I, Schmiegel W, Schwarte-Waldhoff I. Soluble E-cadherin as a serum biomarker candidate: elevated levels in patients with late-stage colorectal carcinoma and FAP. *International journal of cancer*. 2011; 128:1384-1392.
220. Cepowicz D, Zaręba K, Pryczynicz A, Dawidziuk T, Żurawska J, Hołody-Zaręba J, Gryko M, Kędra B. Blood serum levels of E-cadherin in patients with colorectal cancer. *Przegląd gastroenterologiczny*. 2017; 12:186-191.
221. Winder T, Zhang W, Yang D, Ning Y, Bohanes P, Gerger A, Wilson PM, Pohl A, Mauro DJ, Langer C, Rowinsky EK. Germline polymorphisms in genes involved in the IGF1 pathway predict efficacy of cetuximab in wild-type KRAS mCRC patients. *Clinical Cancer Research*. 2010;16:5591-5602.
222. Muendlein A, Lang AH, Geller-Rhomberg S, Winder T, Gasser K, Drexel H, Decker T, Mueller-Holzner E, Chamson M, Marth C, Hubalek M. Association of a common genetic variant of the IGF-1 gene with event-free survival in patients with HER2-positive breast cancer. *Journal of cancer research and clinical oncology*. 2013; 139:491-498.
223. Qian B, Zheng H, Yu H, Chen K. Genotypes and phenotypes of IGF-I and IGFBP-3 in breast tumors among Chinese women. *Breast cancer research and treatment*. 2011; 130:217-226.
224. Al-Zahrani A, Sandhu MS, Luben RN, Thompson D, Baynes C, Pooley KA, Luccarini C, Munday H, Perkins B, Smith P, Pharoah PD. IGF1 and IGFBP3 tagging polymorphisms are associated with circulating levels of IGF1, IGFBP3 and risk of breast cancer. *Human molecular genetics*. 2006; 15:1-10.
225. Terry KL, Tworoger SS, Gates MA, Cramer DW, Hankinson SE. Common genetic variation in IGF1, IGFBP1 and IGFBP3 and ovarian cancer risk. *Carcinogenesis*. 2009; 30:2042-2046.
226. Van Stijn CM, Kim J, Lusic AJ, Barish GD, Tangirala RK. Macrophage polarization phenotype regulates adiponectin receptor expression and adiponectin anti-inflammatory response. *The FASEB Journal*. 2015; 29:636-649.
227. Ferroni P, Palmirotta R, Spila A, Martini F, Raparelli V, Fossile E, Mariotti S, Del Monte G, Buonomo O, Roselli M, Guadagni F. Prognostic significance of adiponectin levels in non-metastatic colorectal cancer. *Anticancer research*. 2007; 27:483-489.
228. Gialamas SP, Petridou ET, Tseleni-Balafouta S, Spyridopoulos TN, Matsoukis IL, Kondi-Pafiti A, Zografos G, Mantzoros CS. Serum adiponectin levels and tissue expression of adiponectin receptors are associated with risk, stage, and grade of colorectal cancer. *Metabolism*. 2011; 60:1530-1538.

