

UNIVERZITET U BEOGRADU  
MEDICINSKI FAKULTET

Milica Lj. Stojković Lalošević

ODREĐIVANJE POLIMORFIZAMA GENA ZA  
GLUTATION TRANSFERAZU I BIOHEMIJSKIH  
MARKERA KOD BOLESNIKA SA  
KOLOREKTALNIM KARCINOMOM

Doktorska disertacija

Beograd, 2020

UNIVERSITY OF BELGRADE  
SCHOOL OF MEDICINE

Milica Lj. Stojković Lalošević

DETERMINATION OF GLUTATHIONE  
TRANSFERASE GENETIC POLYMORPHISMS AND  
BIOCHEMICAL MARKERS IN COLORECTAL  
CANCER PATIENTS

Doctoral dissertation

Belgrade, 2020

## PODACI O MENTORIMA I ČLANOVIMA KOMISIJE

MENTOR:

**dr Zoran Krivokapić**, hirurg, redovni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, redovni član SANU

MENTOR:

**dr Aleksandra Pavlović Marković**, redovni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

MENTOR:

**dr Marija Plješa Ercegovac**, vanredni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

ČLANOVI KOMISIJE:

**dr Tatjana Simić**, redovni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, dopisni član SANU

**dr Goran Barišić**, hirurg, vanredni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

**dr Dragomir Damjanov**, redovni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Novom Sadu

DATUM ODBRANE: \_\_\_\_\_

*Izradi ove doktorske teze su svojim znanjem, zalaganjem, podrškom, razumevanjem, strpljenjem doprineli moji učitelji, saradnici, prijatelji i moja porodica.*

*Zahvaljujem se svom mentoru Akademiku Prof. dr Zoranu Krivokapiću na ukazanom poverenju, ličnoj i profesionalnoj podršci, kao i na vremenu i trudu koji je uložio tokom izrade ove teze. Njegovo znanje, sistematičnost, doslednost i upornost bile su od velike pomoći u trenucima kada se činilo da su prepreke u izradi teze nepremostive.*

*Komentoru Prof. dr Aleksandri Pavlović Marković koja me je naučila neusiljenom dostojanstvu, strpljivosti i težnji da se ne zadovoljim površnim shvatanjem gastroenterologije i hepatologije. Profesorkin entuzijazam, podrška, znanje i korisni saveti su učinili da rad na tezi bude značajno lakši.*

*Komentoru Prof. dr Mariji Plješa Ercegovac koja me je uvela u svet biohemije i eksperimentalnog rada. Način na koji je Profesorka pristupala radu kao i energičnost kojom mi je prenosila znanje, bilo mi je velika inspiracija i podsticaj da nastavim svoje usavršavanje.*

*Akademiku Prof. dr Tatjani Simić koja mi je pružila veliku podršku tokom svih faza izrade ove teze. Zahvaljujem se na izuzetno korisnim savetima i sugestijama kao i na stručnoj pomoći.*

*Prof. dr Tatjani Pekmezović, na ukazanom poverenju, izdvojenom vremenu i dragocnim savetima.*

*U završnoj fazi izrade pomogli su i korisnim sugestijama i savetima značajno doprineli da teza dobije ovakav finalni oblik članovi komisije Prof. dr Goran Barišić i Prof. dr Dragomir Damjanov.*

*Neizmernu zahvalnost dugujem Doc. dr Vesni Ćorić od koje sam imala priliku mnogo da naučim u poslednjih nekoliko godina. Zahvaljujem joj se na entuzijastičnom pristupu nauci, pomoći u laboratorijskom radu, dostupnosti, podsticajima i savetima.*

*Zahvaljujem se svim članovima kolektiva Klinike za digestivnu hirurgiju, posebno III odeljenju na angažovanju i podršci prilikom izrade ove teze.*

*Zahvalnost dugujem svim članovima kolektiva Klinike za gastroenterologiju i hepatologiju koji su svojim zalaganjem u granicama svojih mogućnosti doprineli izradi ove teze. Posebnu zahvalnost dugujem svom Odeljenju Hepatologije.*

*Zahvalnost dugujem svim članovima kolektiva Instituta za medicinsku i kliničku biohemiju, Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu.*

*Zahvaljujem se svojim prijateljima na razumevanju, vedrom duhu i podršci.*

*Zahvaljujem se baki Oliveri, dedi Jovi, baki Živanki i Dekanosu na podstreku, veri i neizmernoj ljubavi od najmlađih dana.*

*Najveću podršku, ljubav, razumevanje, veru i pomoć svih ovih godina pružali su mi moji roditelji Mirjana i Ljubiša, kao i moj suprug Jovan i sin Filip. Umesto reči zahvalnosti njima posvećujem ovaj rad.*

*Milica Stojković Lalošević*

## **Određivanje polimorfizama gena za glutathion transferazu i biohemijskih markera kod bolesnika sa kolorektalnim karcinomom**

### SAŽETAK

**Uvod** Kolorektalni karcinom (KRK) je drugi najčešći karcinom u opštoj populaciji, posle karcinoma pluća kod muškaraca i karcinoma dojke kod žena. Glutathion transferaze (GST) su familija enzima koji su uključeni u proces detoksikacije heterocikličnih amina i policikličnih aromatičnih ugljovodonika, koji su prepoznati faktori rizika u razvoju KRK. Polimorfizmi GST često dovode do potpunog odsustva ili izmenjene enzimske aktivnosti, što može imati efekat na nastanak KRK-a. Pored ranog otkrivanja, prepoznavanja faktora rizika, u svakodnevnoj kliničkoj praksi od velikog je značaja i pravovremena procena stadijuma bolesti. U proceni stadijuma bolesti kao i u kliničkom praćenju bolesnika, različiti biohemijski markeri i parametri sistemske inflamacije svakodnevno se koriste.

**Cilj** Cilj istraživanja bio je da se ispita uticaj genskog polimorfizma gena za GST na rizik za nastanak KRK, moguća povezanost između polimorfizma gena za GST i biohemijskih i fenotipskih karakteristika tumora, uključujući tip, stadijum i gradus KRK, kao i ispitivanje potencijalnog prognostičkog značaja GST kod bolesnika sa KRK. Pored toga, cilj istraživanja bio je ispitivanje dijagnostičke efikasnosti preoperativnih vrednosti karcinoembriogenog antigena (CEA) kao i karbohidratnog antigena (CA 19-9) kao i parametara sistemske inflamacije u proceni stadijuma bolesti.

**Materijal i metode** U istraživanje je bilo uključeno 523 bolesnika sa histopatološki potvrđenom dijagnozom kolorektalnog karcinoma koji su lečeni na Klinici za digestivnu hirurgiju - Prva hirurška klinika Kliničkog centra Srbije u Beogradu, dok je kontrolnu grupu činilo 400 po uzrastu ( $\pm$  2 godine) i polu uparenih ispitanika, bez verifikovanog malignog oboljenja. Prisustvo delecionijskih polimorfizama GSTM1 i GSTT1 ispitivano je PCR (*engl. polymerase chain reaction*) metodom. Pojedinačni nukleotidni polimorfizmi GST A1 i P1 ispitivani su RFLP (*eng. restriction fragment length polymorphism*) metodom. Biohemijski markeri određivani su elektrohemiluminescentnom analizom (ECL), dok su

parametri sistemske inflamacije određivani električnom impedancom (Coulter princip).

**Rezultati** Povezanost individualnog GST genotipa i rizika za nastanak KRK uočena je kod pacijenata sa *GSTT1-nultim* i *GSTP1-varijantnim* genotipom ( $p=0.050$  i  $p=0.016$ ). Pored toga, statistički značajna povezanost sa rizikom za nastanak KRK uočena je i kod nosilaca kombinacije *GSTP1-varijantnog* i bilo kog od preostala tri GST genotipa. Štaviše, nosioci *GSTM1-nultog/GSTT1-nultog/GSTA1-smanjene aktivnosti/GSTP1-varijantnog* genotipa su u 2.71-puta većem riziku za nastanak KRK u odnosu na pripadnike kontrolne grupe ( $p = 0.037$ ). Nadalje statistički značajna razlika u vrednostima CEA i CA 19-9 uočena je između različitih stadijuma KRK ( $p<0.01$ ), i uočeno je da pacijenti kod kojih postoji uznapredovala bolest imaju vrednosti CEA više od 3.5ng/mL, odnosno vrednosti CA 19-9 više od 5.5 U/ml. Pored toga, pacijenti sa KRK imaju statistički značajno više vrednosti parametara sistemske inflamacije u odnosu na kontrolnu grupu ( $p<0.01$ ).

**Zaključak** GST polimorfizmi imaju značajnu ulogu u procesu nastanka KRK. Dodatno, nosioci kominovanog *GSTM1-nultog/GSTT1-nultog/GSTA1-smanjene aktivnosti/GSTP1-varijantnog* genotipa imaju veću sklonost za nastanak KRK. Biohemijski markeri mogu biti od koristi u postavljanju dijagnoze i ranom prepoznavanju različitih stadijuma KRK, te mogu doprineti ranom otkrivanju i pravovremenom lečenju ovih bolesnika.

**Ključne reči:** glutation transferaze, polimorfizmi, kolorektalni karcinom, karcinogeneza, biohemijski markeri, CA 19-9, CEA, sistemska inflamacija

**Naučna oblast:** Medicina

**Uža naučna oblast:** Molekularna medicina

## Determination of glutathione transferase genetic polymorphisms and biochemical markers in colorectal cancer patients

### Abstract

**Introduction** Glutathione transferases (GSTs) are xenobiotic-conjugating enzymes involved in the detoxification of both heterocyclic aromatic amines and polycyclic aromatic hydrocarbons, widely recognized risk factors for colorectal cancer (CRC) development. Polymorphisms in GSTs often lead to alteration or complete lack of enzyme activity, which might have an effect on CRC carcinogenesis. Adequate diagnosis of CRC development and progression is of great importance. Hence in everyday clinical practice biochemical markers as well as parameters of systemic inflammation are often used.

**Aim** The aim of this study was to investigate GST gene variants as risk factors in patients with CRC, as well as to investigate biochemical markers and parameters of systemic inflammation as tools for assessment of tumor characteristics in newly diagnosed CRC patients.

**Material and methods** A total of 523 CRC patients administered for surgical resection and 400 matched controls were included. Deletion polymorphisms of GSTM1 and GSTT1 were investigated by polymerase chain reaction. Single nucleotide polymorphisms of GST A1 and GSTP1 were investigated by restriction fragment length polymorphism method. Biochemical markers were investigated with electrochemiluminescence, whereas electric impedance was used for assessment of parameters of systemic inflammation.

**Results** The association between GST genotype and risk of CRC development was found in carriers of *GSTT1-null* and *GSTP1-variant* genotypes individually ( $p = 0.050$  and  $p=0.016$ , respectively). Furthermore, statistically significant association was found when combination of *GSTP1-variant* genotype with any of other three common GST genotypes was analyzed with respect to CRC susceptibility. Additionally, patients with combined *GSTM1-null/GSTT1-null/GSTA1 low-activity/GSTP1-variant* genotype showed 2.71-fold increased risk of developing CRC ( $p = 0.037$ ). Moreover statistically significant difference was noted in values of CEA and CA 19-9 in different stages of CRC patients,

suggesting that patients with more advanced disease have CEA values higher than 3.5ng/ml and CA 19-9 values higher than 5.5 U/ml. Likewise patients with CRC had statistically higher values of parameters of systemic inflammation when compared to healthy controls ( $p < 0.01$ ).

**Conclusions** This study supports hypothesis that GST polymorphisms might contribute to the process of CRC development. Additionally, *GSTM1-null/ GSTT1-null/ GSTA1 low-activity/ GSTP1-variant* genotype could be combination of GST genotypes whose carriers are more prone to CRC development. Moreover, biochemical markers as well as parameters of systemic inflammation can be useful in timely diagnosis establishment.

**Keywords** glutathione transferases, polymorphism, colorectal cancer, carcinogenesis, biochemical markers, CA 19-9, CEA, systemic inflammation

**Scientific field:** Medicine

**Scientific subfield:** Molecular medicine



# SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. KOLOREKTALNI KARCINOM.....	2
1.1.1. Epidemiologija kolorektalnog karcinoma.....	2
1.1.2. Etiologija kolorektalnog karcinoma.....	5
1.1.3. Embriologija .....	10
1.1.4. Patofiziologija .....	11
1.1.5. Molekularni markeri.....	14
1.1.6. Biohemijski markeri .....	18
1.1.7. Parametri sistemske inflamacije.....	22
1.1.8. Rano otkrivanje kolorektalnog karcinoma.....	23
1.1.9. Dijagnostika kolorektalnog karcinoma.....	24
1.1.10. Patologija.....	25
1.1.11. Klasifikacija.....	28
1.1.12. Lečenje.....	30
1.1.13. Prognoza.....	32
1.2. GLUTATION TRANSFERAZE (GST).....	34
1.2.1. Metabolizam ksenobiotika pod uticajem GST .....	36
1.2.2. Polimorfizam GST.....	37
1.3. GLUTATION TRANSFERAZE KOD KOLOREKTALNOG KARCINOMA....	40
2. CILJEVI.....	44
3. MATERIJAL I METODE.....	45
3.1. Selekcija ispitanika.....	46
3.2. Pravni i etički preduslovi.....	47
3.3. Materijal.....	47
3.4. Metode.....	47
3.5. Statistička analiza.....	50
4. REZULTATI.....	52
4.1. Demografske karakteristike ispitanika.....	53
4.2. Uloga GST genotipa u riziku za nastanak KRK.....	60
4.3. Preživljavanje.....	71

4.4. Povezanost biokemijskih markera CEA i CA 19-9 sa patohistološkim karakteristikama tumora.....	81
4.5. Parametri sistemske inflamacije kod pacijenata sa KRK.....	86
5. DISKUSIJA.....	92
6. ZAKLJUČCI.....	102
7. LITERATURA.....	105

# 1. UVOD

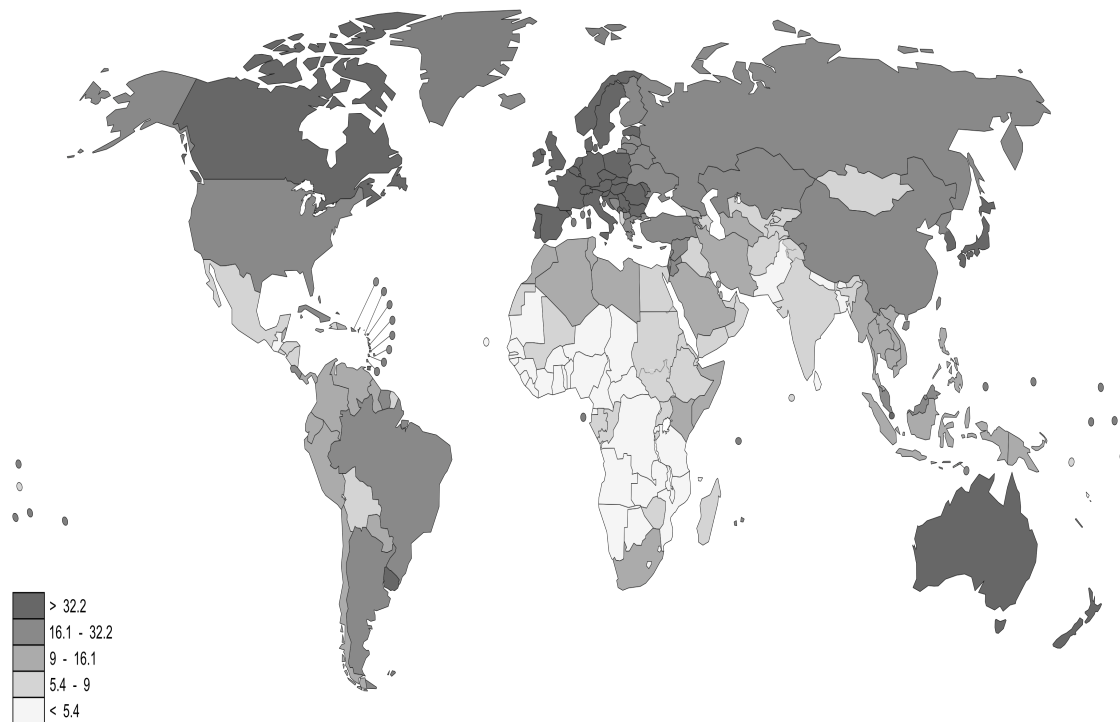
## **1.1. KOLOREKTALNI KARCINOM**

Kolorektalni karcinom (KRK) je najčešći gastrointestinalni karcinom u opštoj populaciji. Iako je u poslednjih par godina zabeležen pad incidence i mortaliteta od KRK, prema podacima „*Globocan*”-a, karcinom kolorektuma je i dalje drugi vodeći malignitet u ženskoj (iza karcinoma dojke) i muškoj populaciji (iza karcinoma pluća) Republici Srbiji. Stopa mortaliteta kod muškaraca je veća za 15%, a kod žena za 19% od stope mortaliteta u zemljama Evropske unije, dok standardizovana stopa mortaliteta u Republici Srbiji iznosi 16,6 na 100,000 (1).

### **1.1.1. EPIDEMIOLOGIJA KOLOREKTALNOG KARCINOMA**

Epidemiološke studije iz 2019 god., beleže da je KRK treći najčešći karcinom u SAD, sa 101.420 novootkrivenih slučajeva karcinoma kolona i 44.190 novootkrivenih slučajeva karcinoma rektuma godišnje (2). Uprkos evidentnom trendu smanjenog obolevanja od ovog maligniteta, Američko udruženje za ispitivanje kancera (AJCC) procenjuje da na globalnom nivou, svake godine od KRK oboli 1.8 miliona ljudi, a da je u 2018. godini KRK bio odgovoran za više od 800.000 smrtnih slučajeva. Uticaj ove bolesti na javno zdravlje ogleda se u podatku da je tokom života 1 od 18 muškaraca i 1 od 20 žena, pod rizikom razvije kolorektalni karcinom (3).

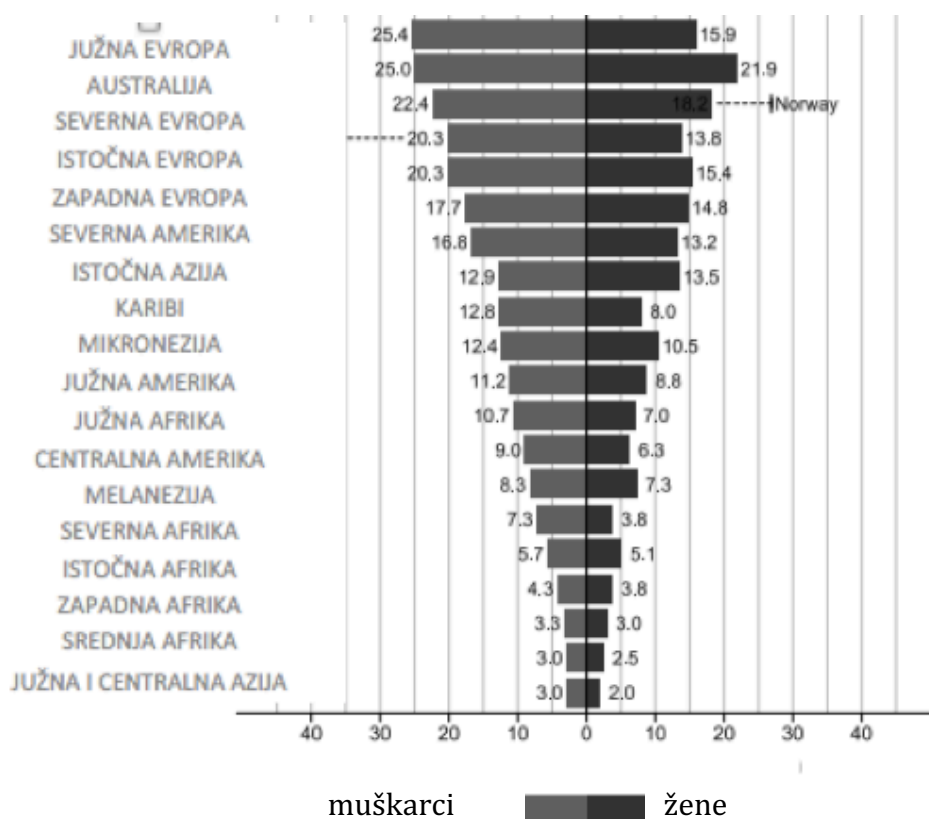
Incidenca obolevanja varira u odnosu na geografsko područje pa je tako najviša u Australiji i Novom Zelandu, (44.8 za muškarce i 32.2 za žene na 100.000 stanovnika), a najniža u Zapadnoj Africi (4.5 za muškarce odnosno 3.8 za žene na 100.000). Nadalje i stopa mortaliteta varira, od centralne i istočne Evrope gde je najviša, do Zapadne Afrike gde se beleži najniža stopa mortaliteta (3) .



**Figura 1.** Geografska distribucija incidence kolorektalnog karcinoma na 100.000 osoba oba pola u celom svetu - GLOBOCAN 2012 (preuzeto sa GLOBOCAN 2012 (IARC), <http://globocan.iarc.fr/>)

Incidenca obolevanja razlikuje se i između afroamerikanaca, belaca i azijata. Naime, viša incidenca zabeležena je kod afroamerikanaca u odnosu na ostale. Epidemiološke studije beleže i da hispano-amerikanci imaju najniže stope obolevanja od ovog maligniteta.

Rizik obolevanja od kolorektalnog karcinoma razlikuje se i u odnosu na primarnu lokalizaciju maligniteta i raste sa godinama starosti, te je proksimalni kolorektalni karcinom, tj. desnostrani karcinom češći kod pacijenata starijih od 65 godina, žena i afroamerikanaca (4).