229. Hiyoshi M, Tsuno NH, Otani K, Kawai K, Nishikawa T, Shuno Y, Sasaki K, Hongo K, Kaneko M, Sunami E, Takahashi K. Adiponectin receptor 2 is negatively associated with lymph node metastasis of colorectal cancer. *Oncology letters*. 2012; 3:756-760.
230. Luo N, Chung BH, Wang X, Klein RL, Tang CK, Garvey WT, Fu Y. Enhanced adiponectin actions by overexpression of adiponectin receptor 1 in macrophages. *Atherosclerosis*. 2013; 228:124-135.
231. Fujisawa T, Endo H, Tomimoto A, Sugiyama M, Takahashi H, Saito S, Inamori M, Nakajima N, Watanabe M, Kubota N, Yamauchi T. Adiponectin suppresses colorectal carcinogenesis under the high-fat diet condition. *Gut*. 2008; 57:1531-1538.
232. De Simone V, Franze E, Ronchetti G, Colantoni A, Fantini MC, Di Fusco D, Sica GS, Sileri P, MacDonald TT, Pallone F, Monteleone G. Th17-type cytokines, IL-6 and TNF- α synergistically activate STAT3 and NF- κ B to promote colorectal cancer cell growth. *Oncogene*. 2015;34:3493-3503.
233. Sugiyama M, Takahashi H, Hosono K, Endo H, Kato S, Yoneda K, Nozaki Y, Fujita K, Yoneda M, Wada K, Nakagama H. Adiponectin inhibits colorectal cancer cell growth through the AMPK/mTOR pathway. *International journal of oncology*. 2009; 34:339-344.
234. Tae CH, Kim SE, Jung SA, Joo YH, Shim KN, Jung HK, Kim TH, Cho MS, Kim KH, Kim JS. Involvement of adiponectin in early stage of colorectal carcinogenesis. *BMC cancer*. 2014; 14:1-11.
235. Hector J, Schwarzloh B, Goehring J, Strate TG, Hess UF, Deuretzbacher G, Hansen-Algenstaedt N, Beil FU, Algenstaedt P. TNF- α alters visfatin and adiponectin levels in human fat. *Hormone and Metabolic Research*. 2007; 39:250-255.
236. Chen J, Tan B, Karteris E, Zervou S, Digby J, Hillhouse EW, Vatish M, Randeve HS. Secretion of adiponectin by human placenta: differential modulation of adiponectin and its receptors by cytokines. *Diabetologia*. 2006; 49:1292-1302.
237. Surendar J, Frohberger SJ, Karunakaran I, Schmitt V, Stamminger W, Neumann AL, Wilhelm C, Hoerauf A, Hübner MP. Adiponectin limits IFN- γ and IL-17 producing CD4 T cells in obesity by restraining cell intrinsic glycolysis. *Frontiers in immunology*. 2019; 10:2555. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02555>
238. Barth Jr RJ, Camp BJ, Martuscello TA, Dain BJ, Memoli VA. The cytokine microenvironment of human colon carcinoma: Lymphocyte expression of tumor necrosis factor- α and interleukin-4 predicts improved survival. *Cancer: Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society*. 1996; 78:1168-1178.
239. Al Obeed OA, Alkhalaf KA, Al Sheikh A, Zubaidi AM, Vaali-Mohammed MA, Boushey R, Mckerrow JH, Abdulla MH. Increased expression of tumor necrosis factor- α is associated with advanced colorectal cancer stages. *World Journal of Gastroenterology: WJG*. 2014; 20:18390-18396.
240. Ganapathi SK, Beggs AD, Hodgson SV, Kumar D. Expression and DNA methylation of TNF, IFNG and FOXP3 in colorectal cancer and their prognostic significance. *British journal of cancer*. 2014; 111:1581-1589.

241. Soccio T, Zhang YY, Bacci S, Mlynarski W, Placha G, Raggio G, Di Paola R, Marucci A, Johnstone MT, Gervino EV, Abumrad NA. Common haplotypes at the adiponectin receptor 1 (ADIPOR1) locus are associated with increased risk of coronary artery disease in type 2 diabetes. *Diabetes*. 2006; 55:2763-2770
242. Cox AJ, Lambird JE, Sandy An S, Register TC, Langefeld CD, Carr JJ, Freedman BI, Bowden DW. Variants in adiponectin signaling pathway genes show little association with subclinical CVD in the diabetes heart study. *Obesity*. 2013; 21:456-462.
243. Ankathil R, Mustapha MA, Aziz AA, Shahpudin SN, Zakaria AD, Hassan MR, Musa KI. Contribution of Genetic Polymorphisms of Inflammation Response Genes on Sporadic Colorectal Cancer Predisposition Risk in Malaysian Patients—A Case Control Study. *Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP*. 2019; 20:1621-1632.
244. Li H, Jin Z, Li X, Wu L, Jin J. Associations between single-nucleotide polymorphisms and inflammatory bowel disease-associated colorectal cancers in inflammatory bowel disease patients: a meta-analysis. *Clinical and Translational Oncology*. 2017; 19:1018-1027.
245. Banday MZ, Balkhi HM, Hamid Z, Sameer AS, Chowdri NA, Haq E. Tumor necrosis factor- α (TNF- α)-308G/A promoter polymorphism in colorectal cancer in ethnic Kashmiri population—a case control study in a detailed perspective. *Meta gene*. 2016; 9:128-136.
246. Wang CH, Wang PJ, Hsieh YC, Lo S, Lee YC, Chen YC, Tsai CH, Chiu WC, Hu SC, Lu CW, Yang YF. Resistin facilitates breast cancer progression via TLR4-mediated induction of mesenchymal phenotypes and stemness properties. *Oncogene*. 2018; 37:589-600.
247. Hsieh YY, Shen CH, Huang WS, Chin CC, Kuo YH, Hsieh MC, Yu HR, Chang TS, Lin TH, Chiu YW, Chen CN. Resistin-induced stromal cell-derived factor-1 expression through Toll-like receptor 4 and activation of p38-MAPK/NF κ B signaling pathway in gastric cancer cells. *Journal of biomedical science*. 2014; 21:1-10.
248. Zhang H, Zhou GL. CAP1 (cyclase-associated protein 1) exerts distinct functions in the proliferation and metastatic potential of breast cancer cells mediated by ERK. *Scientific Reports*. 2016; 6: 25933. doi: 10.1038/srep25933
249. Xie S, Shen C, Zhou S, Xiong M, Tan M, Song X, Wang C. Role of adenylate cyclase-associated protein 1 in cancers. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*. 2018; 11:3086-3099.
250. Ono S. The role of cyclase-associated protein in regulating actin filament dynamics—more than a monomer-sequestration factor. *Journal of cell science*. 2013; 126:3249-3258.
251. Kaser S, Kaser A, Sandhofer A, Ebenbichler CF, Tilg H, Patsch JR. Resistin messenger-RNA expression is increased by proinflammatory cytokines in vitro. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2003; 309:286-290.
252. Danese E, Montagnana M, Minicozzi AM, Bonafini S, Ruzzenente O, Gelati M, De Manzoni G, Lippi G, Guidi GC. The role of resistin in colorectal cancer. *Clinica chimica acta*. 2012; 413:760-764.