**Figura 2.** Incidenca karcinoma kolona prema različitim geografskim lokalizacijama razdvojena po polovima; (preuzeto sa GLOBOCAN 2018 (IARC), <http://globocan.iarc.fr/>)

Incidenca proksimalnog (desnostranog) kolorektalnog karcinoma u SAD u periodu između 1999. i 2004. godine (21.8/100.000), bila je veća u odnosu na tumore druge lokalizacije, distalni kolon (13/100.000) i rektum (14.1/100.000) (4).

## **1.1.2. ETIOLOGIJA KOLOREKTALNOG KARCINOMA**

Različiti faktori rizika prepoznati su kod bolesnika sa KRK. Neki od njih kao što su godine i genetski faktori označeni su kao nepromenljivi, ali za razliku od većine drugih maligniteta, kod KRK postoji i značajan uticaj tzv. promenljivih faktora, odnosno faktora sredine koji značajno doprinose nastanku i razvoju ove bolesti.

### **1.1.2.1. Nepromenljivi faktori rizika**

#### **1.1.2.1.1. Godine**

Godine života su prepoznate kao značajan faktor rizika obolevanja od KRK. Verovatnoća obolevanja od KRK raste posle 40 godine, sa više od 90% dijagnostikovanih posle 50-te godine života. S obzirom da je ovaj rizik prepoznat u celom svetu, u našoj zemlji je prema preporukama Svetske zdravstvene organizacije (WHO) u programu ranog otkrivanja („*screening*” eng.) obavezan endoskopski pregled debelog creva u populaciji starijoj od 50 godina (5).

#### **1.1.2.1.2. Inflamatorne bolesti creva**

U inflamatorne bolesti creva spadaju ulcerozni kolitis (UC) i Kronova bolest (KB). Ulcerozni kolitis karakteriše inflamacija mukoze rektuma i kolona, dok Kronova bolest može da zahvati bilo koji deo digestivne cevi i karakteriše je inflamacija koja zahvata sve histološke slojeve creva od mukoze do seroze. Pacijenti sa UK ili KB imaju od 4 do 10 puta veću verovatnoću od obolevanja od KRK-a, te je trogodišnji pregled debelog creva ovih bolesnika obavezan, kako u praćenju osnovne bolesti tako i u programu ranog otkrivanja KRK (5).

#### **1.1.2.1.3. Adenomatozni polipi**

Kolorektalni polipi su prekursorske lezije za nastanak KRK. Smatra se da se oko 95% karcinoma razvije iz prethodno postojećeg polipa, a da sam proces karcinogeneze traje od oko 5 do 10 godina. Samim tim pravovremeno otkrivanje i uklanjanje ovih lezija značajno smanjuje rizik od obolevanja od KRK (6).

#### **1.1.2.1.4. Porodična anamneza**

Iako se najveći broj KRK uočava kod bolesnika bez postojanja porodične anamneze o KRK, pozitivna anamneza predstavlja značajan faktor rizika. Pacijenti sa pozitivnom porodičnom anamnezom imaju 2-3 puta veći rizik za razvoj kolorektalnog karcinoma u toku života. Ovaj rizik je još veći kod pacijenata sa većim brojem obolelih srodnika, kao i kod pacijenata čiji su oboleli srodnici u trenutku postavljanja dijagnoze bili mlađi od 60 godina (7).

#### **1.1.2.1.5. Nasledne bolesti**

Najčešća nasledna oboljenja koja dovode do nastanka KRK su familijarna adenomatozna polipoza (FAP) i hereditarni nepolipozni kolorektalni karcinom (HNPCC) koji se još naziva i Lynch sindrom. Pored toga u prepoznata nasledna oboljenja koja mogu dovesti do nastanka KRK spadaju i Peutz-Jeghers sindrom (PJS), juvenilna polipoza, *MUTYH* polipoza, kao i Krownkit-Kanada sindrom i drugi.

##### **1.1.2.1.5.1.FAP**

Kliničke karakteristike FAP-a podrazumevaju postojanje multiplih adenomatoznih polipa, čiji broj varira u proseku od 100, pa i do 1000 kod nekih bolesnika. Smatra se da polipi nastaju usled mutacije tumor supresorskog gena *APC* (*adenomatous polyposis coli*, eng.). *APC*-om uzrokovana polipoza pretežno se nasleđuje autozomno dominantno, te oko 80% bolesnika ima jednog od roditelja sa FAP. Imajući u vidu prethodni podatak, nameće se zaključak da je apsolutno neophodno genetsko testiranje ovih individua. Najveći broj bolesnika sa FAP-om ukoliko prethodno nije lečen, već u 40-tim godinama života, podvrgava se totalnoj kolektomiji usled maligne alteracije polipa. Dijagnostički kriterijumi za FAP uključuju: postojanje najmanje 100 kolorektalnih adenomatoznih polipa, mutaciju *APC* gena i porodičnu anamnezu za FAP.

Gardnerov sindrom je podvarijanta FAP, gde pacijenti pored FAP imaju i epidermoidne ciste, osteome, dezmoidne tumore i dentalne anomalije. Turcot sindrom je još jedna podvarijanta koja podrazumeva postojanje tumora mozga (8).



#### **1.1.2.1.5.2. HNPCC (hereditarni nepolipozni kolorektalni karcinom)— Lynch sindrom**

HNPCC karakterišu mutacije *MLH1* i *MSH2* gena, koje su takođe povezane sa povećanim rizikom od nastanka drugih karcinoma, poput uterusa, pankreasa, bubrega i uretera, kao i karcinomima želuca i tankog creva. Pacijenti sa Lynch sindromom češće imaju mucinozne, slabo diferentovane karcinome desnog kolona i najčešće se javljaju kod mladih. Dijagnoza Lynch sindroma uspostavlja se nakon ispunjavanja Amsterdamski kriterijuma i revidiranih Bethesda kriterijuma (8).

#### **1.1.2.1.5.3. Peutz-Jeghers sindrom**

Peutz-Jeghers sindrom je autozomno dominantno oboljenje koje karakteriše postojanje hamartoznih polipa gastrointestinalnog trakta, pigmentovane mukokutane promene i povećan rizik kako od gastrointestinalnih tako i drugih maligniteta. Kumulativni rizik od nastanka KRK je oko 40%, ali i dalje je predmet ispitivanja da li maligna transformacija nastaje od hamartoznih polipa, s obzirom da se njihova displazija izuzetno retko sreće. Kod ovih bolesnika uočava se mutacija gena *STK11* (8).

#### **1.1.2.1.5.4. Juvenilna polipoza**

Dijagnoza juvenilne polipoze podrazumeva prisustvo:5 juvenilnih polipa u kolonu i rektumu, juvenilne polipe u čitavom gastrointestinalnom traktu ili bilo koji broj juvenilnih polipa u gastrointestinalnom traktu i pozitivnu porodičnu anamnezu. Slično PJS i juvenilna polipoza se nasleđuje autozomno dominantno, a kumulativni rizik od nastanka KRK je oko 40%. Međutim u ovim polipima za razliku od PJS, često se uočava displazija, a 50% bolesnika ima mutaciju *SMAD4* ili *BMPR1A* gena (8).

#### **1.1.2.1.5.5. MUTYH-povezana polipoza (MAP)**

*MUTYH*-povezana polipoza (MAP) je autozomno recesivna polipoza koja nastaje usled mutacije *MUTYH* gena. *MUTYH* kodira BER enzim odgovoran za sprečavanje mutacija koje se dešavaju usled oksidativnog oštećenja dezoksiribonukleinske kiseline (DNK). Pacijenti sa MAP najčešće imaju više od 10 sinhronih kolorektalnih adenoma i nekoliko stotina polipa (8).

#### **1.1.2.1.5.6. Seratna polipoza**

Izuzetno retko oboljenje, koje je ranije bilo poznato pod nazivom hiperplastična polipoza, ali je po novoj klasifikaciji WHO preimenovano u seratnu polipozu. Karakterišu ga multipli seratni polipi kolona, a dijagnoza se postavlja ako se nađe: 5 i više seratnih polipa proksimalno od sigmoidnog kolona, od kojih su 2 veća od 10mm, seratni polipi proksimalno od sigmoidnog kolona kod osoba koje imaju prvu generaciju srodnika sa seratom polipozom, više od 20 seratnih polipa bez obzira na veličinu (8).

### **1.1.2.2. Faktori rizika spoljašnje sredine**

KRK spada u grupu karcinoma gde postoji veliki broj prepoznatih faktora sredine koji doprinose njegovom nastajanju, te se u teoriji veliki broj obolelih, može vremenom smanjiti nakon modifikacije životnog stila.

#### **1.1.2.2.1. Ishrana**

Brojne studije pokazale su da ishrana ima uticaj na rizik od obolevanja od KRK, te da modifikacija ishrane može da dovede do smanjenja rizika od obolevanja za čak 70%. Ishrana bogata mastima, kao i crvenim mesom navodi se kao značajan faktor rizika za nastanak ove bolesti. Takođe ishrana siromašna voćem i povrćem predstavlja dodatan faktor rizika za nastanak KRK-a (6).

#### **1.1.2.2.2. Fizička aktivnost**

Nekoliko studija ukazuje je da redovna fizička aktivnost i zdrava ishrana doprinose smanjenju rizika obolevanja od KRK-a. Nedostatak fizičke aktivnosti i kod žena i kod muškaraca, povezan je sa postojanjem gojaznosti koja je takođe prepoznata kao faktor rizika za KRK. Sa porastom BMI (body mas index, eng.) za jednu jedinicu, rizik od KRK raste za 2-3%. Nivo estrogena, smanjena insulinska senzitivnost, smatraju se odgovornim za povećanje rizika od maligniteta kod gojaznih (9).

#### **1.1.2.2.3. Pušenje**

Rezultati različitih istraživanja ukazuju da je pušenje faktor rizika za nastanak KRK-a te da je oko 12% mortaliteta od KRK povezano sa pušenjem. Duvanski dim je prepoznat kao faktor rizika za nastanak, ali takođe i faktor koji utiče na brzinu razvoja i rasta polipa koji su prekursori karcinoma. Veliki polipi lokalizovani u kolonu i rektumu povezani su sa višegodišnjim pušenjem. Takođe rezultati brojnih istraživanja pokazuju da se KRK javlja kod pušača značajno ranije nego u nepušača (8).

#### **1.1.2.2.4. Alkohol**

Kao značajan faktor rizika u procesu karcinogeneze KRK prepoznat je i alkohol. Najpre, kao direktni karcinogeni smatraju se acetaldehidi koji nastaju u procesima degradacije alkohola. Pored toga, alkohol je prepoznat kao indirektan faktor rizika u procesu karcinogeneze KRK, gde se uočava jasna interakcija alkohola i duvanskog dima. Naime duvanski dim dovodi do mutacija DNK koje se, pre svega zbog prisustva alkohola, ne gube. Takođe alkohol olakšava penetrantnost drugih karcinogenih molekula u ćelije mukoze i na taj način doprinose procesu nastanka KRK. Osobe koje hronično konzumiraju alkohol imaju manjak esencijalnih mikronutrijenata koji takođe doprinose procesu karcinogeneze (9).

### **1.1.3. EMBRIOLOGIJA**

Smatra se da desna strana kolona (cekum, ascendentni kolon, proksimalne 2/3 transverzalnog kolona), vodi poreklo od srednjeg creva, dok leva strana kolona (1/3 transverzuma, descedentni kolon, sigma i rektum) vodi poreklo od zadnjeg creva. Ova razlika u embrionalnom poreklu je dalje naglašena i dualnom vaskularizacijom kolona. Prethodnim istraživanjima potvrđeno je da tumori desnog i levog kolona imaju različite epidemiološke, histološke, genetske karakteristike kao i različito biološko ponašanje.

Opisane su razlike u molekularnoj biologiji tumora koji nastaju iz različitih segmenata debelog creva, te se smatra da distalni tumori kolona imaju veću frekvenciju gubitka funkcije p53, aneuploidije i hromozomske nestabilnosti, dok su proksimalni tumori kolona mucinozni, diploidni i imaju *MSI* fenotip (10).

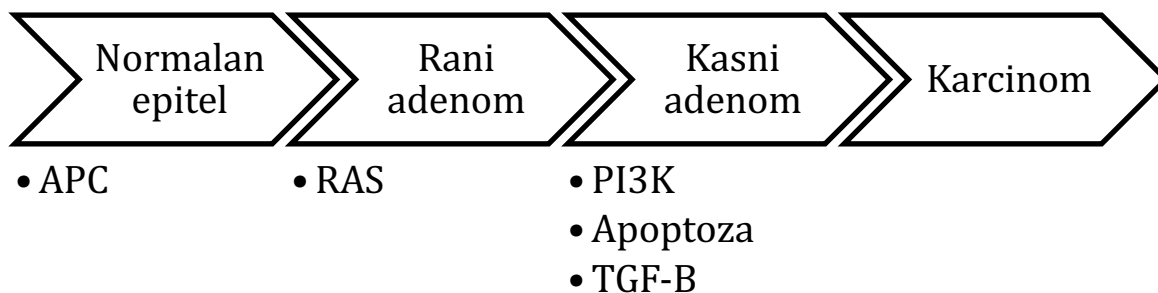
#### 1.1.4. PATOFIZIOLOGIJA

KRK je heterogena bolest gde akumulacija genetskih i epigenetskih promena dovodi do progresije normalnog epitela kolona do invazivnog malignog tumora. U patofiziologiji KRK opisana su tri različita molekularna puta genomske nestabilnosti. U to spadaju put hromozomske nestabilnosti (CIN), DNA mismatch repair put (MMR) koji je u vezi sa epifenomenom mikrosatelitske nestabilnosti i epigenomska nestabilnost ili CpG hipermetilacija (CIMP) (11).

##### 1.1.4.1. Molekularni putevi kancerogeneze

###### 1.1.4.1.1. CIN

Javlja se u oko 60-70% sporadičnih KRK i karakteriše ga dobitak ili gubitak celih ili velikih segmenata hromozoma i anomalije kariotipa. CIN fenotip je smatran klasičnim modelom KRK karcinogeneze originalno predložene od strane Fearon-a i Volgenštajna (12).



**Figura 3.** Vogelgram predložen od strane Fearona i Volgenštajna

U ovom modelu, incijalna mutacija, inaktivacija tumor supresora *APC* je praćena aktivacijom *KRAS* protoonkogenom, što postepeno dovodi do daljih genskih defekata koji uključuju mutacije *TGF-β*, *PIK3CA*, *TP53*, i gubitak 18q (uključujući *DCC*, *SMAD4*, *SMAD2*) (13). Pozitivni CIN status je udružen sa značajno lošijim ishodom kod svih pacijenata, uključujući one u stadijumu II i III KRK.

#### **1.1.4.1.2. Mikrosatelitska nestabilnost**

Određeni broj kolorektalnih karcinoma karakteriše defekt u DNK *mismatch repair* sistemu (MMR). Deficijentni MMR dovodi do izmenjene dužine kratkih nukleotidnih repetitivnih sekvenci u tumorskoj DNK u poređenju sa normalnom DNK, i taj fenomen se naziva mikrosatelitska nestabilnost (MSI). MSI se uglavnom procenjuje evaluacijom 5 mikrosatelitskih markera (*D2S123*, *D5S346*, *D17S250*, *BAT25*, *BAT 26*).

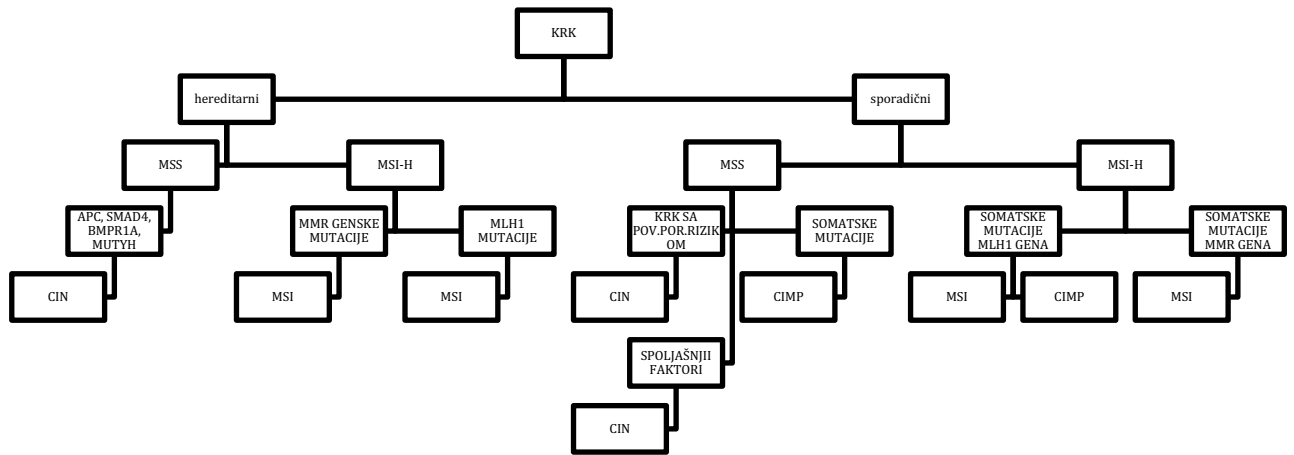
Termin MSI, kada nije drugačije označen opisuje "*high frequency MSI*" (MSI-H) gde je više od 30% markera izmenjeno mutacijom, što je definisano Bethesda protokolom (14), i ovi tumori se posmatraju kao poseban kliničko-patološki entitet. Kolorektalni tumori gde je jedan marker ali manje od 30% mikrosatelitskih markera izmenjeno mutacijom nazivaju se "*low frequency MSI*" (MSI-L) i imaju isti genotip i fenotip kao mikrosatelitski stabilni tumori (MSS).

Defekti u MMR sistemu mogu da nastanu preko naslednih genetskih mutacija ili preko stečenih epigenetskih fenomena, koji najčešće nastaju starenjem. Mutacije bilo kojeg od MMR gena (*MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS2*) prepoznate su kod većine HNPCC. Aproksimativno 15% sporadičnih KRK pokazuju MSI-H zbog bilateralnog utišavanja *MLH1* genske ekspresije preko hipermetilacije promotora (10). Sporadični MSI KRK ima različitu patologiju i kliničke karakteristike u poredjenju sa tumorima koji nastaju klasičnim CIN putem.

Histološki to su slabo diferentovani, mucinozni adenokarcinomi sa peritumorskom limfocitnom infiltracijom. Ovi tumori se češće nalaze kod starijih, žena, i u desnom kolonu. Prognostički značaj MSI kod KRK je detaljno ispitivan i prihvaćena kao prognostički faktor (15).

### 1.1.4.1.3. Aberanti DNK metilacioni put

Transkripciono "utišavanje" tumor supresora preko metilacije citozina promotorskih CpG regiona se često viđa kod karcinoma. Globalna promotorska hipermetilacija poznatija kao CpG metilator fenotip ili CIMP je opisana kao podtip KRK. Promotorska hipermetilacija može da se odigra kako na genima koji nemaju ulogu u razvoju kancera, "metylated in tumor" MINT, tako i na tumor supresorima p16, IGF-2, kao i kod gena *MLH1* i *MGMT* (16).



**Figura 4.** Putevi karcinogeneze kod kolorektalnog karcinoma (adaptirano prema GLOBOCAN 2012 (IARC), <http://globocan.iarc.fr/>)

### **1.1.5. MOLEKULARNI MARKERI**

Poslednjih godina, beleži se značajno poboljšanje u pogledu pravovremenog otkrivanja KRK, ali i adekvatnog lečenja ovih bolesnika. Tome je značajno doprinelo otkrivanje različitih molekularnih markera. Novi molekularni markeri omogućili su individualizaciju terapije povećavajući efikasnost hemioterapeutika i istovremeno smanjući neželjena dejstva istih, kao i pravovremenu promenu terapije.

#### **1.1.5.1. APC**

*APC* gen nalazi se na hromozomu 5q21, a inaktivacija ovog tumor supresora smatra se inicijalnim događajem u procesu KRK kancerogeneze, orginalno predloženom od strane Fearon-a i Volgenstein-a. Najvažnija funkcija *APC* genskog produkta je da posreduje u proteolitičkoj degradaciji B katenina, kinaze esencijalne za WNT signalni put intestinalnog epitelijskog rasta i diferencijacije. *APC* mutacije u sporadičnom KRK često se viđaju i smatraju se ranim događajem u nastanku i razvoju tumora. Iako 80% mutacija čine upravo mutacije opisane u FAP-u, 18% mutacija posledica su hipermetilacije promotora *APC* i njegove inaktivacije. *APC* inaktivacija udružena je sa tumorima koji pokazuju hromozomsku nestabilnost CIN-a, a u značajno manjoj meri udružena je sa MSI-H fenotipom (17).

#### **1.1.5.2. TP53**

*TP53* gen, lokalizovan na hromozomu 17p, je jedan od najčešće analiziranih gena u kancerogenezi KRK. Mutiran je u 40-50% slučajeva KRK i smatra se kasnim događajem karcinogeneze (18). Inaktivacija ovog gena nastaje mutacijom na jednom od alela i gubitkom preostalog *wildtype* gena (LOH). Većina mutacija na *TP53* su tačaste mutacije koje najčešće dovode do nuklearne akumulacije inaktivnog proteina koji može biti detektovan imunohistohemijom. Dve metode za detekciju *TP53* mutacije su DNK analiza ili imunohistohemijska detekcija prekomerne ekspresije p53 proteina. *Wildtype* p53 protein smatra se tumor supresorom sa višestrukim funkcijama u kontroli ćelijskog rasta i ćelijskog ciklusa,



takođe ima centralnu ulogu u zaštiti genoma od DNK oštećenja te se popularno zove i "čuvar genoma" (19).

### **1.1.5.3. EGFR**

EGFR je transmembranski glikoprotein, član porodice humanih epidermalnih faktora rasta (HER-erbB), koji spadaju u grupu receptorskih tirozin kinaza (20). EGFR ima šest velikih liganda koji se eksprimiraju u različitim stepenu u različitim tkivima: heparin vezujući EGF, transformišući faktor rasta  $\alpha$ , betacelulin, amfiregulin, heregulin i EGF. Uključen je u aktivaciju brojnih onkogenih signalnih puteva uključujući RAS-RAF-MAPK, PI3K/Akt fosfolipaza C i signalni transducer i aktivator transkripcije (STAT)ni src/Fak puteva. Ovi putevi su pokazali da imaju značajnu ulogu u proliferaciji tumora, angiogenezi i ćelijskom preživljavanju. EGFR je važan kao terapijski target u metastatskom KRK i aberantna aktivacija signalnih puteva nishodno do EGFR ima ključnu ulogu u KRK patogenezi i mehanizmu restencije na antiEGFR monoklonska natitela etuximab i panintumubab (20). Disregulacija EGFR aktivacije može se desiti preko mutacija ili amplifikacije gena. Dok su somatske EGFR mutacije opisane u karcinomu pluća, ovi genski defekti su retki u KRK.

### **1.1.5.4.KRAS**

*KRAS* kodira KRAS protein, koji spada u porodicu RAS proteina, G proteina, koji učestvuju u kaskadi signala iniciranih vezivanjem liganda za različite ćelijske resceptore (21). Aktiviran, KRAS vezuje GTP i aktivira brojne signalne proteine uključujući RAF, BRAF, mTOR, MEK, ERK i PIK3CA, što rezultira ekspresijom faktora rasta, diferencijacije, i proliferacije. KRAS poseduju GTP-aznu aktivnost kojom hidrolizuje GTP u GDP. Mutacije *KRAS* karakteristične su za KRK sa CIN i prate klasičnu adenom-karcinom sekvencu karcinogeneze predloženu od strane Volgenstein-a (21). Mutacije *KRAS* gena dešavaju se u 35-45% slučajeva KRK i udružene su sa agresivnijim tumorima, i smatra se da se dešavaju na početku karcinogeneze.

#### **1.1.5.5. BRAF**

BRAF onkogen je serin/treonin kinaza, nishodni efektor KRAS-a u EGFR zavisnoj signalnoj kaskadi. Aktivirani KRAS fosforiliše i aktivira BRAF, povećavajući ekspresiju ciklina D1-3, mdm2 i c-myc i time pospešuje ćelijski rast, i inhibiše apoptozu. BRAF mutacije se javljaju u 5-10 % sporadičnog KRK i aktiviraju kaskadni put KRK tumorigeneze, i a često su udružene sa MSI (21). Najčešće zabeležena BRAF mutacija je supstitucija aminokiseline valin, aminokiselinom glutamin. Mutacije BRAF onkogene su jedinstvene samo za sporadični KRK. Ove mutacije su češće u kolonu nego u rektumu i povezane su sa epigenetskim utišavanjem jednog od MLH1, što rezultuje u MSI-H fenotipom. Takođe ove BRAF mutacije udružene su sa CpG hipermetilacijom, proksimalnim tumorima, i češće su kod starijih žena (22).

#### **1.1.5.6. NRAS**

NRAS mutacije pronalaze se u manje od 3% pacijenata sa KRK. NRAS ima ulogu u signalnim putevima, slično KRAS, s tim što vrši supresiju apoptoze, a mutacije se dešavaju značajno kasnije u KRK tumorigenezi. Mutacije su najčešće na kodonima 2,3, 12, 13 i 61 (22).

#### **1.1.5.7.PI3KCA/PTEN**

PIK3CA je član porodice fosfatidil-inozitol 3 kinaza, i mutiran je u 9-32% pacijenata sa KRK. Aktiviran PIK3CA promoviše ćelijsku proliferaciju, motilitet i ćelijsku invaziju preko aktivacije AKT i PDK1. EGFR receptor takođe aktivira PI3K/AKT put, i dva važna onkogene efekta u kolorektalnom karcinomu uključuju PI3KCA mutacije i gubitak PTEN ekspresije. Aktivirajuće mutacije PIK3CA p110 dešavaju se kod 10-15% KRK sa sa predominacijom na egzonima 1, 2, 9 i 20. Veća učestalost PI3KCA mutacije uočena je kod žena i tumora proksimalnog kolona (23). PTEN je fosfatidil-inozitol 3 fosfataza, koja je antagonist PIK3CA, tumor supresorski gen gde se somatske mutacije dešavaju se u 9-42% bolesnika sa KRK. Inaktivirajuće mutacije primarno uključuju epigenetsko utišavanje promotorskog

regiona. PI3K3CA i PTEN mutacije su uzajamno isključujuće iako svaka od mutacija može da koegzistira sa KRAS ili BRAF mutacijama (25).

#### **1.1.5.8.VEGF (*vascular endothelial growth factor*)**

Angiogeneza ima izuzetno važnu ulogu u formiranju i progresiji tumora, te se VEGF smatra potentnim medijatorom formiranja novih krvnih sudova. Veliki broj mikrovaskulature i pojačana ekspresija VEGF povezuje se sa agresivnim biološkim tokom, povećanim rizikom od metastaza i lošom prognozom bolesnika sa KRK (21).

#### **1.1.5.9. TS (Timidilat sintaza)**

TS katalizuje jedan od koraka u DNK sintezi i glavna je molekulska meta za 5-fluorouracil (5-FU), što je osnov sistemske hemioterapije. Visoka ekspresija TS je asociirana sa lošim odgovorom na 5-FU hemoterapiju i lošom prognozom (21).

#### **1.1.5.10.Drugi molekularni markeri**

Markeri proliferacije (Ki-67), regulatori ćelijskog ciklusa (p21), regulatori apoptoze (Bcl-2), survivin, i globalni tanskripcioni faktor (NF-kB) se trenutno ispituju u predikciji i prognozi pacijenata sa KRK.

### **1.1.6. BIOHEMIJSKI MARKERI**

Biohemijski markeri imaju izuzetno važnu ulogu u pravovremenom otkrivanju i praćenju bolesnika sa KRK u svakodnevnoj kliničkoj praksi. U nizu markera, svoje mesto u svakodnevnoj upotrebi našli su karcinoembriogeni antigen (CEA) i karbohidratni antigen (CA 19-9).

#### **1.1.6.1.CEA**

Karcinoembriogeni antigen (CEA) je u strukturi glikoprotein velike molekularne mase i jedan od najčešće korišćenih biohemijskih markera u svakodnevnoj kliničkoj praksi kod pacijenata sa KRK (26). Prvi put iskorišćen 1965. godine od strane Golda i Freedmana, serumski karcinoembriogeni antigen danas je najčešće korišćen tumorski marker u dijagnostici i praćenju kolorektalnog karcinoma, sa senzitivnošću koja varira oko 74%. Vezan je za ćelijsku membranu glikozil-fosfatidil-inozitolskim glikoproteinom i može se osloboditi u vidu solubilnog molekula delovanjem fosfolipaze C i D. CEA ima funkciju međućelijskog adhezionog molekula, koji sintetišu ćelije debelog creva. Kod pacijenata sa KRK, ovaj molekul ima ulogu u promovisanju nagomilavanja tumorskih ćelija. Ispitivanje CEA je značajno kod preoperativnog dijagnostikovanja i utvrđivanja stadijuma tumora, kod hirurškog planiranja i prognoziranja bolesti, kao i kod pojave recidiva KRK nakon hirurške resekcije tumora.

Povišene vrednosti ovog markera se retko uočavaju u ranim stadijumima KRK, međutim ukoliko se uoče najčešće ukazuju na značajno lošiju prognozu ovih bolesnika (27). Istraživanja su pokazala da postoji značajan broj obolelih od KRK sa nižim ili normalnim nivoom CEA u serumu i u fazi progresije ili čak relapsa tumora. Smanjena ekspresija CEA u serumu može da se javi kod slabe diferencijacije tumorskih ćelija i ukazuje na lošiju prognozu bolesti, sa većom šansom za razvoj metastaza na plućima i u jetri. Upotrebu CEA ograničava ograničena specifičnost za KRK, s obzirom da se povišene vrednosti mogu uočiti i kod bolesnika sa različitim drugim oboljenjima. Vrednost CEA u serumu je značajno viša kod prekanceroznih promena mukoze debelog creva. Tako pacijenti sa inflamatornim bolestima creva

(ulcerozni kolitis, Kronova bolest), pankreatitisom, hroničnom opstruktivnom bolesti pluća, hepatitisom, cirozom jetre, hipotireozom mogu imati povišene vrednosti ovog markera. Takođe više vrednosti nego u opštoj populaciji beleže se kod zdravih pušača, te su predložene drugačije referentne vrednosti kod ove populacije (28).

#### **1.1.6.2. CA 19-9**

Karbohidratni antigen (CA 19-9) je glikoprotein velike molekularne mase koji je svoje mesto u svakodnevnoj upotrebi našao kod bolesnika sa karcinomima želuca, pankreasa, kao i KRK. Iako je nespecifičan za KRK, različita istraživanja su ukazala da istovremeno analiziranje CA 19-9 i CEA može da poveća dijagnostičku senzitivnost kod ovih bolesnika. Naime, KRK je biohemijski i molekularno heterogena bolest, te je moguće da tokom razvoja bolesti ćelije sintetišu različite molekule koji se mogu ponašati kao tumorski markeri. CA 19-9 kao i CEA takođe je međućelijski adhezioni molekul (29).

#### **1.1.6.3. CA 125**

Karbohidratni antigen 125 (CA 125, mucin 16) je glikoprotein kodiran na genu MUC16. Prvi put su ga opisali Bast i autori 1981. godine i predstavlja tumor marker koji se najčešće koristi kod dijagnostikovanja karcinoma ovarijuma. Međutim, CA 125 može biti povišen kod neoplazmi peritoneuma, pleure, perikarda, epitela jajovoda, endometrijuma, endocerviksa. Novija istraživanja su ukazala na povišen nivo CA 125 kod tumora gastrointestinalnog trakta, kao što su karcinom želuca i kolona, i kod njihove peritonealne diseminacije (30).

#### **1.1.6.4. CA 50**

CA50 spada u grupu novih tumor markera koji se otkriva pomoću C50 antitela dobijenog imunizacijom miševa sa ćelijama kolorektalnog adenokarcinoma čoveka. CA50 ne spada u grupu specifičnih biomarkera, te se njegova povišena vrednost u serumu može videti kod različitih maligniteta, najčešće kod gastrointestinalnih tumora. U kliničkim ispitivanjima, CA 50 ukazuje

na patološke promene pankresa, slično tumor markeru CA 19-9, ali se u kombinaciji sa drugim biomarkerima može koristiti za evaluaciju pacijenata sa kolorektalnim, hepatobilijarnim i želudačnim karcinomima (30).

#### **1.1.6.5. Humani horionski gonadotropin - hCG**

hCG predstavlja glikoproteinski hormon koga tokom trudnoće proizvodi rastući embrion, a kasnije posteljica. U nekoliko istraživanja je primećen porast koncentracije ovog biomarkera kod bolesnika oba pola sa KRK. Prisustvo pozitivnih hCG tumorskih ćelija se povezuje sa lokalnom infiltracijom tumora, infiltracijom regionalnih limfnih čvorova i prisutnim lokalnim i udaljenim metastatskim promenama, što za posledicu ima smanjeno preživljavanje obolelih od KRK (31).

#### **1.1.6.6. $\beta$ -1,4-galaktoziltransferaza IV**

$\beta$ -1,4-galaktoziltransferaza IV pripada familiji glikoziltransferaza odgovornih za biosintezu N-acetilaktozamina. Povećane vrednosti ovih molekula se mogu javiti kod različitih maligniteta. Kod obolelih od KRK prekomerna ekspresija  $\beta$ -1,4-galaktoziltransferaze IV se povezuje sa pojavom metastaza i lošim sveukupnim stepenom preživljavanja. Senzitivnost ovog markera za predviđanje 5-godišnjeg preživljavanja je 85%, a specifičnost 48%. Njegovim detektovanjem se može pomoći u izboru pacijenata obolelih od KRK kod kojih postoji visok rizik od metastaza, kako bi se pristupilo agresivnijem lečenju i terapiji (32).

#### **1.1.6.7. Galektin 3 - GAL3**

Galektin 3 je multifunkcionalni lektin vezujući  $\beta$ -galaktozid koji se nalazi na površini i unutrašnjosti inflamatornih i epitelnih ćelija. Učestvuje u nekoliko ćelijskih procesa kao što su proliferacija i diferencijacija ćelija, inflamacija, rast i metastaze tumorskih ćelija. GAL3 biomarker se može ispitivati iz seruma i fecesa i njegove povišene vrednosti kod obolelih od KRK ukazuju na nizak stepen diferencijacije tumorskog tkiva i napredni TNM stadijum bolesti. Prednost GAL3 u

odnosu na druge tumorske markere i antiinflamatorne citokine, je mogućnost da ukaže na invaziju tumorskih ćelija u okolno tkivo, prisustvo udaljenih metastaza i na lošu prognozu bolesti (33).

#### **1.1.6.8. Karbohidratni antigen CA-242**

CA-242 je tumor marker dobijen imunizacijom miševa humanim ćelijama KKK, COLO 205. Povišene vrednosti CA-242 u serumu se mogu videti kod KKK kao i kod pacijenata sa karcinomom pankreasa. Rano otkrivanje tumora predstavlja izazov obzirom da povišene vrednosti dostupnih ispitivanih tumorskih markera najčešće postoje kod uznapredovalih stanja ili recidiva karcinoma. Međutim, novija istraživanja ukazuju na značaj CA-242 u serumu kod ranog otkrivanja KKK-a, čija senzitivnost iznosi 39%, a specifičnost 87%. Istovremeno određivanje CA242 i CEA povećava senzitivnost u svim stadijumima bolesti (Dukes A-C), kao i prognostički značaj obolelih od KKK-a (34).

### **1.1.7. PARAMETRI SISTEMSKE INFLAMACIJE**

Brojna istraživanja ukazuju na značaj inflamacije u procesu karcinogeneze kolorektalnog karcinoma. Naime hronična inflamacija utiče na sve stadijume razvoja tumora. Uticaj hronične inflamacije na razvoj karcinoma najpre je opisan kod bolesnika sa inflamatornim bolestima creva. Ranija istraživanja ukazuju da bolesnici sa inflamatornim bolestima creva imaju značajno veću verovatnoću obolevanja od KRK u odnosu na opštu populaciju. U prilog teoriji da hronična inflamacija ima ulogu u karcinogenezi KRK, govori i podatak da lekovi koji imaju uticaj na inflamaciju (nesteroidni antiinflamatorni lekovi, NSAID) smanjuju rizik od obolevanja, ali i progresije bolesti. Različiti biomarkeri koriste se u proceni sistemske inflamacije. U svakodnevnoj kliničkoj praksi parametri poput C-reaktivnog proteina (CRP), odnos neutrofila i limfocita u leukocitarnoj formuli (NLR) kao i odnos trombocita i limfocita (PLR) mogu pružiti značajne informacije o postojanju sistemske inflamacije. Prethodna istraživanja pokazala su da povišene vrednosti NLR i PLR ukazuju na lošu prognozu i smanjeno preživljavanje kod različitih karcinoma uključujući i KRK (35). Promene u broju krvnih ćelija u perifernoj krvi, kao što su trombocitoza, limfopenija i neutrofilija se vrlo često viđaju u sistemske inflamaciji kao i kod bolesnika sa uznapredovalom malignom bolešću. Neutrofili imaju značajnu ulogu u razvoju tumora s obzirom da imaju uticaj na angiogenezu jer se u njima odvija sinteza različitih hemokina, faktora rasta i proteaza. Nasprot tome limfociti imaju ulogu u sprečavanju nastanka, rasta i razvoja tumora jer sekretuju antitumorske molekule. Stoga, smanjen broj limfocita korelira sa značajno lošijom prognozom malignih bolesnika (36). Trombociti su metabolički i enzimski aktivni u sistemske inflamaciji i imaju visok protrombotski potencijal. Srednji volumen trombocita (MPV) određuje stepen stvaranja trombocita. Povišen MPV susreće se kod različitih tumora, kao što su hepatocelularni karcinom, karcinom pankreasa i KRK (37).



### **1.1.8. RANO OTKRIVANJE KOLOREKTALNOG KARCINOMA**

S obzirom da pacijenti sa ranim KRK najčešće nemaju simptome, izuzetno važnu ulogu u pravovremenom postavljanju dijagnoze ima skrining. Treba uzeti u obzir da je ovo jedan od najčešćih maligniteta u opštoj populaciji kao i da pretklinička faza dugo traje, što omogućava rano otkrivanje. U svakodnevnoj upotrebi kao metoda skrininga koristi se test na okultno/skriveno krvarenje, koji predstavlja ispitivanje fecesa na krvarenje iz gastrointestinalnog sistema koje nije vidljivo golim okom. Test na okultnu krv u stolici (FOBT) je skrining test koji se može koristiti za prevenciju i rano otkrivanje tumora debelog creva. Pozitivan nalaz krvi u stolici se javlja kod mnogih gastrointestinalnih oboljenja, ali je njegovo ispitivanje najznačajnije kod KRK ili polipoznih promena većih od 1cm, što dalje indikuje kolonoskopsko ispitivanje u cilju dijagnostike i lečenja (27).

Do danas zvanične preporuke Evropsko udruženje za medicinsku onkologiju (ESMO) preporučuju jednom godišnje fekalni test na okultno krvarenje muškarcima i ženama od 50 do 74 godine. Danas se sve češće u praksi koristi fekalni imunohistohemijski test (FIT) pre svega zbog jednostavnije upotrebe ali i zbog značajno više senzitivnosti i automatske analize (38). Takođe ESMO savetuje fleksibilnu sigmoidoskopiju u istom razdoblju kao i FOBT. Totalna kolonoskopija sa terminalnom ileoskopijom se takođe preporučuje u skriningu u zemljama koje imaju zdravstveni sistem koji to može da omogući. CT kolografija, video kapsula i DNK stolice i dalje se ne preporučuju kao skrining tetsovi u opštoj populaciji.

### **1.1.9. DIJAGNOZA KOLOREKTALNOG KARCINOMA**

Simptomi KRK su nespecifični i najčešće se javljaju kod relativno velikih tumora i u uznapredovalim stadijumima bolesti. Promene u crevnom pražnjenju, difuzni ili lokalizovani bolovi u trbuhu, gubitak na telesnoj težini, slabost, malaksalost najčešći su simptomi koji se javljaju kod bolesnika sa ovim malignitetom. Zlatni standard u postavljanju dijagnoze KRK i danas je endoskopija. Totalna kolonoskopija sa terminalnom ileoskopijom savetuje se kod svih bolesnika kod kojih postoji sumnja o postojanju KRK. Kolonoskopijom se tačno utvrđuje lokalizacija promene, postojanje sinhronih promena ili prekanceroznih promena u vidu polipa. Takođe kolonoskopijom se mogu uzeti uzorci tkiva biopsijom i na taj način histološki potvrditi postojanje maligne bolesti i eventualno dalje molekularno imunohistohemijski dijagnostikovati. Kolonoskopija je jedina skirning metoda kojom se obezbeđuje i dijagnostikovanje ali i lečenje. Uklanjanje adenoma, tj polipektomija je smanjila mortalitet od KRK za više od 50%. Danas se u postavljanju dijagnoze KRK vrlo uspešno koristi i video kapsula. Zbog izuzetno visokih troškova kapsula se koristi kod bolesnika kod kojih zbog anatomskih malformacija nije moguće uraditi totalnu kolonoskopiju kao i kod nemotivisanih, dok je kontraindikovana kod sumnje na postojanje bilo kakve opstruktivne promene.

Ukoliko zbog pridruženih komorbideta bolesnika nije moguće uraditi totalnu kolonoskopiju, savetuje se CT kolografija ili neka druga od radioloških metoda. Kontrolna kolonoskopija nakon hirurške resekcije KRK savetuje se 3-6 meseci od operacije (27).

### **1.1.10. PATOLOGIJA**

Makroskopske karakteristike KRK zavise od stadijuma bolesti i lokalizacije tumora. Tumori proksimalnog (desnog) kolona najčešće se javljaju kao polipoidne ili egzofitne fungalne mase, što je udruženo sa nižim stadijumom tumora, nižim rizikom od hematogenog širenja i boljom prognozom. Tumori koji zahvataju distalni (levi) kolon, su najčešće anularni i prave izgled "apple core", dovode do opstrukcije, što predstavlja klinički marker loše prognoze.

#### **1.1.10.1. Adenokarcinom**

Iako su adenomi prekursorne lezije za sve KRK i čine najveći broj kolorektalnih karcinoma (85-90%) oni se razvijaju u različite histološke oblike sa različitim stepenom invazije i progresije. Adenokarcinome karakteriše postojanje glandularnih struktura, što je dalja osnova za utvrđivanje stepena diferencijacije. Dobrodiferentovani tumori imaju preko 95% glandularnih struktura, srednje diferentovani od 50-95% dok loše diferentovani imaju manje od 50% glandularnih struktura (39). Opisani su različiti subtipovi karcinoma: mucinozni, *signet ring cell*, medularni, mikropapilarni, seratni, kribriiformni-komedo tip, adenoskvamozni, vretenastih ćelija i nediferentovani. Prva tri tipa najčešće se sreću u kliničkoj praksi, dok se ostali subtipovi sreću izuzetno retko.