253. Song G, Wu X, Zhang P, Yu Y, Yang M, Jiao P, Wang N, Song H, Wu Y, Zhang X, Liu H. High-density lipoprotein inhibits ox-LDL-induced adipokine secretion by upregulating SR-BI expression and suppressing ER Stress pathway. *Scientific reports*. 2016; 6:1-11.
254. Stevanovic M, Vekic J, Bogavac-Stanojevic N, Janac J, Stjepanovic Z, Zeljkovic D, Trifunovic B, Spasojevic-Kalimanovska V, Zeljkovic A. Significance of LDL and HDL subclasses characterization in the assessment of risk for colorectal cancer development. *Biochemia medica*. 2018; 28:503-513.
255. Rosso LG, Lhomme M, Merono T, Sorroche P, Catoggio L, Soriano E, et al. Altered lipidome and antioxidative activity of small, dense HDL in normolipidemic rheumatoid arthritis: relevance of inflammation. *Atherosclerosis*. 2014; 237:652–660.
256. Kunnari AM, Savolainen ER, Ukkola OH, Kesäniemi YA, Jokela MA. The expression of human resistin in different leucocyte lineages is modulated by LPS and TNF α . *Regulatory peptides*. 2009; 157:57-63.
257. Ghaemmaghami S, Mohaddes SM, Hedayati M, Mohammadi MG, Dehbashi G. Resistin and visfatin expression in HCT-116 colorectal cancer cell line. *International journal of molecular and cellular medicine*. 2013; 2:143-150.
258. Munoz-Palomeque A, Guerrero-Ramirez MA, Rubio-Chavez LA, Rosales-Gomez RC, Lopez-Cardona MG, Barajas-Avila VH, Delgadillo-Barrera A, Canton-Romero JC, Montoya-Fuentes H, Garcia-Cobian TA, Gutierrez-Rubio SA. Association of RETN and CAP1 SNPs, expression and serum resistin levels with breast cancer in Mexican women. *Genetic testing and molecular biomarkers*. 2018; 22:209-217.
259. Gordon S, Plüddemann A. Tissue macrophages: heterogeneity and functions. *BMC biology*. 2017; 15:1-8.
260. Wang K, Karin M. Tumor-elicited inflammation and colorectal cancer. *Advances in cancer research*. 2015; 128:173-196.
261. Janssens JP, Schuster K, Voss A. Preventive, predictive, and personalized medicine for effective and affordable cancer care. *EPMA Journal*. 2018; 9:113-123.
262. Nakajima TE, Yamada Y, Hamano T, Furuta K, Matsuda T, Fujita S, Kato K, Hamaguchi T, Shimada Y. Adipocytokines as new promising markers of colorectal tumors: adiponectin for colorectal adenoma, and resistin and visfatin for colorectal cancer. *Cancer science*. 2010; 101:1286-1291.
263. Ning S, Wei W, Li J, Hou B, Zhong J, Xie Y, Liu H, Mo X, Chen J, Zhang L. Clinical significance and diagnostic capacity of serum TK1, CEA, CA 19-9 and CA 72-4 levels in gastric and colorectal cancer patients. *Journal of Cancer*. 2018; 9:494-501.
264. Osawa H, Yamada K, Onuma H, Murakami A, Ochi M, Kawata H, Nishimiya T, Niiya T, Shimizu I, Nishida W, Hashiramoto M. The G/G genotype of a resistin single-nucleotide polymorphism at- 420 increases type 2 diabetes mellitus susceptibility by inducing promoter activity through specific binding of Sp1/3. *The American Journal of Human Genetics*. 2004; 75:678-686.