#### **1.1.10.2. Mucinozni i *Signet ring cell* karcinomi**

Mucinozni i *Signet ring cell* (pečatoliki) tumori su srodni subtipovi KRK adenokarcinoma sa izraženom mucinoznom sekrecijom. Po kriterijumima 50% ili više mucinozne komponente je neophodno za dijagnozu mucinoznog karcinoma, i oni broje oko 11-17% KRK. Mucinozni karcinomi su najčešće lokalizovani u rektumu i sigmi, i imaju tendenciju da se primarno prezentuju u već uznapređovalom stadijumu bolesti.

*Signet ring cell* karcinomi broje 1-2% od ukunog broja KRK, i to su agresivni tumori koji imaju tendenciju ka ekstenzivnom intramuralnom širenju i peritonealnoj karcinomatozi. Jedinstvena patološka osobina ćelija ovog tumora je

prisustvo intracitoplazmatskih vakuola koje sadrže mucin koji potiskuje jedro. Kada je više od 50% tumora formirano od ćelija ovog tipa, postavlja se dijagnoza signet ring cell adenokarcinoma. S'obzirom na retkost ovog morfološkog subtipa, u histologiji treba uzeti u obzir i metatastasku bolet drugog organa kao što je karcinom želuca ili lobularni karcinom dojke (39). Izražena produkcija mucina karakteristična je za KRK sa mikrosatelitskom nestabilnošću (MSI). Mucinozni karcinomi pokazuju dva puta češće MSI-H fenotip nego uobičajeni adenokarcinomi, i imaju bolju prognozu nego njihovi mikrosatelitksi stabilni (MSS) parnjaci (40).

Trećina *Signet ring cell* KRK su MSI-H, ali mikrosatelitska nestabilnost u ovom slučaju ne predstavlja prediktor peživljavanja. Gubitak MLH1 ekspresije je češći u signet cell KRK (29-40%), i mucinoznim karcinomima, nego kod nemucinoznih KRK (10%). Visoka frekvencija mutacije BRAF V600E je zabeležena i kod *Signet ring cell* KRK (22-33%) i kod mucinoznog KRK (15-27%), u odnosu na nemucinozni KRK (8.6%). Manji broj mutacija KRAS je zabeležen kod *Signet ring cell* (36%) i mucinoznog KRK (38%) nego kod nemucinoznog (60%).

Brojni ćelijski putevi su uključeni u karcinogenezu mucinoznog i *Signet ring cell* KRK (40). RAS-RAF-MECK-ERK-MAP kinaza put je uključen u ćelijski odgovor na signale rasta. Druge jedinstvene karakteristike mucinoznog KRK uključuju retke inaktivacione mutacije APC ili TP53 ali česte aberantne DNA metilacije ili CpG metilacije (CIMP) i visoke nivoe FASN.

#### **1.1.10.3. Medularni karcinom**

Medularni karcinom je slabo diferentovani nemucinozni karcinom krupnih ćelija, sa okruglim nukleusom i prominentim nukleolusom. Ovaj retki histološki subtip ima relativno indolentnu biologiju i produženo preživljavanje (25). Skoro svi medularni karcinomi imaju MSI-H fenotip a opisani su i sporadični i hereditarni KRL

#### **1.1.10.4. Skvamocelularni karcinom**

Primarni skvamocelularni karcinom rektuma je redak malignitet i svega nekoliko prikaza slučaja i male serije slučajeva su objavljene (39). Faktori rizika za razvoj ovog tipa KRK su inflamatorne bolesti creva, ali i šistozomijaza

digestivnog trakta, infekcije *Entamoeba histolytica* i HPV. Diferencijalne dijagnoze uključuju retke primarne karcinome rektuma kao i metastatske bolesti drugih organa.

#### **1.1.10.5. Imunohistohemija**

Najčešće korišćeni imunohistohemijski markeri su citokeratin (CK) 20, 7 i CDX2. Specifično bojenje sa pozitivnošću na CK20 i negativnošću na CK7 karakteristično je za KRK. CDX2 je marker enterične diferencijacije i pozitivan je u više od 90% KRK.

### 1.1.11. KLASIFIKACIJA

Klinička TNM klasifikacija bazirana je na radiografskim, endoskopskim i intraoperativnim nalazima, dok je patološka TNM klasifikacija bazirana na rastu i mikroskopskom patološkom pregledu uzorka resekovanog tkiva. Pored TNM klasifikacije kod KRK i danas se koriste *Dukes* odnosno modifikovana *Astler Coller* klasifikacija (41).

Histološki stepen diferencijacije određuje se prema stepenu formiranja tubula kao i prema rasporedu ćelija unutar tumorskog tkiva. Prema histološkom stepenu diferencijacije tumori su klasifikovani u slabo, srednje i dobro diferentovane (42).

Stadijum	T	N	M	DUKE KLASIFIKACIJA
<b>Stadijum 0</b>	Tis	N0	M0	
<b>Stadijum I</b>	T1	N0	M0	A
	T2	N0	M0	B1
<b>Stadijum II</b>	T3	N0	M0	B2
	T4	N0	M0	B2
<b>Stadijum III</b>	T1, T2	N1, N2	M0	C1
	T3, T4	N1, N2	M0	C2
<b>Stadijum IV</b>	Bilo koji T	Bilo koji N	M1	D

**Tabela 1.** TNM Klasifikacija prema AJCC

<b>DUKE</b>	<b>Astler-Coller</b>	<b>TNM</b>	<b>OPIS</b>
A	A1	T1N0	Promene zahvataju mukožu
	B1	T2N0	Promene zahvataju submukožu, ali ne i m.propriu
B	B2	T3N0	Promene kroz m.propriu
	B4	T4N0	Promene kroz m.propriu, invazija drugih organa i struktura
C	C1	T1-2N1	Zahvaćeni l.nodusi, promene ograničene na zid creva
	C2	T3N1	Zahvaćeni l.nodusi, Promene kroz m.propriu
	C3	T4N1	Zahvaćeni l.nodusi, Promene kroz m.propriu, invazija drugih organa i struktura

**Tabela 2.** Duke, Astler Coller i TNM klasifikacija prema AJCC

### **1.1.12. LEČENJE**

Lečenje je pre svega određeno lokalizacijom primarnog tumora, kao i stadijumom bolesti.

#### **1.1.12.1. Hirurško lečenje**

Hirurško lečenje je i dalje zlatni standard u lečenju pacijenata sa lokalizovanim KRK, ali sa obaveznim multidisciplinarnim pristupom koji prethodi, imajući u vidu činjenicu da je ishod lečenja određen kvalitetom hirurške resekcije, adekvatnom preoperativnom klasifikacijom bolesti kao i daljim adekvatnim terapijskim protokolom. Da bi hirurška resekcija bila kurativna, linije disekcije bi trebalo da prate embriološke anatomske ravni, kako bi se osiguralo da su osnovne zone limfatičnog širenja otklonjene sa posebnim osvrtom na cirkumferencijalne resekcione ivice. Pri donošenju odluke o terapijskom izboru treba uzeti u obzir pre svega godine starosti, jer su brojne publikacije ukazale na povišen mortalitet kod starijih bolesnika. S tim u vezi, značajan je podatak o eventualnim komobiditetima ali i o opštem stanju bolesnika pre eventualnog hirurškog lečenja. Apsolutno je neophodno izvršiti pregled čitavog kolorektuma, kako bi se isključilo postojanje eventualnih sinhronih karcinoma, s obzirom da se nalaze u oko 5% bolesnika. Imajući u vidu ovaj podatak, kod bolesnika kod kojih zbog opstrukcije nije bilo moguće uraditi totalnu kolonoskopiju, neophodni su nalazi irigografije ili CT kolografije. Kako bi se isključila metastatska bolest, neophodni su i UZ abdomena kao i RTG pluća i srca. Kako bi postoperativno pratili eventualno napredovanje bolesti potrebno je uraditi kompletne laboratorijske analize uključujući biohemijske markere, pre svega CEA. Pri donošenju odluke da li će pacijent biti lečen laparoskopskom ili klasičnom hirurgijom, od značaja su BMI, podatak o ranijim hirurškim intervencijama kao i stadijum bolesti. Kod određenog broja bolesnika potrebna je i perioperativna stoma zbog zaštite anastomoze ili resekcije distalnog rektuma (26).



### **1.1.12.2. Sistemsko lečenje KRK**

Do danas, ne postoji jasan protokol za neoadjuvantno lečenje karcinoma kolona. Neoadjuvantna radio ili hemoradioterapija su indikovane kod srednje uznapredovalog i uznapredovalog karcinoma rektuma. Sadašnji protokoli savetuju kratkotrajnu preoperativnu primenu radioterapije ili hemoradioterapije sa 5-fluouracilom (5FU) ili kapectabinom.

Adjuvantna terapija savetuje se kod bolesnika sa visokim rizikom od recidiva ili progresije, tj. kod slabo diferentovanih tumora, kod vaskularne, limfatične ili perineuralne invazije, kod opstrukcije ili perforacije ili T4 tumora. Takođe adjuvantna terapija je standard u lečenju T3 stadijuma u protokolu XELOX ili FOLFOX4 (5FU+oxaliplatin) (19).

### **1.1.12.3. Metastatska bolest**

U poslednjih 20-tak godina značajno je produženo preživljanje bolesnika sa uznapredovalom bolešću. Brojne studije su pokazale da je medijana preživljanja oko 30 meseci. Prva linija terapije je kombinacija 5-fluorouracila (5FU), leukovorina i-ili oksaliplatine (FOLFOX) ili irinotekana (FOLFIRI). Pored ovih protokola, danas se koriste i monoklonska antitela protiv EGFR (cetuximab i panitumumab), monoklonsko antitelo protiv VEGF (bevacizumab), proteini koji inaktiviraju proangiogenezne faktore rasta (aflibercept) i multikinazni inhibitori (regorafenib) (43).

### **1.1.13. PROGNOZA**

Udruženje američkih patologa objavio je 2015 god. klasifikaciju prognostičkih faktora na osnovu bioloških, genetskih i molekularnih osobina u 4 kategorije.

#### **1.1.13.1. Kategorija I**

Lokalizacija i prostiranje tumora, involviranost limfnih nodusa, limfovaskularna invazija, rezidua tumora nakon operacije i preoperativni CEA smatraju se značajnim prognostičkim faktorima kod bolesnika sa KRK. Naime, venska i angiolimfatska invazija, rezidua tumora nakon operacije, izostanak normalizacije CEA nakon hirurške resekcije predstavljaju loše prognostičke znake. Dubina prostiranja tumora smatra se nezavisnim prediktorom preživljavanja, kao i broj zahvaćenih regionalnih limfnih nodusa (15).

#### **1.1.13.2. Kategorija IIa**

U ovu kategoriju spadaju stadijum tumora, cirkumferencijalna resekciona (radijalna) margina (CRM) i regresija tumora određena TNM stadijumom resekovanog uzorka. Radijalna margina odgovara retroperitonealnim uzorcima kao što su tumori srednje i donje partije rektuma, gde se cela eksterna površina uzorka smatra CRM (15).

#### **1.1.13.3. Kategorija IIb**

Ova kategorija uključuje histološke i genetske prognostičke faktore. U histološke faktore spadaju: histološki tip, granice tumora, morfološke karakteristike u korelaciji sa MSI, dok u genetske faktore spadaju: MSI i gubitak heterozigotnosti 18q. Iako određeni histološki podtipovi imaju agresivniju prirodu, histološki podtip nije dokazani nezavisni prognostički indeks KRK-a.

#### **1.1.13.4. Kategorija III**

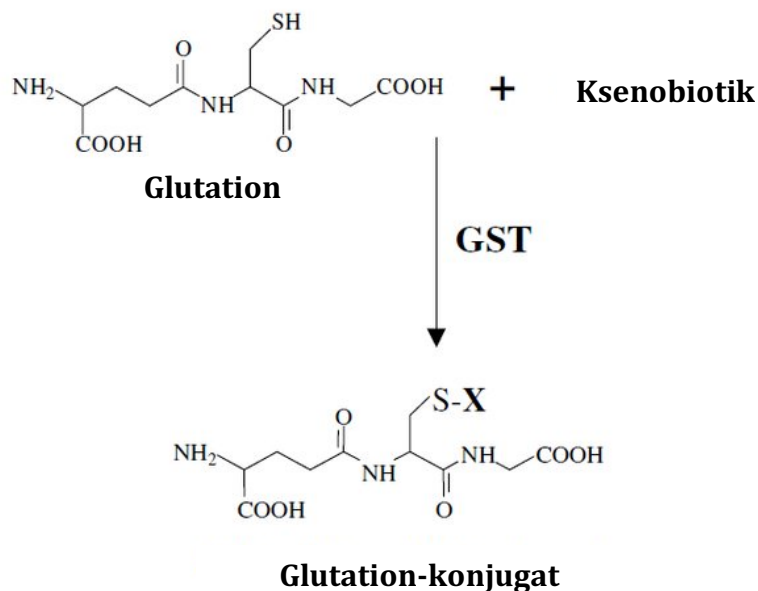
Ova kategorija uključuje faktore koji nisu do sada detaljno ispitani i čiji prognostički značaj nije detaljno određen. Faktori koji su grupisani u ovoj kategoriji: DNK sadržaj, perineuralna invazija, gustina mikrovaskulature, peritumorska fibroza, peritumorski inflamatorni odgovor, fokalna neuroendokrina diferencijacija, nuklearni organizirajući regioni kao i proliferacija.

#### **1.1.13.5. Kategorija IV**

U ovoj kategoriji nalaze se faktori koji su dobro proučeni i za koje se zaključilo da nemaju prognostički značaj. U ove faktore spadaju veličina tumora i konfiguracija tumora.

## 1.2. GLUTATION TRANSFERAZE (GST)

Glutation transferaze (GST) predstavljaju veliku superfamiliju enzima koji učestvuju u reakcijama konjugacije elektrofilnih metabolita endogenog ili egzogenog porekla sa glutationom (GSH), čime se smanjuje njihova reaktivnost prema nukleofilnim grupama u važnim biološkim makromolekulima. Naime, GST učestvuju u metabolizmu različitih ksenobiotika, uključujući lekove, ali i kancerogene, tako što katališu konjugaciju glutationa sa ovim jedinjenjima, pri čemu se formiraju manje toksični i hidrosolubilni proizvodi koji mogu da se ekskretuju putem urina ili žuči (44).

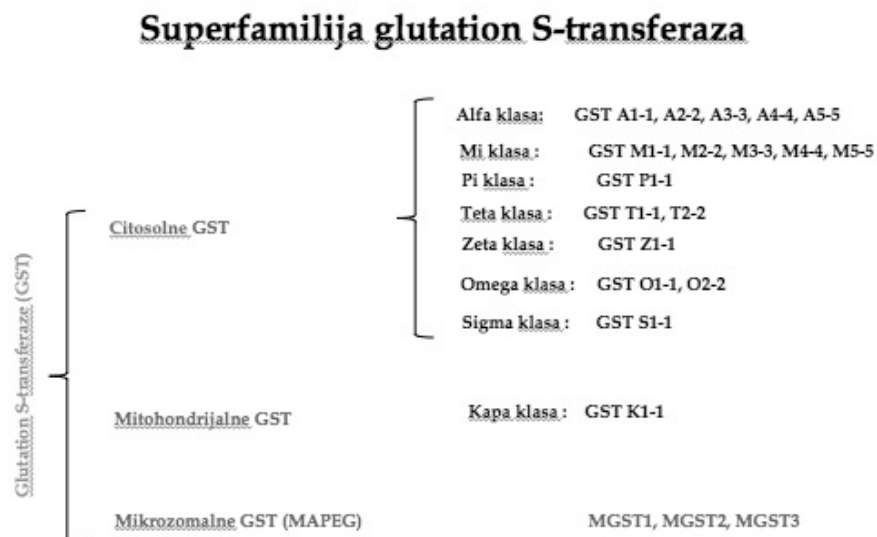


**Figura 5.** Konjugacija ksenobiotika sa glutationom u prisustvu GST; preuzeto od *Cristosomo et al, 2013*.

GST su dimerni enzimi, najčešće formirani od dva identična lanca. U svakom GST monomeru postoje dva različita domena: C-terminalni alfa heliksni domen i N-terminalni tioredoksinu-sličan domen. N-terminalni tioredoksinu-sličan domen sadrži mesto za vezivanje GSH (G-mesto). Kod određenih klasa u G mestu je aminokiselina tirozin, dok je kod drugih prisutna aminokiselina serin ili cistein.

Prema lokalizaciji GST su klasifikovane u citosolne, mitohondrijalne i mikrozomalne (44). Citosolne GST su dalje podeljene u 7 klasa na osnovu različitih strukturnih, hemijskih, ali i fiziko-hemijskih karakteristika: alfa (GSTA), pi (GSTP), mi (GSTM), sigma (GSTS), omega (GSTO), teta i zeta (GSTZ). Kod GSTA, GSTM, GSTP i GSTS klasa u G-mestu se nalazi aminokiselina tirozin, dok mitohondrijalne GST, poznatije kao kapa GST (GSTK) u G-mestu imaju aminokiselinu serin, što ih čini sličnim teta klasi GST.

Mikrozomalne GST nasuprot njima su membranski proteini, poznatiji kao MAPEG (*eng. membrane-associated proteins involved in eicosanoid and glutathione metabolism*) (44). Pored već navedenih uloga, citosolne GST i MAPEG su uključene u procese sinteze prostaglandina i leukotrijena (45).



**Figura 6.** Klasifikacija glutathion transferaza; preuzeto od *Wu et Dong, 2012.*

### **1.2.1. Metabolizam ksenobiotika pod uticajem GST**

Glutation transferaze kao grupa enzima posreduju u procesu sinteze merkapturane kiseline (46) Njihova aktivnost u velikoj meri zavisi od sposobnosti glutamat-cistein ligaze i glutation sintaze, ključnih enzima u sintezi glutationa, da formiraju GSH i mogućnosti da transporteri iz ćelije uklone konjugate glutationa. Jednom formirani, ovi konjugati uklanjaju se iz ćelije uz pomoć MRP (*eng. multidrug resistance-associated protein*). Različite supstance mogu biti supstrati za GST, poput pesticida, herbicida, lekova, različitih zagađivača iz spoljašnje sredine, kao i različitih kancerogena. Brojni lekovi koji se koriste u terapiji malignih bolesti metabolišu se upravo uz pomoć GST-a, poput cisplatine, busulfana, ciklofosfamida itd. (47), zbog čega polimorfizam gena koji kodiraju GST može doprineti nastanku hemiorezistencije (48).

U prethodno pomenute zagađivače iz spoljašnje sredine spadaju i epoksidi iz policikličnih aromatičnih ugljovodonika (PAH) i stirena koji se metabolišu i posredstvom citohroma P450. PAH su posebno značajne supstance jer se nalaze i u duvanskom dimu i u izduvnim gasovima automobila, te su nadasve prisutni. Supstance koje se takođe metabolišu uz pomoć GST su heterociklični amini koji nastaju tokom procesa kuvanja hrane koja je bogata proteinima. Jedan od najvažnijih heterocikličnih amina koji se metaboliše uz pomoć GST je 2-amino-1-metil-6-fenilimidazo[4,5-b]piridin (49).

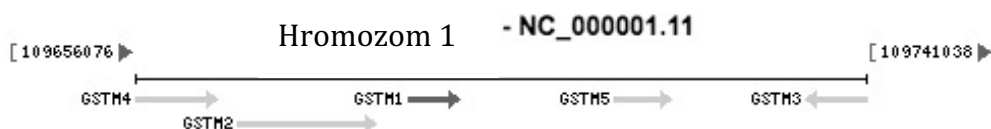
Pored uloge u detoksikaciji, GST imaju i izuzetno značajnu antioksidantnu ulogu, i na taj način su uključene u zaštitu ćelija od oksidativnog stresa. Naime, GST štite DNK metabolišući jedinjenja koja mogu da dovedu do mutacija ili doprinesu procesu karcinogeneze. Takođe, učestvuju u procesu degradacije aromatičnih aminokiselina, sintezi steroidnih hormona kao i biosintezi metabolita arahidonske kiseline (50).

## 1.2.2. Polimorfizam GST

Genski polimorfizam je prisutan u skoro svim klasama GST. Smatra se da su upravo polimorfizmi razlog individualnih razlika u kapacitetu za metabolizam ksenobiotika. Delecioni polimorfizmi su opisani kod GSTM1 i GSTT1, tako da individue sa ovim polimorfizmima ne poseduju GSTM1 i GSTT1 protein, te imaju apsolutni nedostatak enzimske aktivnosti ovih klasa GST. Različiti autori beleže da oko 50% belaca ima delecioni GSTM1 polimorfizam, dok oko 20% ima delecioni GSTT1 polimorfizam. Kod GSTP1 polimorfizma, enzimska aktivnost je izmenjena usled supstitucije aminokiselina izoleucina (Ile) sa valinom (Val). Incidenca supstitucije GSTP1 Ile/Ile kod belaca ide i do 50%, Ile/Val oko 40%, dok je zastupljenost Val/Val oko 10%. GSTA1 kodiran je genima smeštenim na hromozomu 6, a usled nukleotinih promena promotorske varijante GSTA1 koju karakterišu dva alela, dolazi do smanjene aktivnosti ovog enzima. Incidenca GSTA1CC, CT, TT genotipa iznosi od 40%, 50% do 15%.

### 1.2.2.1. GSTM1

Opisano je pet podklasa u okviru GSTM klase: GSTM1, GSTM2, GSTM3, GSTM4 i GSTM5. Literaturni podaci ukazuju da je najviše ispitivana GSTM1, jer se smatra da preostale podklase imaju veoma sličnu specifičnost za većinu supstrata. GSTM1 gen je lociran na hromozomu 1 (p13.3). Uzimajući u obzir razlike među etničkim grupama, incidenca delecionog polimorfizma varira od 20% do čak 67% među različitim etničkim grupama (51).