265. Osawa H, Tabara Y, Ohashi J, Kawamura R, Onuma H, Makino H. Is rs34861192 or rs1862513 a more promising variant for determining plasma resistin in an aged Japanese population? *Diabetologia*. 2010; 53:795-797.
266. Onuma H, Tabara Y, Kawamura R, Ohashi J, Nishida W, Takata Y, Ochi M, Nishimiya T, Ohyagi Y, Kawamoto R, Kohara K. Dual effects of a RETN single nucleotide polymorphism (SNP) at-420 on plasma resistin: genotype and DNA methylation. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2017; 102:884-892.
267. He B, Pan Y, Zhang Y, Bao Q, Chen L, Nie Z, Gu L, Xu Y, Wang S. Effects of genetic variations in the adiponectin pathway genes on the risk of colorectal cancer in the Chinese population. *BMC medical genetics*. 2011; 12:1-7.
268. Yu LX, Zhou NN, Liu LY, Wang F, Ma ZB, Li J, Yu ZG. Adiponectin receptor 1 (ADIPOR1) rs1342387 polymorphism and risk of cancer: a meta-analysis. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 2014; 15:7515-7520.
269. Motsinger AA, Ritchie MD. Multifactor dimensionality reduction: an analysis strategy for modelling and detecting gene-gene interactions in human genetics and pharmacogenomics studies. *Human genomics*. 2006; 2:1-11.

Biografija autora

Marija Mihajlović je rođena 16.04.1989. godine u Požarevcu, gde je završila osnovnu školu i srednju medicinsku školu, smer farmaceutski tehničar. Farmaceutski fakultet Univerziteta u Beogradu, smer magistar farmacije-medicinski biohemičar, upisala je 2008. godine, a završila 2013. sa prosečnom ocenom 9,07 i eksperimentalnim završnim radom pod nazivom "Neutrofilni lipokalin kao biomarker oštećenja bubrega". Doktorske akademske studije na Farmaceutskom fakultetu u Beogradu, modul Medicinska biohemija, je upisala 2014/2015 godine, dok je rad na tezi završila pod mentorstvom vanrednog profesora, dr Aleksandre Zeljković. 2017. godine je upisala specijalističke akademske studije, modul Farmakoekonomija i farmaceutska legislativa koje je završila 2019. godine sa prosečnom ocenom 10,00 i time stekla zvanje - specijalista farmacije. Tokom osnovnih studija bila je stipendista Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja. Nakon diplomiranja, pripravnički staž je obavila u Zavodu za biohemijsku, mikrobiološku i genetsku dijagnostiku "Hexalab/Beolab-Synevo", gde je bila i zaposlena na poziciji medicinskog biohemičara do kraja 2015 godine. Od 2016. godine je zaposlena najpre kao saradnik u nastavi, a potom kao asistent na Katedri za medicinsku biohemiju gde učestvuje u izvođenju praktične nastave iz obaveznih i izbornih predmeta na osnovnim integrisanim studijama. Od 2017. godine je kao istraživač saradnik uključena na projekat "Interaktivna uloga dislipidemije, oksidativnog stresa i inflamacije u aterosklerozi i ostalim bolestima: genetski i biohemijski markeri" (broj projekta 175035). Od 2017. godine učesnik je tri međunarodne COST akcije. Od decembra 2021. angažovana je kao istraživač na projektu „High density lipoprotein metabolome research to improve pregnancy outcome“ koji se realizuje u okviru programa Ideje Fonda za nauku Republike Srbije. Kao autor i koautor je objavila 15 naučnih radova i učestvovala sa većim brojem saopštenja na nacionalnim i međunarodnim skupovima. Rezultate doktorske disertacije je publikovala u četiri rada u međunarodnim časopisima kategorije M21 (tri rada) i M22 (jedan rad). Član je komisije za odbranu diplomskih radova na osnovnim integrisanim studijama.

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора _____ Марија Михајловић _____

Број индекса _____ 04/14 _____

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

_____, „Испитивање предиктивног и дијагностичког значаја појединачних и комбинованих биомаркера липидног статуса и инфламације код пацијената са колоректалним карциномом“ _____

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

Потпис аутора

У Београду, _7.12.2021. _____

Марија Михајловић

**Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског
рада**

Име и презиме аутора _____ Марија Михајловић _____

Број индекса _____ 04/14 _____

Студијски програм _____ Медицинска биохемија _____

Наслов рада „Испитивање предиктивног и дијагностичког значаја појединачних и комбинованих биомаркера липидног статуса и инфламације код пацијената са колоректалним карциномом“

Ментор _____ проф. др Александра Зељковић _____

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањивања у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива 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 аутора

У Београду, _____ 7.12.2021. _____

_____ *Марија Михајловић* _____

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални Репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом: „Испитивање предиктивног и дијагностичког значаја појединачних и комбинованих биомаркера липидног статуса и инфламације код пацијената са колоректалним карциномом“

која је моје ауторско дело.

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

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

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.

Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

Потпис аутора

У Београду, _____ 7.12.2021. _____

Марија Микајловић

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.** Дозвољаваате 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 прерада.** Дозвољаваате 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.** Дозвољаваате 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 прерада.** Дозвољаваате 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.** Дозвољаваате 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.