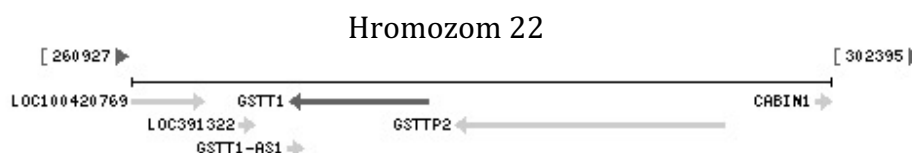


**Figura 7.** GSTM1 na hromozomu 1; preuzeto od Bhattarcharjee et al 2013.

Usled prisustva delecionog polimorfizma, kod nosilaca *GSTM1-nultog* genotipa nije moguća adekvatna konjugacija velikog broja ksenobiotika. Prethodne studije ukazuju da nosioci ovog polimorfizma imaju izmenjen odgovor na toksične supstance, lekove i rezistenciju na hemioterapeutike. Meta-analize pokazale su da nosioci *GSTM1-nultog* genotipa imaju povećan rizik za nastanak određenih karcinoma, uključujući i kolorektalni ili karcinom ezofagusa (52,53).

### 1.2.2.2. GSTT1

Klasa GSTT podeljena je u tri podklase: GSTT1, GSTT2 i, GSTT2B. Sve tri klase imaju 55% identičnih sekvenci aminokiselina i u prethodnim istraživanjima opisane su kao učesnici u procesu kancerogeneze. Gen za GSTT1 nalazi se na hromozomu 22 (q11.23). Incidenca delecionog polimorfizma se procenjuje na oko 20%-38% u opštoj populaciji, dok se u Aziji beleže nešto više incidence koje idu čak i do 67% (54). Slično kao za *GSTM1* i za *GSTT1* meta-analize ukazuju da prisustvo ovog genotipa može doprinosti povećanom riziku za nastanak različitih karcinoma, između ostalog i kolorektalnog karcinoma (55).



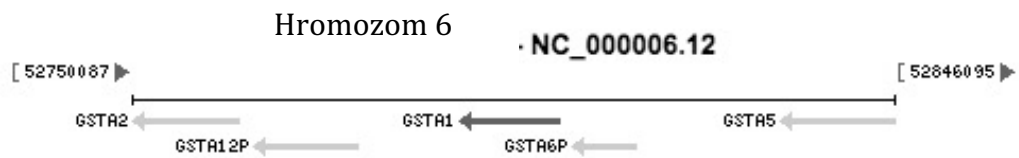
**Figura 8.** GSTT1 na hromozomu 22; preuzeto od Liu et al 2017.

### 1.2.2.3. GSTA1

Gen za *GSTA1* nalazi se na hromozomu 6. Opisano je pet podklasa *GSTA*. Unutar alfa podklase, velike razlike uočene su kod nosioca *GSTA1* i *GSTA2*. Tačkaste mutacije na *GSTA2* opisane su u literaturi, ali njihov klinički značaj i dalje je predmet ispitivanja (56). Polimorfizmi pojedinačnog nukleotida (*eng. single nucleotide polymorphism, SNP*) su prisutni na SP1 vezujućem elementu *GSTA1*. *GSTA* učestvuje u metabolizmu različitih štetnih materija iz spoljašnje sredine, kao i duvanskog dima, ali i brojnih hemioterapeutika.



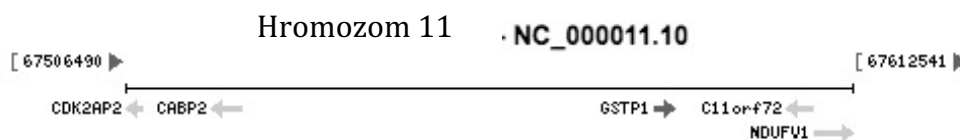
Ova klasa GST učestvuje u metabolizmu peroksida kao i fosfatidil-hidroperoksida masnih kiselina (57). Opisana su brojna oboljenja povezana sa uticajima štetnih materija iz spoljašnje sredine, koja se beleže češće kod nosioca ovog polimorfizma.



**Figura 9.** GSTA1 na hromozomu 6; preuzeto od *Zu et al 2019*.

#### 1.2.2.4. GSTP1

Gen za GSTP1 nalazi se na hromozomu 11. Polimorfizam u kodirajućoj sekvenci *GSTP1* karakteriše prelazak adenina u guanin na nukleotidu 313, što dovodi do promene izoleucina (Ile105) u valin na kodonu 105 (Val105). Enzimi sa valinom na kodonu 105 imaju sedam puta veću katalitičku aktivnost za epokside policikličnih aromatičnih hidrokarbona u odnosu na izoenzime koji na ovoj poziciji imaju izoleucin. Ova forma GSTP1 enzima, 2-3 puta je manje stabilna u odnosu na formu Ile105. Takođe, zabeležen je i polimorfizam *GSTP1* gde citozin prelazi u timidin na nukleotidu 341, što dovodi do promene alanina u valin na kodonu 14 (Val104) (50).



**Figura 10.** GSTP1 na hromozomu 11; preuzeto od *Zu et al 2019*.

### **1.3. GLUTATION TRANSFERAZE KOD KOLOREKTALNOG KARCINOMA**

Literaturni podaci pokazuju da značajnu ulogu u nastanku i progresiji KRK-a mogu imati glutation transferaze (50). Hereditarni KRK karakterišu mutacije izuzetno penetrantnih genskih alela, ali hereditarni KRK čini mali procenat od ukupnog broja obolelih. Sporadični KRK se javlja kod više od 90% obolelih i razvija se usled mutacija slabo penetrantnih gena, sa ili bez udruženih faktora spoljne sredine. S obzirom da su prepoznati faktori rizika izuzetno česti u opštoj populaciji, može se pretpostaviti da je karcinogeneza KRK pod uticajem različitih inter-individualnih genskih razlika. Dosadašnja istraživanja ukazuju da GST imaju značajnu ulogu u procesu karcinogeneze KRK. Zahvaljujući hidroperoksidaznoj aktivnosti GST učestvuju u odbrani ćelija od organskih hidroperoksida, tako što ih redukuju u alkohole, i na taj način čine moćne antioksidanse (42). Imajući u vidu da reaktivne kiseonične vrste učestvuju u procesima transkripcije DNK, genske ekspresije, ćelijske proliferacije i diferencijacije, ispitivanje metabolizma ovih jedinjenja je od izuzetnog značaja. Brojni hemoterapeutici poput cisplatine ili oksaliplatine koja se koristi u lečenju bolesnika sa KRK, dovode do stvaranja superoksida i kiseoničnih radikala. U tom smislu modulacija oksidativnog stresa u čemu učestvuju GST ima ulogu u karcinogenezi KRK ali i u lečenju ovih bolesnika (59). U karcinogenezi KRK-a kao značajni hemijski kancerogeni opisani su i policiklični aromatični ugljovodonici (PAH) kao i heterociklični aromatični amini (HAA). Ove supstance su naročito prisutne u duvanskom dimu, kao i mesu koje se priprema na otvorenoj vatri ili na visokim temperaturama. Najvažnije jedinjenje iz grupe PAH koje je prisutno u duvanskom dimu je benz(a)piren koji se metaboliše do benzo(a)piren-diolepoksida, sa potencijalom da se dalje vezuje za guanozin u molekulu DNK i formira BPDE-DNK konjugate (*engl. Benzo(a)pyrene diolepoxide (BPDE)-DNA adducts*) što kao rezultat dovodi do nastanka tumora (60). Najčešće izolovana jedinjenja iz mesa koje se priprema na visokoj temperaturi iz grupe HAA su 2-amino-1-metil-6-fenilimidazo (4,5-b) piridin (PhIP) i 2-amino-3,8-dimetilimidazo (4,5-f) kinoksalin (MeIQx). HAA jedinjenja nastaju nakon pirolize aminokiselina a njihova količina zavisi od metode, temperature kao i dužine trajanja kuvanja. Enzimi citohroma P450 su odgovorni za pretvaranje

prekarcinogena u formu karcinogena. U tom procesu formiraju se DNK adukti, koji dalje dovode do mutacija gena koji učestvuju u procesu karcinogeneze KRK. Suprotno tome, enzimi II faze poput GST učestvuju u procesu detoksikacije formiranih karcinogena, omogućavajući njihovu eliminaciju i suprimirajući stvaranje reaktivnih kiseoničnih vrsta. (6). PAH i HAA u reakcijama konjugacije uz pomoć GST formiraju stabilna jedinjenja koja se eliminišu iz organizma, te na taj način GST imaju izuzetno važnu ulogu u detoksikaciji (61). Genetski polimorfizam je prisutan kod sve četiri najvažnije klase GST. Najzastupljeniji pripadnici citosolnih GST su klase alfa (GSTA), mi (GSTM), pi (GSTP) i teta (GSTT). Iako je polimorfizam opisan kod svih članova alfa klase, najveći klinički značaj ima polimorfna ekspresija GSTA1, pre svega zbog detoksikacije kancerogenih metabolita životne sredine i duvanskog dima (57). Pored toga, delecioni polimorfizam usled koga ne dolazi do sinteze GSTM1 aktivnog enzima dovodi do gubitka uloge ovog enzima u procesu detoksikacije (62), te usled kumulativnih oštećenja molekula DNK može doći do nastanka karcinoma. Najvažniji supstrat za klasu GSTP1 su diol-epoksidi PAH-a. Pokazano je da *GSTP1105Val* genotip ima do pet puta jaču enzimsku aktivnost prema policikličnim aromatičnim ugljovodonicima (63). Kada je u pitanju klasa GSTT, pokazano je da nosioci *GSTT1-nultog* genotipa imaju smanjenu metaboličku aktivnost prema derivatima etana koji su prisutni u duvanskom dimu (64).

S obzirom da različita ekspresija glutation transferaza može uticati na kapacitet određenog tkiva za detoksikaciju i zaštitu od oksidativnog stresa, pokazano je da su osobe koje nemaju eksprimiran neki od GST izoenzima izložene većem riziku za obolevanje od pojedinih karcinoma. Dosadašnja istraživanja o povezanosti polimorfizma gena za GST sa rizikom za nastanak KRK, nezavisno ili udruženo sa poznatim faktorima rizika, dala su dosta kontradiktorne rezultate. Pored toga, u literaturi postoji mali broj podataka o prognostičkom značaju polimorfizma GST u KRK. Zbog mogućeg funkcionalnog značaja najčešćih polimorfizama gena koji kodiraju citosolne glutation transferaze A1, M1, T1 i P1 u nastanku, progresiji i napredovanju KRK, veoma je važno izvesti sveobuhvatno istraživanje u kome bi se istovremeno određivalo prisustvo specifičnih genskih

varijanti, faktora rizika, biohemijških markera, tumorskog fenotipa i longitudinalno pratio ishod lečenja ovih bolesnika.

## 2. CILJEVI

U ovom istraživanju ciljevi su bili:

1. Ispitati da li postoji uticaj genskog polimorfizma *GSTA1 C69T (rs3957357)*, *GSTM1*, *GSTP1 Ile105Val (rs1695)* i *GSTT1* na rizik za nastanak KRK, kao i da li postoji udruženi efekat genotipova i poznatih faktora rizika (pušenje, BMI) za nastanak KRK.
2. Ispitati da li postoji povezanost između polimorfizma gena za *GSTA1*, *GSTM1*, *GSTP1* i *GSTT1* i biohemijskih i fenotipskih karakteristika tumora, uključujući tip, stadijum i gradus KRK.
3. Ispitati da li polimorfna ekspresija GST može imati prognostički značaj kod bolesnika sa KRK.
4. Proceniti da li preoperativne vrednosti CEA i CA 19-9 mogu pružiti informacije o stadijumu bolesti u trenutku postavljanja dijagnoze, da li se razlikuju kod bolesnika sa različitim GST genotipom ili kod nosilaca različitih genskih varijanti GST, kao i da li mogu imati prognostički značaj kod bolesnika sa KRK
5. Proceniti da li parametri sistemske inflamacije mogu pružiti informacije o stadijumu bolesti u trenutku postavljanja dijagnoze, kao i da li mogu imati prognostičku ulogu kod bolesnika sa KRK

## 3.MATERIJAL I METODE

### **3.1. SELEKCIJA ISPITANIKA**

Za određivanje polimorfizama *GSTA1*, *GSTM1*, *GSTP1* i *GSTT1*, kao i biohemijskih markera i parametara sistemske inflamacije uključeno je 523 bolesnika sa histopatološki potvrđenom dijagnozom kolorektalnog karcinoma koji su lečeni na Klinici za digestivnu hirurgiju-Prva hirurška klinika Kliničkog centra Srbije u Beogradu, a čiji su uzorci krvi deo biobanke Instituta za medicinsku i kliničku biohemiju Medicinskog fakulteta u Beogradu koja je formirana u navedenom periodu u saradnji sa Klinikom za digestivnu hirurgiju KCS (odluka Etičkog komiteta Kliničkog centra Srbije 56-6, od 21.01.2016. godine). Histopatološka procena je izvršena od strane patologa u skladu sa Dukes i TNM sistemom klasifikacije za procenu stepena diferentovanosti tumora (41).

Kontrolnu grupu je činilo 400 po uzrastu ( $\pm 2$  godine) i polu uparenih ispitanika, bez verifikovanog malignog oboljenja, a čiji su uzorci krvi takođe deo pomenute biobanke.

Kriterijumi za uključivanje ispitanika u studiju bili su klinički, kolonoskopski i patohistološki verifikovano prisustvo KRK, sa ili bez prisustva poznatih faktora rizika za nastanak KRK. Kod ovih bolesnika se takođe pratilo preživljavanje.

Kriterijumi za isključivanje osoba iz kontrolne grupe bilo je verifikovano prisustvo maligne bolesti. Uslovi za isključivanje iz istraživanja bili bi želja ispitanika da više ne učestvuju u istraživanju.

Za prikupljanje podataka o izloženosti pretpostavljenim sredinskim faktorima rizika za nastanak KRK (pušenje, povišena telesna masa), korišćen je strukturisani epidemiološki upitnik, sastavljen na Institutu za epidemiologiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, u cilju ispitivanja faktora rizika za nastanak malignih bolesti. Ovaj upitnik je prethodno validiran korišćenjem odgovarajućih procedura. U našem istraživanju, pušači su definisani kao osobe koje su navele da su pušile svakog dana tokom perioda koji je minimalno iznosio 60 dana do trenutka uključivanja u studiju. Svi podaci dobijeni od učesnika su se odnosili na period do trenutka postavljanja dijagnoze karcinoma kod slučajeva, i na odgovarajući period kod kontrolne grupe.



### **3.2. PRAVNI I ETIČKI PREDUSLOVI**

Studija je planirana u skladu sa etičkim standardima datim u Helsinškoj deklaraciji (prema revidiranoj verziji iz 2013. godine) i u skladu sa pravilima Etičkog komiteta Medicinskog fakulteta u Beogradu. Sve osobe od kojih je uzet biološki materijal koji je korišćen u studiji, kao i lični podaci, potpisale su pristanak za učešće u studiji kao i da su obaveštene o ciljevima i očekivanim ishodima studije.

### **3.3. MATERIJAL**

#### **3.3.1. Krv**

Za analizu polimorfizama GST od svih ispitanika su uzeti uzorci pune krvi (2.7 ml) sa EDTA kao antikoagulansom, na Klinici za digestivnu hirurgiju-Prva hirurška klinika Kliničkog centra Srbije i transportovani do Instituta za medicinsku i kliničku biohemiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

### **3.4. METODE**

#### **3.4.1. Izolacija DNK**

Dezoksiribonukleinska kiselina (DNK) je izolovana iz 200 $\mu$ l venepunktirane krvi korišćenjem QIAamp DNA mini kit-a (*Qiagen, Chatsworth CA, USA*), potom alikvotirana i čuvana na -20 $^{\circ}$ C do izvođenja PCR (*engl. polymerase chain reaction*) analize. Određivanje čistoće i koncentracije izolovane DNK izvedena je spektrofotometrijski na 230, 260, 280 i 320 nm na GeneQuant pro (*Biochrom, Cambridge, England*) aparatu.

#### **3.4.2. Određivanje *GSTA1* C69T (rs3957357) polimorfizma**

Polimorfizam *GSTA1* C69T je određivan po PCR-RFLP metodi *Colesa i sar.* (49) restrikcijom digestijom PCR proizvoda sa *EcoRI* enzimom (*Thermo Fisher*

*Scientific, Waltham, Massachusetts, USA*). Inkubacija PCR proizvoda i *EarI* enzima se odvijala se na 37°C tokom 16h (preko noći). Nakon inkubacije, uspešnost restikcione digestije je proveravana elektroforezom na 1% agaroznom gelu na 125 V, 0,27 A i 50 W. Vizuelizacija restrikcionih proizvoda je izvođena na UV kameri *Chemidoc (Biorad, Hercules, CA, USA)* pomoću *SYBR® Safe DNA Gel Stain (Invitrogen Corporation, Carlsbad, California, USA)*. Prisustvo trake veličine 481bp ukazivalo je na *wild-type CC* genotip, dok je prisustvo traka veličine 481bp+385bp+96bp ukazivalo na *CT* genotip, odnosno prisustvo traka 385bp+96bp na *TT* genotip.

### **3.4.3. Određivanje *GSTM1* i *GSTT1* polimorfizama**

Multipleks polimorfizam *GSTM1* i *GSTT1* je određivan po metodi *Abdel-Rahman-a i sar.* (65) za istovremeno analiziranje genotipa *GSTM1* i *GSTT1*. Kontrolni prajmeri koji omogućavaju amplifikaciju egzona 7 *CYP1A1* gena (312 bp), takođe su bili uključivani u reakcije kako bi se potvrdilo prisustvo DNK u uzorku, kao i uslovi PCR-a. Uspešnost amplifikacije je proveravana elektroforezom na 2% agaroznom gelu na 125 V, 0,27 A i 50 W. Vizuelizacija PCR proizvoda je bila izvođena na UV kameri *Chemidoc (Biorad, Hercules, California, USA)* pomoću *SYBR® Safe DNA Gel Stain (Invitrogen Corporation, Carlsbad, California, USA)*. Prisustvo trake veličine 215 bp ukazivalo je na prisustvo gena za *GSTM1*, odnosno prisustvo trake veličine 481 bp na prisustvo gena za *GSTT1* (homozigotni i heterozigotni genotip). Odsustvo traka ukazivalo je na homozigotnu deleciju gena za *GSTM1* i *GSTT1*.

### **3.4.4. Određivanje *GSTP1* Ile105Val (rs1695) polimorfizma**

Polimorfizam *GSTP1* Ile105Val određivan je uz upotrebu *Applied Biosystems TaqMan® Drug Metabolism Genotyping* eseja (*Life Technologies, Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA, Assay ID: C\_3237198\_20*). Uzorci DNK, kao i pozitivna i negativna kontrola, nanošene su na ploču sa 96 bunarčića tako se da nakon uparavanja DNK na 65°C (*Mastercycler gradient thermal cycler, Eppendorf,*

Hamburg, Germany) u svakom odgovarajućem bunarčiću nalazila ista količina DNK. Reakciona mešavina sačinjena od PCR MasterMixa (*Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA*) i fluorescentno obeležene probe nanešene su uz pomoć *EppMotion* robota (*Eppendorf, Hamburg, Germany*) dok su PCR amplifikacija i očitavanje fluorescence metodom *real time* PCR-a (*Mastercycler ep realplex* (*Eppendorf, Hamburg, Germany*)).

#### **3.4.5. Izdvajanje plazme**

Plazma je izdvajana centrifugiranjem na 3000 obrtaja/min u trajanju od 15 min u centrifugi sa hladjenjem na +4°C. Da bi se sprečila autooksidacija uzoraka plazme, 10 µl alkoholnog rastvora butilovanog hidroksitoluena (10 mmol/L) je dodavano na svaki ml plazme. Izdvojena plazma je čuvana na -80°C do ELISA analize.

#### **3.4.6. Određivanje CEA i CA 19-9**

CEA i CA19-9 određivani su uz pomoć komercijalno dostupnih imunoeseja *Roche Diagnostic reagent kits* i *Cobas 6000 automatic analyzer* (*Roche Diagnostics, Mannheim, Germany*) ELISA testovima. Svi kitovi su enzimski varijanta sendvič testa i sadrže polistirenske perle i monoklonska anti CEA/CA 19-9 antitela. Funkcionišu tako što su na čvrstu podlogu vezana antitela za koja se vezuje antigen iz uzorka. Nakon ispiranja dodaje se enzimom obeleženo antitelo i dolazi do formiranja kompleksa antigen-antitelo-enzim. Višak antitela se ispira i dodaje se supstrat za enzim koji kasnije katalitički konvertuje supstrat u obojeni proizvod čija je koncentracija proporcionalna količini antigena. (66).

#### **3.4.7. Određivanje NLR, PLR i MVP**

Kompletna krvna slika dobijena je analiziranjem uzoraka krvi koja je antikoagulirana sa EDTA u okviru 4 sata od uzorkovanja uz pomoć *Coulter® LH750 Hematology Analyzer* (*Beckman Coulter, USA*). NLR je izračunavan

deljenjem apsolutnog broja neutrofila sa apsolutnim brojem limfocita. PLR je izračunavan deljenjem apsolutnog broja trombocita sa apsolutnim brojem limfocita. Kontrolni uzorci su ispitivani u dva navrata (Beckman Coulter, USA).

### **3.5. STATISTIČKA ANALIZA**

Normalnost raspodele podataka je proveravana računskim metodama (koeficijent varijacije, vrednosti „skjunisa“ i „kurtosisa“, statistički test *Kolmogorov-Smirnov* i *Shapiro-Wilk*) kao i grafičkim metodama za proveru normalnosti (histogram, normalni Q-Q grafikon, detrendovan normalni Q-Q grafikon, grafikon kutije (engl. *boxplot*). Statistička analiza je uključivala, pored deskriptivne statistike, primenu  $\chi^2$  testa za procenu da li se odgovarajući genotipovi nalaze u *Hardy-Weinberg* ekvilibrijumu i determinisanje značajnosti razlike u frekvenciji dobijenih genotipova ali i određenih ispitivanih karakteristika između ispitivanih bolesnika i kontrolne grupe.

Laboratorijske analize između grupa analizirane su uz pomoć Mann-Whitney testa. Kliničko-patološke varijable između grupa upoređivane su uz pomoć Kruskal-Wallis testa. Linearna regresija korišćena je u ispitivanju odnosa parametara sistemske inflamacije dok je binarna logistička regresija korišćena kako bi se kombinovali parametri sistemske inflamacije. ROC (eng. *receiver operator characteristic*) kriva korišćena je kako bi se utvrdile vrednosti markera sa najvećom senzitivnošću i specifičnošću. Polje ispod ROC krive je takođe izračunavano (eng. *area under the curve, AUC*). Vrednosti  $P < 0.05$  smatrane su statistički značajne.

Značajnost razlike u učestalosti prisustva neke varijable, odnosno njenog nivoa, u studijskoj i kontrolnoj grupi procenjivala bi se univarijantnom logističkom regresionom analizom, na osnovu veličine i značajnosti odnosa šansi (engl. *odds ratio, OR*) sa intervalom poverenja od 95% (IP 95%).

Preživljavanje bolesnika sa kolorektalnim karcinomom analizirano je pomoću *Kaplan-Meier* testa za procenu kumulativne verovatnoće preživljavanja. Prediktivna vrednost različitih GST genotipova procenjena je *Cox* regresionim

modelom. Kao vreme praćenja, podrazumevan je period od trenutka operativnog lečenja do trenutka smrti, odnosno poslednje provere ishoda.

## 4. RESULTATI

#### **4.1. DEMOGRAFSKE KARAKTERISTIKE ISPITANIKA**

U našem istraživanju učestvovalo je 523 pacijenta sa KRK, prosečne starosti  $62.25 \pm 11.38$  godina i 400 zdravih kontrola prosečne starosti  $60.80 \pm 11.79$ . Nije postojala statistički značajna razlika u godinama starosti između ove dve grupe ( $P > 0.05$ ).

Demografske i kliničke karakteristike pacijenata i kontrolne grupe prikazane su u Tabeli 3. U grupi pacijenata sa KRK, njih 313 bilo je muškog pola (60%), dok je 210 pacijenata (40%) sa KRK bilo ženskog pola. Između grupe pacijenata sa KRK i kontrolne grupe postojala je statistički značajna razlika u polu ( $P < 0.05$ ). Naime u grupi pacijenata sa KRK bilo je više pacijenata muškog pola u odnosu na kontrolnu grupu.

U grupi pacijenata sa KRK, od arterijske hipertenzije bolovalo je 286 pacijenata (58%), dok je u kontrolnoj grupi ovaj broj bio 111 (30%). Utvrđeno je postojanje statistički značajne razlike u postojanju arterijske hipertenzije između ove dve grupe ( $P < 0.01$ ).

U grupi pacijenata sa KRK prosečan BMI iznosio je  $25.58 \pm 3.47$  dok je prosečan BMI u grupi zdravih kontrola iznosio  $26.13 \pm 3.72$ , te nije pronađena statistički značajna razlika između ove dve grupe ( $P > 0.05$ ).

Kao aktivni pušači u grupi pacijenata sa KRK izjasnilo se 338 pacijenata (68%) dok se u kontrolnoj grupi kao aktivni pušač izjasnilo 189 ispitanika (48%), između ove dve grupe pokazano je postojanje statistički značajne razlike ( $P < 0.05$ ).

**Tabela 3.** Demografske karakteristike pacijenata i kontrolne grupe

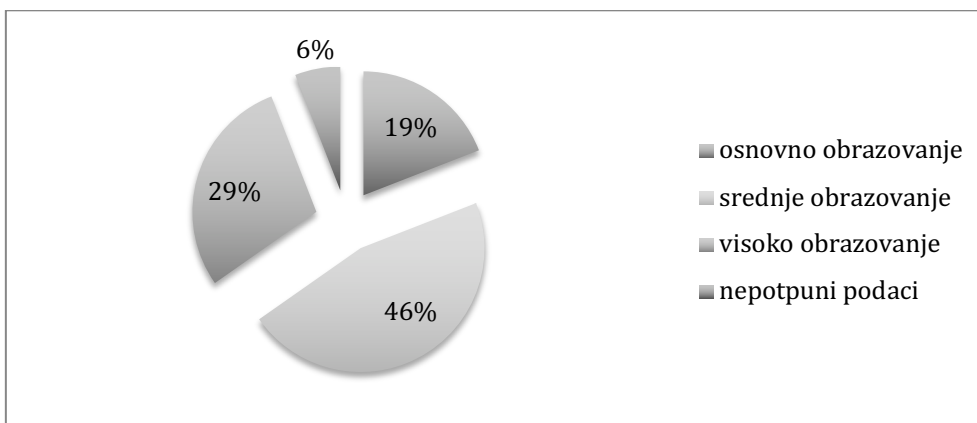
	KRK (n %)	Kontrolna grupa (n %)	OR (95%CI)	P vrednost
<b>Godine</b> (sr.vrednost±SD) <sup>a</sup>	62.25±11.38	60.80±11.79	/	0.067
<b>Pol</b>				
Muški	313 (60)	203 (51)	1.00 <sup>e</sup>	
Ženski	210 (40)	197 (49)	0.69 (0.53-0.89)	<0.05
<b>Hipertenzija, n (%)<sup>b</sup></b>				
Ne	207 (42)	262 (70)	1.00 <sup>e</sup>	
Da	286 (58)	111 (30)	3.26 (2.45-4.33)	<0.001
<b>Gojaznost, n (%)<sup>b</sup></b>				
BMI < 25	200 (42)	155 (41)	1.00 <sup>e</sup>	
BMI > 25	272 (58)	224 (59)	0.94 (0.72-1.24)	0.664
<b>Pušenje, n (%)<sup>c</sup></b>				
Nikada	156 (32)	201 (52)	1.00 <sup>e</sup>	
Da <sup>c</sup>	336 (68)	189 (48)	2.29 (1.74-3.02)	<0.001
<i>Paklo-godina</i> <sup>d</sup>	30 (1.25-150.0)	27 (1.0-120.0)	/	0.105

<sup>a</sup>srednja vrednost±standardna devijacija; <sup>b</sup>bazirano na dostupnim podacima; <sup>c</sup>minimum od 60-dana pre početka istraživanja; <sup>d</sup>medijana (min-max); <sup>e</sup>OR, odds-ratio; <sup>e</sup>Referentna grupa. CI, interval poverenja;



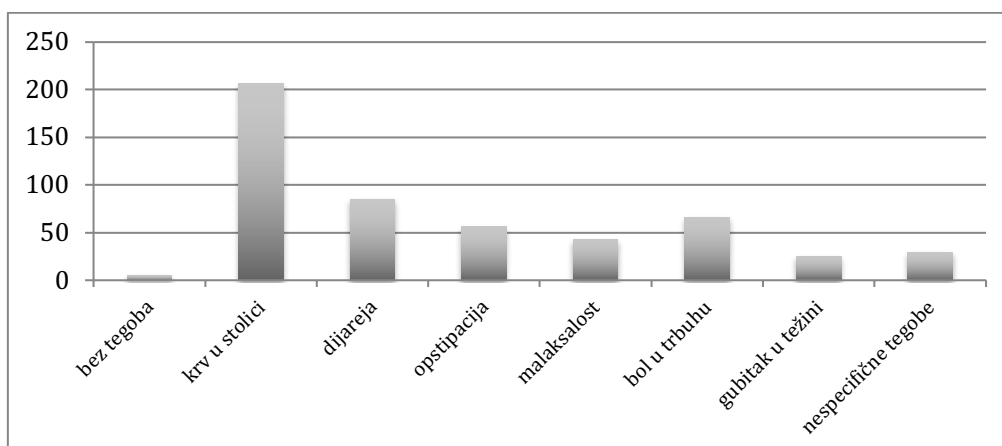
#### 4.1.1. Epidemiološke karakteristike pacijenata sa KRK

U grupi bolesnika sa KRK osnovno obrazovanje imalo je njih 100 (19%), srednje obrazovanje 242 (46%), dok je 151 (29%) bolesnik sa KRK bio visoko obrazovan. Podatke o svom obrazovanju ili nepotpune podatke nije omogućio svega 31 bolesnik (6%).



**Figura 11.** Podaci o obrazovanju bolesnika sa KRK

Pre postavljanja dijagnoze bez ikakvih tegoba bilo je svega 6 bolesnika (1%), najveći broj bolesnika, njih 207, imao je tegobe u vidu prisustva krvi u stolici (40%), promene u crevnom pražnjenju u vidu dijareje 86 bolesnika (16%), ili opstipacije 57 (11%), opšte slabosti i malaksalosti 44 bolesnika (8%), bolova u trbuhu 67 (13%), primetnog gubitka u telesnoj težini 26 (5%), dok je nespecifične tegobe imalo 30 bolesnika (6%).



**Figura 12.** Podaci o tegobama bolesnika sa KRK

FOBT test je pre dijagnostikovanja KRK uradilo 308 bolesnika, dok 215 bolesnika nije radilo FOBT, već druge vidove skrininga, fleksibilnu rektosigmoidoskopiju ili kolonoskopiju. Test je bio pozitivan kod 307 bolesnika, dok je kod 1 bolesnika test bio negativan.

Od 523 bolesnika sa KRK, njih 6 je prethodno bolovalo od inflamatornih bolesti creva.

Godinu dana pre dijagnostikovanja KRK 106 (20%) bolesnika svakodnevno je koristilo aspirin zbog svojih drugih komorbiditeta, najčešće hipertenzije.

Veliki broj bolesnika, čak 297 (57%) imalo je neku abdominalnu operaciju pre dijagnostikovanja KRK, najčešće holecistektomiju (70%).

Pozitivnu porodičnu anamnezu na KRK imalo je 115 (22%) bolesnika.

#### **4.1.2. Patološka diferencijacija tumora kod bolesnika sa KRK**

U grupi bolesnika sa KRK, kod 277 (55%) tumor je bio lokalizovan u rektumu, dok je kod njih 225 tumor bio lokalizovan u kolonu (45%). Od toga 110 (22%) bolesnika imalo je lokalizaciju tumora u sigmoidnom kolonu, 26 bolesnik (5%) imao je tumor lokalizovan u descedentnom kolonu, 29 bolesnika (6%) u transverzumu, 29 bolesnika (6%) u ascendentnom kolonu, 31 (6%) u cekumu.

Patološka diferencijacija tumora prikazana je na Tabeli 4.

Dobro diferentovan tumor imalo je 385 (77%) bolesnika, srednje diferentovan 96 (19%) bolesnika, dok je slabo diferentovan tumor imalo 21 (4%) bolesnika.

Kod najvećeg broja bolesnika sa KRK dijagnostikovano je T stadijum 3, 245 (49%), značajno manji broj bio je u stadijumu 1 (78, 15%) odnosno stadijumu 2 (85, 17%), dok je u stadijumu 4 bilo 94 bolesnika (19%).

Zahvaćeni limfni nodusi pronađeni su kod 245 bolesnika, od toga u stadijumu N1 koji je podrazumevao zahvaćenost 1-3 nodusa bilo je 129 bolesnika (26%), dok je u stadijumu N2 bilo 116 bolesnika (23%).

Udaljene metastaze dijagnostikovane su kod 89 bolesnika (18%).

Limfovaskularna invazija bila je prisutna kod 220 bolesnika (46%), dok kod 258 bolesnika (54%) nije utvrđeno postojanje limfovaskularne invazije.

Perineuralna invazija bila je prisutna kod 113 bolesnika (24%).

Kada je izvršena detaljna TNM klasifikacija, u stadijumu I bilo je 130 bolesnika (26%), u stadijumu II 112 bolesnika (22%) u stadijumu III 156 (31%) i u stadijumu IV 89 bolesnika (14%).

Kao Dukes A klasifikovano je 117 bolesnika (22%), Dukes B 133 (26%), Dukes C 164 (31%) i Dukes D 57 (6%).

Klasifikacijom po Astler Colleru, u stadijumu A1 bilo je 69 (14%), B1 55 (11%), B2 125 (25%), C1 22 (4%), C2 142 (28%), C3 58 (12%) bolesnika.

Prosečna veličina tumora bila je oko 64mm, sa najmanjim promerom od 7mm, a najvećim promerom od 95mm.

**Tabela 4.** Patohistološke karakteristike pacijenata sa KRK

Patološke karakteristike	N (%)
<b>Lokalizacija</b>	
Rektum	277 (55)
Kolon	225 (45)
<b>Patološka diferencijacija</b>	
Dobra	385 (77)
Umerena	96 (19)
Slaba	21 (4)
<b>T stadijum</b>	
1	78 (15)
2	85 (17)
3	245 (49)
4	94 (19)
<b>N stadijum</b>	
0	256 (51)
1	129 (26)
2	116 (23)
<b>Metastaze</b>	
0	413 (82)
1	89 (18)
<b>TNM Stadijum</b>	
I	130 (26)
II	112 (22)
III	156 (31)
IV	89 (14)
<b>Limfovaskularna invazija</b>	
0	258 (54)
1	220 (46)
<b>Perineuralna invazija</b>	
0	365 (76)
1	113 (24)
<b>Dukes skor</b>	
A	117 (25)
B	133 (28)
C	164 (35)
D	57 (12)
<b>Astler Collar skor</b>	
A	69 (15)
B1	55 (12)
B2	125 (27)
C1	22 (5)
C2	142 (30)
C3	58 (12)

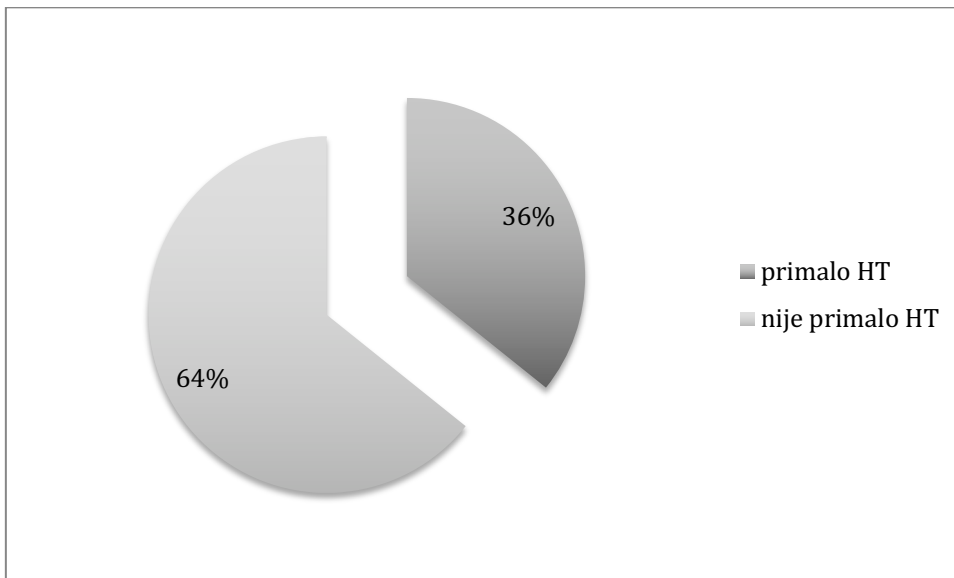
#### **4.1.3. Terapija bolesnika sa KRK**

Nakon hirurškog lečenja neki vid hemioterapije primalo je 187 bolesnika (36%). Nakon postavljanja dijagnoze karcinoma rektuma zračnu terapiju primalo je 96 bolesnika (18%).

Kapцитabin bio je terapeutik izbora kod 47 bolesnika (9%) nakon hirurškog lečenja.

5FU/LV primalo je 149 bolesnika (29%), dok je Oksaliplatinu primalo 70 bolesnika (14%).

U svom terapijskom protokolu Bevacizumab je primalo 13 bolesnika (3%), dok je Irinotekanom lečeno 15 bolesnika (3%). Svega jedan bolesnik u svom protokolu imao je Cetuksimab.



**Figura 13.** Distribucija pacijenata sa KRK koji je primao HT

#### **4.2. ULOGA GST GENOTIPA U RIZIKU ZA NASTANAK KRK**

Učestalost *GST* genotipova, kao i njihova uloga u riziku za nastanak KRK prikazani su u Tabeli 5. Rezultati su pokazali da osobe sa *GSTM1-nultim* i *GSTA1 CT+TT* nemaju povećan rizik od razvoja KRK.

Međutim, osobe sa *GSTT1-nultim* i *GSTP1 IleVal+ValVal* genotipom imaju značajno veći rizik od razvoja KRK. Naime nosioci *GSTT1-nultog* genotipa su 1.35 puta pod većim rizikom od razvoja KRK u poređenju sa osobama koji imaju *GSTT1-aktivni* genotip (OR = 1.35, 95%CI: 0.99-1.83, p = 0.050). Individue sa *GSTP1 IleVal+ValVal* genotipom imaju 1.39 puta veći rizik od razvoja KRK (95%CI: 1.07-1.82, p=0.016).

**Tabela 5. GST genotipovi i rizik od nastanka KRK**

<b>GST genotip</b>	<b>KRK pacijenti n, %</b>	<b>Kontrolna grupa n, %</b>	<b>OR (95%CI)<sup>e</sup></b>	<b>P vrednost</b>	<b>Prilagođen OR (95%CI)<sup>g</sup></b>	<b>P vrednost</b>
<b>GSTM1</b>						
<i>aktivni<sup>a</sup></i>	249 (49)	204 (49)	1.00 <sup>f</sup>		1.00 <sup>e</sup>	
<i>nulti<sup>b</sup></i>	260 (51)	195 (51)	1.09 (0.84-1.42)	0.509	1.14 (0.85-1.47) <sup>g</sup>	0.362
<b>GSTA1 (rs 3957357)</b>						
<i>CC (aktivni)</i>	186 (36)	160 (40)	1.00 <sup>f</sup>		1.00 <sup>e</sup>	
<i>CT+TT (smanjene aktivnosti)<sup>c</sup></i>	326 (64)	236(60)	1.19 (0.91-1.56)	0.210	1.17 (0.88-1.56) <sup>g</sup>	0.274
<b>GSTT1</b>						
<i>aktivni<sup>a</sup></i>	145 (29)	91 (23)	1.00 <sup>f</sup>		1.00 <sup>e</sup>	
<i>nulti<sup>b</sup></i>	364 (71)	308 (77)	1.35 (0.99-1.83)	0.050	1.26 (0.91-1.73) <sup>g</sup>	0.161
<b>GSTP1 (rs1695)</b>						
<i>IleIle (referentni)</i>	185 (37)	181 (45)	1.00 <sup>f</sup>		1.00 <sup>e</sup>	
<i>IleVal+ValVal (varijantni)<sup>d</sup></i>	309 (63)	217 (55)	1.39 (1.07-1.82)	0.016	1.43 (1.08-1.89) <sup>g</sup>	0.013

<sup>a</sup>Aktivni, ako je bar jedan aktivan alel prisutan <sup>b</sup>Nulti, nijedan aktivni alel nije prisutan; <sup>c</sup>Varijantni, ako je bar jedan Val alel prisutan; <sup>d</sup>Smanjene aktivnosti ako je bar jedan T alel prisutan; <sup>e</sup>OR odnos šansi; <sup>f</sup>Referentna grupa; <sup>g</sup>OR odnos šansi prilagođen godinama, polu i BMI; CI, interval poverenja; Delecija *GSTM1* i *GSTT1* genotipa analizirana kod 523 pacijenta i svih kontrola. SNP polimorfizam *GSTA1*\*C69T i *GSTP1*\*Ile105Val analizirana kod 523 pacijenta i svih kontrola.

#### 4.2.1. Kombinovani efekat GST genotipova na rizik za nastanak KRK

Tokom ovog istraživanja ispitivan je i kombinovani efekat GST genotipova na rizik za nastanak KRK (Tabela 7). Kada je ispitivan kombinovani uticaj bilo koja dva od *GSTM1*, *GSTA1* i *GSTT1* genotipa međusobno, nije uočen povećan rizik od nastanka KRK ( $p > 0.05$ ).

Međutim statistički značajna povezanost pronađena je kod svih kombinacija *GSTP1*-varijantnog genotipa i bilo kog od preostala tri *GST* genotipa (*GSTP1* varijantni i *GSTM1*-nulti: OR = 1.53, 95%CI: 1.01-2.18,  $p=0.03$ ; *GSTP1*-varijantni i *GSTA1*-smanjene aktivnosti: OR = 1.83, 95%CI: 1.22-2.75,  $p=0.004$ ; *GSTP1*-varijantni i *GSTT1*-aktivni: OR = 1.95, 95%CI: 1.27-2.99,  $p=0.002$ ) u poređenju sa referentnom kombinacijom genotipa.

Nadalje, kada je analiziran kombinovani efekat tri genotipa, statistički značajna povezanost uočena je kod sve tri kombinacije koje su uključivale *GSTP1*-varijantni genotip: *GSTM*-nulti/*GSTT1*-aktivni/*GSTP1*-varijantni OR = 2.07, 95%CI: 1.06-4.02,  $p=0.03$ ; *GSTM*-nulti/*GSTA1*-smanjene aktivnosti /*GSTP1*-varijantni OR= 2.24, 95%CI: 1.24-4.04,  $p=0.001$  i *GSTT1*-aktivni/*GSTA1*-smanjene aktivnosti/*GSTP1*-varijantni OR= 2.62, 95%CI: 1.41-4.87,  $p=0.001$ .



**Tabela 6.** Kombinovani efekat dva *GST* genotipa na rizik od nastanka KRK

Kombinovani genotip	KRK pacijenti, n %	Kontrolna grupa, n%	OR (95%CI) <sup>e</sup>	p-vrednost	Prilagođen OR (godine, pol, bmi) (95%CI) <sup>g</sup>	p-vrednost
<b><i>GSTM1/GSTP1</i> genotip</b>						
<i>GSTM1</i> -aktivni <sup>a</sup> / <i>GSTP1</i> -referentni	88 (36)	88 (46)	1.00 <sup>f</sup>		1.00 <sup>f</sup>	
<i>GSTM</i> -nulti <sup>b</sup> / <i>GSTP1</i> -varijantni <sup>c</sup>	156 (64)	102 (54)	1.53 (1.01-2.18)	0.031	1.66 (1.11-2.53) <sup>g</sup>	0.014
<b><i>GSTA1/GSTP1</i> genotype</b>						
<i>GSTA1</i> -aktivni <sup>a</sup> / <i>GSTP1</i> -referentni	59 (24)	77 (36)	1.00 <sup>f</sup>		1.00 <sup>f</sup>	
<i>GSTA1</i> - smanjene aktivnosti <sup>d</sup> / <i>GSTP1</i> -varijantni <sup>c</sup>	185 (76)	132 (64)	1.83 (1.22-2.75)	0.004	1.85 (1.21-2.84) <sup>g</sup>	0.005
<b><i>GSTT1/GSTP1</i> genotype</b>						
<i>GSTT1</i> - aktivni <sup>a</sup> / <i>GSTP1</i> -referentni	129 (60)	139 (73)	1.00 <sup>f</sup>		1.00 <sup>f</sup>	
<i>GSTT1</i> - nulti <sup>b</sup> / <i>GSTP1</i> -varijantni <sup>c</sup>	87 (40)	51 (27)	1.95 (1.27-2.99)	0.002	1.79 (1.14-2.80) <sup>g</sup>	0.011

<sup>a</sup>Aktivni, ako je bar jedan aktivan alel prisutan <sup>b</sup>Nulti, nijedan aktivan alel nije prisutan; <sup>c</sup>Varijantni, ako je bar jedan Val alel prisutan; <sup>d</sup>Smanjene aktivnosti ako je bar jedan T alel prisutan; <sup>e</sup>OR odnos šansi; <sup>f</sup>Referentna grupa; <sup>g</sup>OR odnos šansi prilagođen godinama, polu i BMI; CI, interval poverenja

**Tabela 7.** Kombinovani efekat tri *GST* genotipa na rizik od nastanka KRK

Kombinovani genotip	KRK pacijenti, n %	Kontrolna grupa, n%	OR (95%CI) <sup>e</sup>	p-vrednost	prilagođen OR (95%CI) <sup>g</sup>	p-vrednost
<b><i>GSTM1/GSTT1/GSTA1</i> genotip</b>						
<i>GSTM1</i> -aktivni <sup>a</sup> / <i>GSTT1</i> -aktivni/ <i>GSTA1</i> -aktivni	57 (60)	59 (70)	1.00 <sup>f</sup>		1.00 <sup>f</sup>	
<i>GSTM</i> -nulti <sup>b</sup> / <i>GSTT1</i> -nulti/ <i>GSTA1</i> - smanjene aktivnosti	38 (40)	25 (30)	1.57 (0.84-2.93)	0.153	1.48 (0.77-2.85)	0.243
<b><i>GSTM1/GSTA1/GSTP1</i> genotip</b>						
<i>GSTM1</i> -aktivni <sup>a</sup> / <i>GSTA1</i> -aktivni/ <i>GSTP1</i> -referentni	26 (22)	39 (38)	1.00 <sup>f</sup>		1.00 <sup>f</sup>	
<i>GSTM</i> -nulti <sup>b</sup> / <i>GSTA1</i> - smanjene aktivnosti <sup>d</sup> / <i>GSTP1</i> -varijantni <sup>c</sup>	94 (78)	63 (62)	2.24 (1.24-4.04)	<0.001	2.37 (1.27-4.40)	0.001
<b><i>GSTM1/GSTT1/GSTP1</i> genotip</b>						
<i>GSTM1</i> -aktivni <sup>a</sup> / <i>GSTT1</i> -aktivni/ <i>GSTP1</i> - referentni	35 (36)	18 (19)	1.00 <sup>f</sup>		1.00 <sup>f</sup>	
<i>GSTM</i> -nulti <sup>b</sup> / <i>GSTT1</i> -nulti/ <i>GSTP1</i> -varijantni <sup>c</sup>	63 (64)	67 (81)	2.07 (1.06-4.02)	0.032	2.06 (0.99-4.27)	0.05
<b><i>GSTT1/GSTA1/GSTP1</i> genotip</b>						
<i>GSTT1</i> -aktivni <sup>a</sup> / <i>GSTA1</i> -aktivni/ <i>GSTP1</i> - referentni	38 (44)	58 (67)	1.00 <sup>f</sup>		1.00 <sup>f</sup>	
<i>GSTT1</i> -nulti <sup>b</sup> / <i>GSTA1</i> - smanjene aktivnosti <sup>d</sup> / <i>GSTP1</i> -varijantni <sup>c</sup>	48 (56)	28 (33)	2.62 (1.41-4.87)	<0.001	2.23 (1.14-4.39)	0.020

<sup>a</sup>Aktivni, ako je bar jedan aktivan alel prisutan <sup>b</sup>Nulti, nijedan aktivan alel nije prisutan; <sup>c</sup>Varijantni, ako je bar jedan Val alel prisutan; <sup>d</sup>Smanjene aktivnosti ako je bar jedan T alel prisutan; <sup>e</sup>OR odnos šansi; <sup>f</sup>Referentna grupa; <sup>g</sup>OR odnos šansi prilagođen godinama, polu i BMI; CI, interval poverenja

Kada je ispitivana kombinacija sva četiri *GST* genotipa koji se mogu dovesti u vezu sa rizikom za nastanak KRK, uočen je trend porasta OR sa najvećim rizikom od 2,71 puta (95%CI: 1.06-6.91,  $p = 0.037$ ) kod osoba koji su nosioci *GSTM1-nulti/GSTT1-nulti/GSTA1-smanjene aktivnosti/GSTP1-varijantni* genotipa u odnosu na referentnu kombinaciju genotipova.

**Tabela 8.** Kumulativni efekat *GST* genotipova udruženih sa rizikom za nastanak KRK

Broj <i>GST</i> genotipova udruženih sa rizikom za nastanak KRK	KRK pacijenti n, %	Kontrolna grupa n, %	OR (95%CI) <sup>a</sup>	p-vrednost
0	27 (3.9)	19 (6.8)	1.00 <sup>b</sup>	
1	107 (21.8)	115 (29.1)	1.32 (0.69-2.51)	0.395
2	215 (43.8)	152 (38.5)	2.01 (1.08-3.74)	0.028
3	129 (26.3)	90 (22.8)	2.04 (1.07-3.85)	0.031
4	21 (4.3)	11 (2.8)	2.71 (1.06-6.91)	0.037

0: Kombinacija referentnog genotipa (*GSTM1-aktivni/GSTT1-aktivni/GSTA1-aktivni/GSTP1-wild type*); 1, 2, 3, 4: Broj prisutnih rizičnih genotipa: ili jedan od rizičnih genotipa, dva, tri ili četiri *GST* genotipa (*GSTM1-nulti* ili *GSTT1-nulti* ili *GSTA1-smanjene aktivnosti* ili *GSTP1-varijantni*);  
<sup>a</sup>OR odnos šansi; CI, interval poverenja; <sup>b</sup>Referentna grupa;

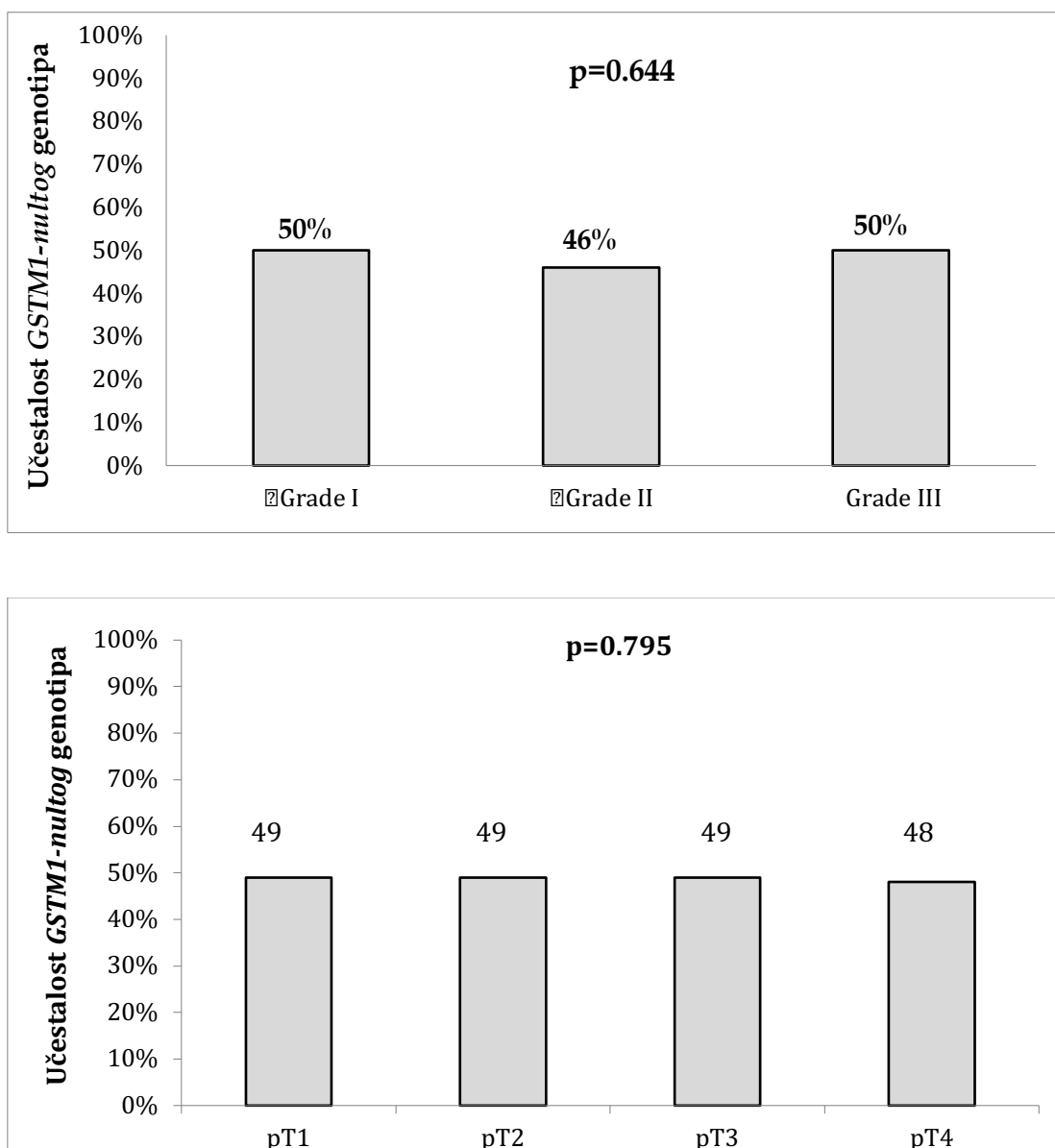
#### **4.2.2. Povezanost *GST* genotipova i biohemijskih markera kod pacijenata sa KRK**

Ispitivanjem da li postoji statistički značajna razlika u vrednostima CEA kod bolesnika sa *GSTM1-aktivnim* u odnosu na *GSTM1-nulti* genotip, nije uočeno postojanje statistički značajne razlike (229.62 vs 236.16;  $p>0.05$ ), kao ni kod bolesnika sa *GST1-aktivnim* u odnosu na *GSTT1-nulti* genotip (235.36 vs 226.99;  $p>0.05$ ). Nije uočeno postojanje statistički značajne razlike u vrednostima CEA kod pacijenata sa *GSTA1-aktivnim* u odnosu na pacijente sa *GSTA1-smanjene aktivnosti* genotipom (248.47 vs 226.75;  $p>0.05$ ), kao ni kod pacijenata sa *GSTP1-referentnim* u odnosu na pacijente sa *GSTP1-varijantnim* genotipom (211.61 vs 235.38;  $p>0.05$ ).

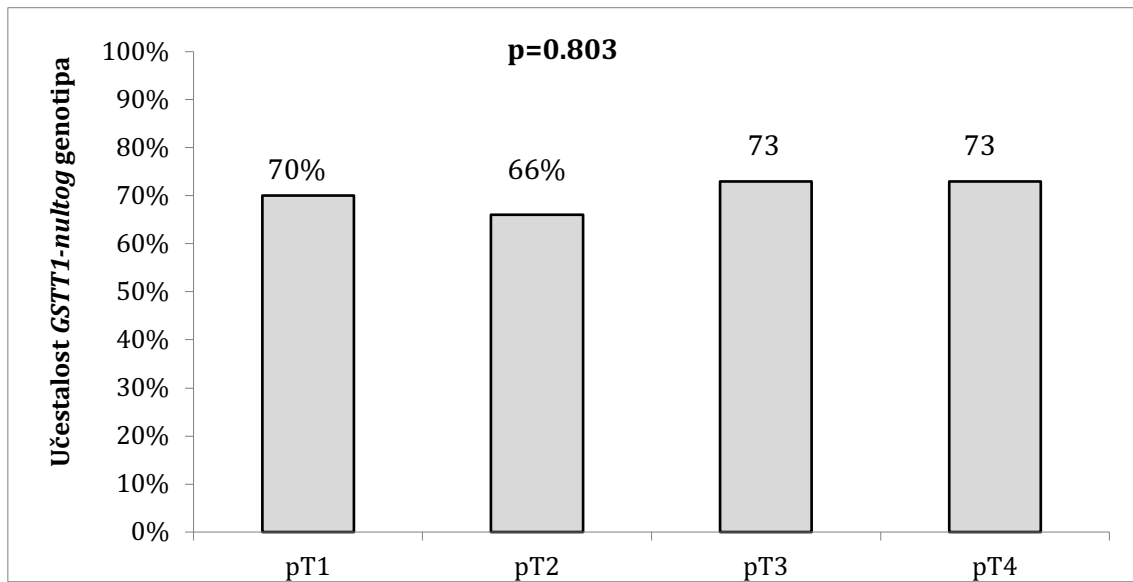
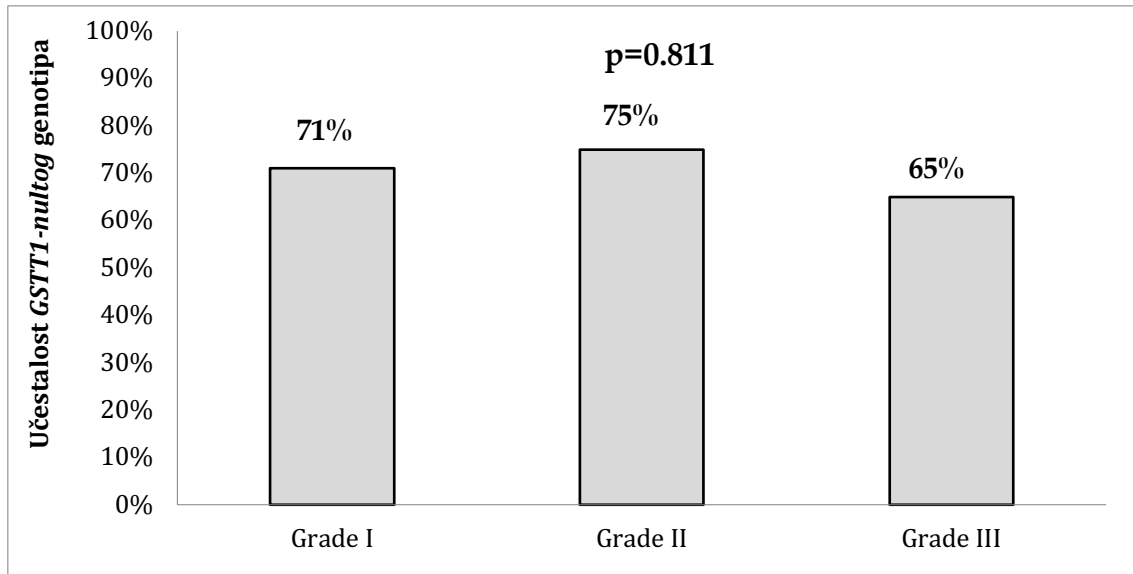
Ispitivanjem da li postoji statistički značajna razlika u vrednostima CA 19-9 kod bolesnika sa *GSTM1-aktivnim* u odnosu na *GSTM1-nulti* genotip, nije uočeno postojanje statistički značajne razlike (235.45 vs 231.66;  $p>0.05$ ), kao ni kod bolesnika sa *GST1-aktivnim* u odnosu na *GSTT1-nulti* genotip (226.01 vs. 252.64;  $p>0.05$ ). Nije uočeno postojanje statistički značajne razlike u vrednostima CA 19-9 kod pacijenata sa *GSTA1-aktivnim* u odnosu na pacijente sa *GSTA1- smanjene aktivnosti* genotipom (230.57 vs 237.45;  $p>0.05$ ) kao ni kod pacijenata sa *GSTP1-referentnim* u odnosu na pacijente sa *GSTP1-varijantnim* genotipom (229.19 vs 224.76;  $p>0.05$ ).

#### 4.2.3. Povezanost *GST* genotipova i fenotipskih karakteristika KRK

Ispitivan je mogući uticaj *GST* genotipova na stepen patološke diferencijacije i progresije KRK i utvrđeno je da kod polimorfizama *GSTM1* i *GSTT1* ne postoji statistički značajna povezanost sa stepenom patološke diferencijacije i progresije bolesti (Figura 14, Figura 15).

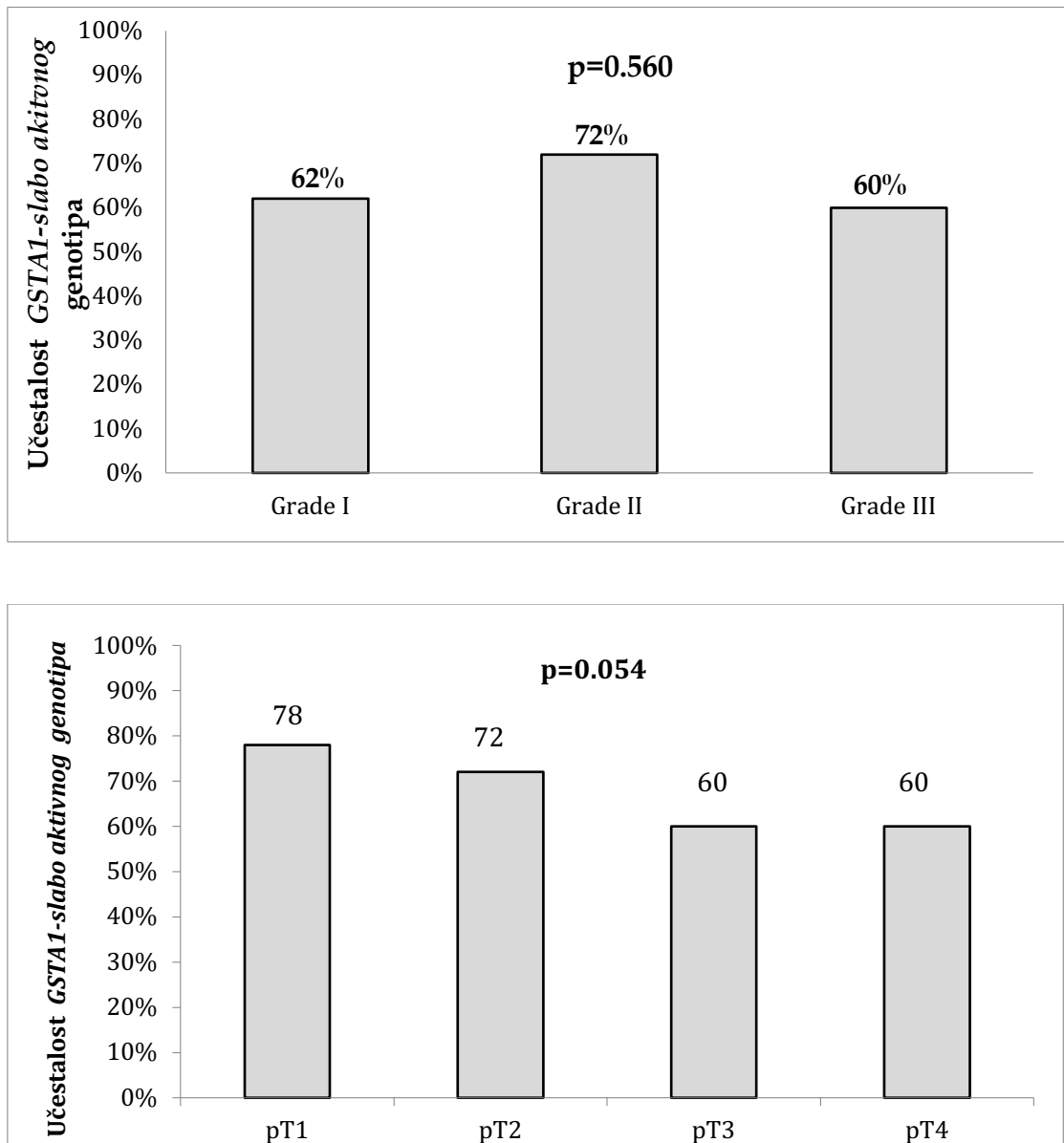


**Figura 14.** Učestalost *GSTM1*-nultog genotipa kod pacijenata sa KRK stratifikovano prema: a. patološkoj diferencijaciji b. T stadijumu



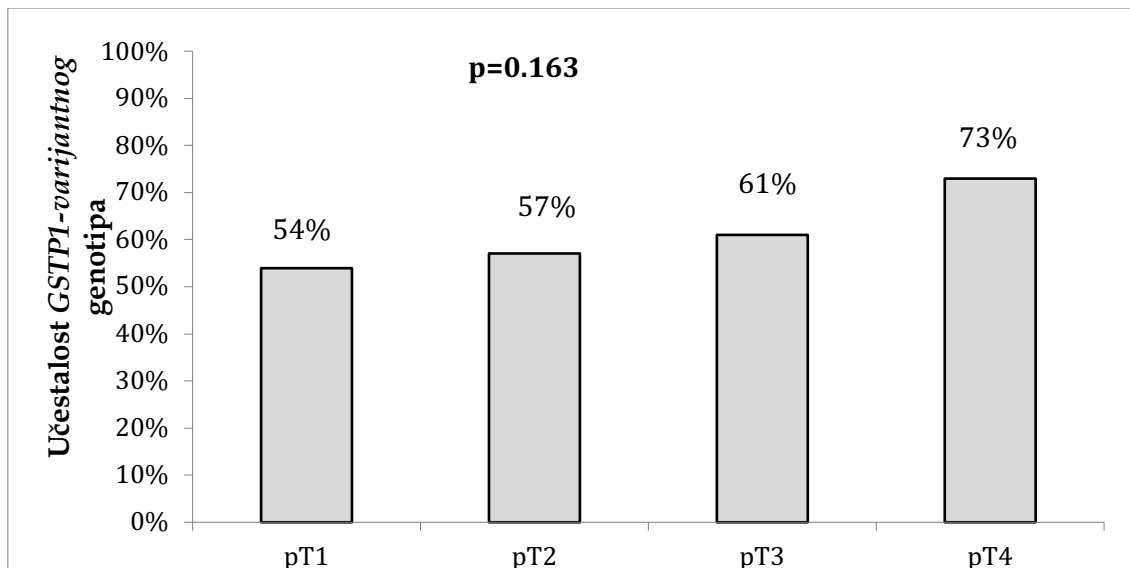
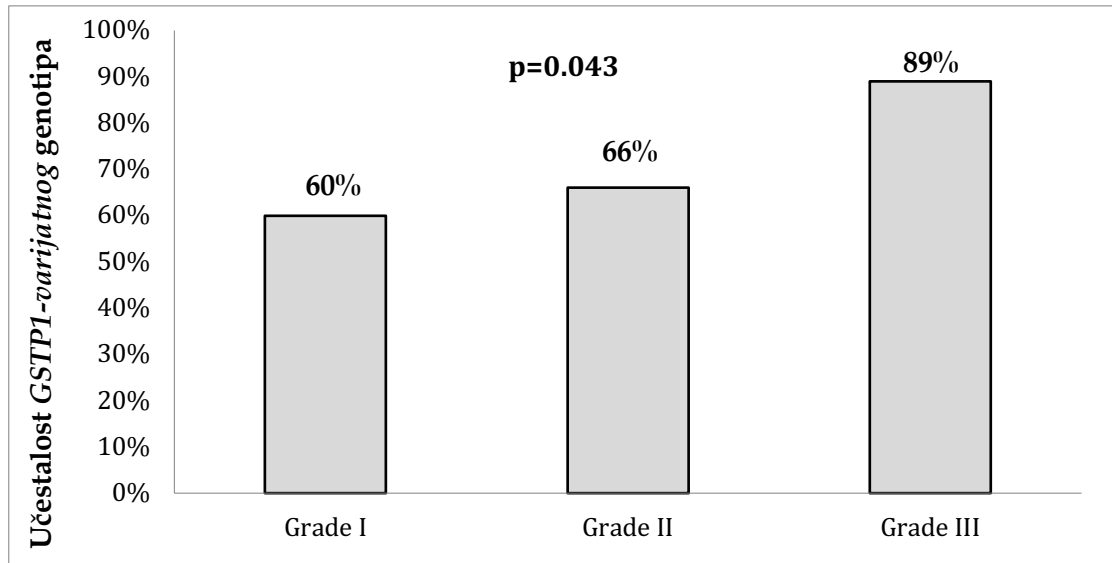
**Figura 15.** Učestalost *GSTT1*-nultog genotipa kod pacijenata sa KRK stratifikovano prema: a. patološkoj diferencijaciji b. T stadijumu

Međutim kada je analizirana povezanost *GSTA1*-smanjene aktivnosti genotipa sa stepenom diferencijacije tumora kao i stadijumom tumora, uočeno je postojanje granične statistički značajne razlike između T1 stadijuma u odnosu na ostale ( $p=0.054$ , Figura 16).



**Figura 16.** Učestalost *GSTA1*- smanjene aktivnosti genotipa kod pacijenata sa KRK stratifikovano prema: a. patološkoj diferencijaciji b. T stadijumu

Nadalje, značajna povezanost uočena je u slučaju *GSTP1* genotipa i stepena patološke diferencijacije tumora, gde je najveći broj pacijenata (89%) sa slabom diferencijacijom imao *GSTP1*-varijantni genotip (Figura 17). Takođe, trend porasta u učestalosti *GSTP1*-varijantnog genotipa uočen je kada je ispitivana povezanost sa stadijumom tumora.



**Figura 17.** Učestalost *GSTP1*-varijantnog genotipa kod pacijenata sa KRK

stratifikovano prema: a. patološkoj diferencijaciji b. T stadijumu

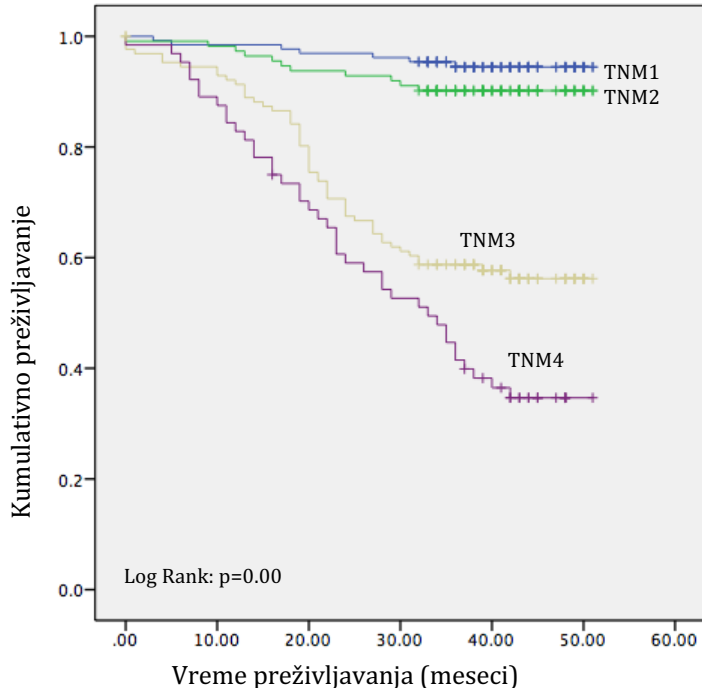


### 4.3. Preživljavanje

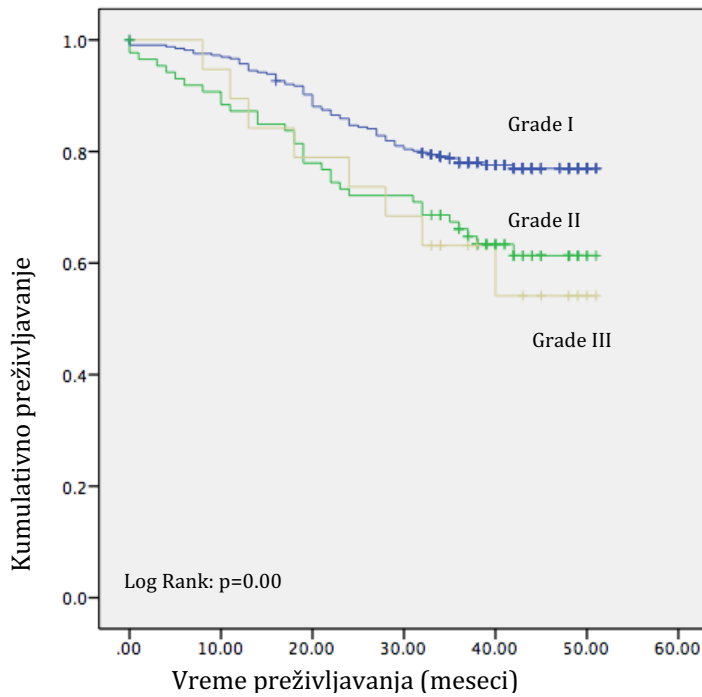
U Tabeli 9. prikazane su demografske karakteristike ispitanika i patološke karakteristike tumora prema statusu praćenja. Ukupno 523 bolesnika sa KRK bilo je uključeno u studiju praćenja. Prosečna dužina praćenja iznosila je  $34.88 \pm 12.31$  meseci, sa minimumom od 0 meseci do 52 meseca). U periodu praćenja zabeležen je 131 smrtni ishod (25%). Nažalost sa 52 bolesnika u ovom periodu izgubljen je kontakt, te su podaci o njihovom preživljavanju nepouzdana (9.9%).

**Tabela 9.** Karakteristike ispitanika i karakteristike patohistološkog nalaza tumora stratifikovane prema statusu praćenja

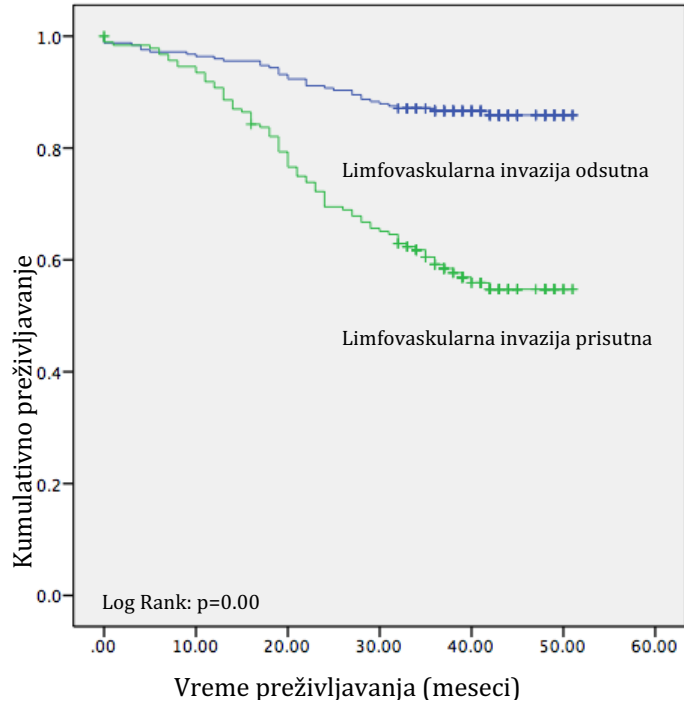
	Živi n, %	Preminuli, n %	p-vrednost
<b>Pol</b>			
Muški	202 (71%)	81 (29%)	0.389
Ženski	137 (75%)	45 (25%)	
<b>Godine</b>	$62.42 \pm 10.47$	$62.71 \pm 13.09$	0.815
<b>Lokalizacija</b>			
Levi kolon	52 (78%)	15 (22%)	0.001
Desni kolon	270 (73%)	98 (27%)	
<b>TNM</b>			
I	123 (95%)	7 (5%)	0.001
II	101 (90%)	11 (10%)	
III	74 (58%)	54 (42%)	
IV	23 (36%)	41 (64%)	
<b>Gradus</b>			
Dobro dif.	255 (78%)	72 (22%)	0.004
Srednje dif.	55 (63%)	32 (37%)	
Slabo dif.	11 (58)	8 (42)	
<b>Limfovaskularna inv.</b>			
Odsutna	214 (86%)	34 (14%)	0.001
Prisutna	107 (58%)	79 (42%)	
<b>Perineuralna inv.</b>			
Odsutna	278 (82%)	59 (18%)	0.001
Prisutna	43 (44%)	54 (56%)	



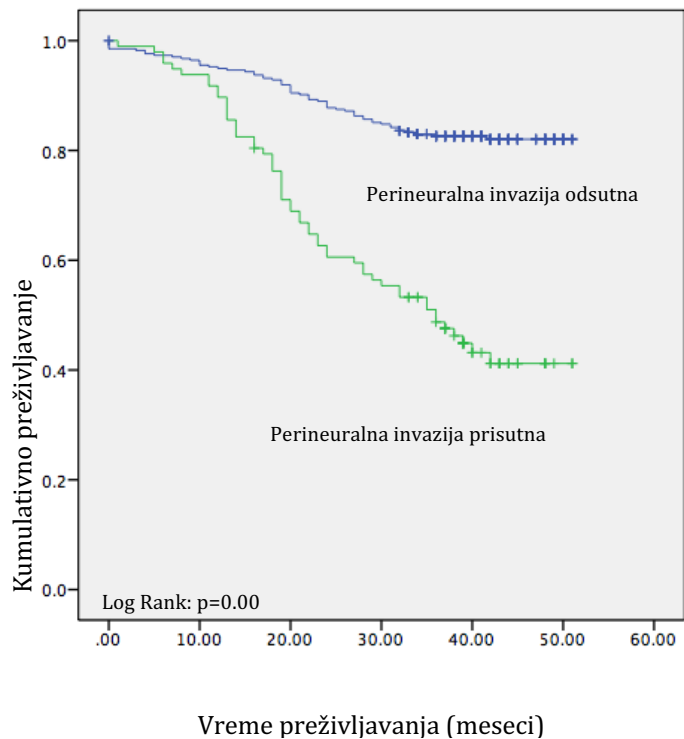
**Figura 18.** Kaplan-Meier krive preživljavanja bolesnika sa KRK stratifikovane po TNM



**Figura 19.** Kaplan-Meier krive preživljavanja bolesnika sa KRK stratifikovane prema patološkoj diferencijaciji



**Figura 20.** Kaplan-Meier krive preživljavanja bolesnika sa KRK stratifikovano po limfovaskularnoj invaziji



**Figura 21.** Kaplan-Meier krive preživljavanja bolesnika sa KRK stratifikovano po limfovaskularnoj invaziji

### 4.3. Povezanost *GST* genotipova sa preživljavanjem bolesnika sa KRK

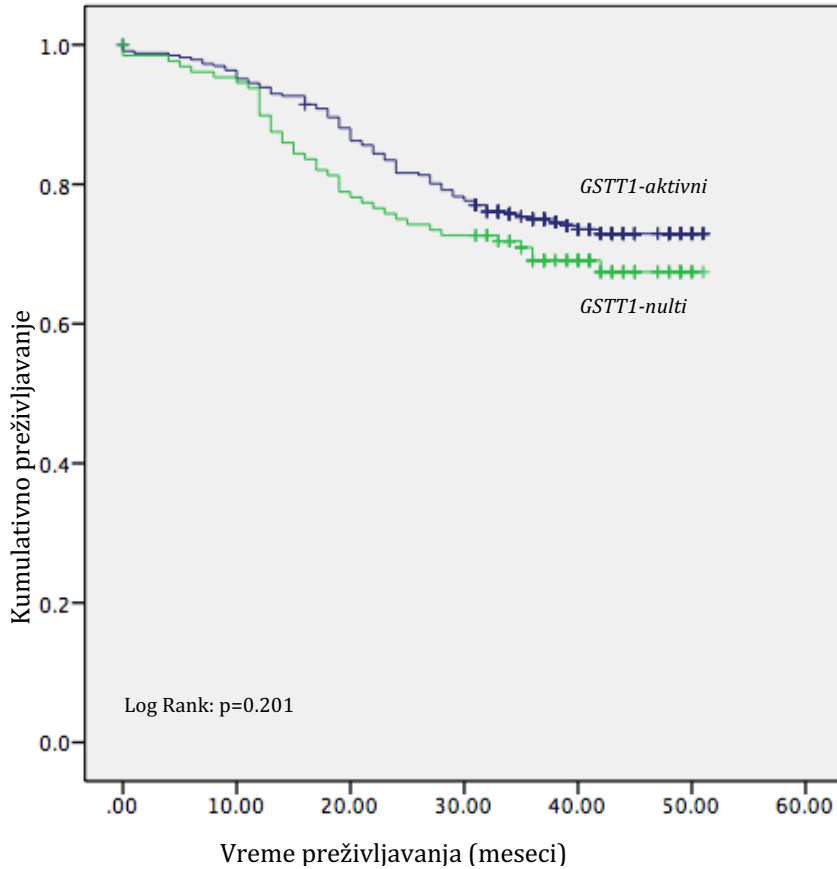
U Tabeli 10. su prikazane učestalosti smrtnog ishoda kod ispitanika nosioca različitih *GST* genotipova. Naime, statistički značajna razlika u preživljavanju uočena je kod nosioca *GSTM1-nultog* i *GSTP1-varijantnog* u odnosu na osobe sa *GSTM1-aktivnim* i *GSTP1-referentnim* genotipom ( $p < 0.05$ ).

**Tabela 10.** Učestalost *GST* genotipova stratifikovan prema statusu praćenja

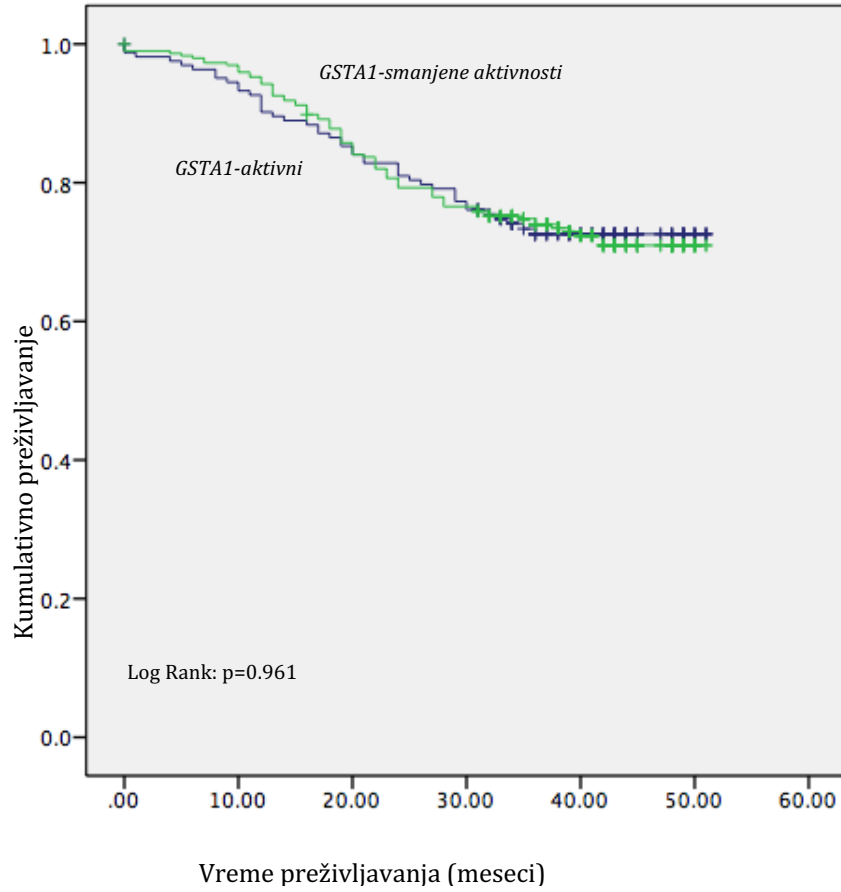
<i>GST</i> genotip	Živi n, %	Preminuli, n %	p-vrednost
<b><i>GSTM1</i></b>			
<i>aktivni</i> <sup>a</sup>	182 (80)	47 (20)	0.001
<i>nulti</i> <sup>b</sup>	150 (66)	79 (34)	
<b><i>GSTT1</i></b>			
<i>nulti</i> <sup>b</sup>	89 (69)	41 (31)	0.246
<i>aktivni</i> <sup>a</sup>	243 (74)	89 (26)	
<b><i>GSTA1</i> (rs 3957357)</b>			
<i>CC (aktivni)</i>	120 (73)	44 (27)	0.913
<i>CT+TT (smanjene aktivnosti)</i> <sup>c</sup>	215 (72)	82 (28)	
<b><i>GSTP1</i> (rs1695)</b>			
<i>IleIle (referentni)</i>	139(80)	35 (20)	0.009
<i>IleVal+ValVal (varijantni)</i> <sup>d</sup>	185 (68)	86 (32)	

<sup>a</sup>Aktivni, ako je bar jedan aktivan alel prisutan <sup>b</sup>Nulti, nijedan aktivan alel nije prisutan; <sup>c</sup>Varijantni, ako je bar jedan Val alel prisutan; <sup>d</sup> Smanjene aktivnosti ako je bar jedan T alel prisutan

Kaplan-Meier analiza ukazala je da kod pacijenata sa GSTT1 genotipom i GSTA1 genotipom, nije postojala statistički značajna razlika u preživljanju (Figura 22 i Figura 23;  $p > 0.05$ ).

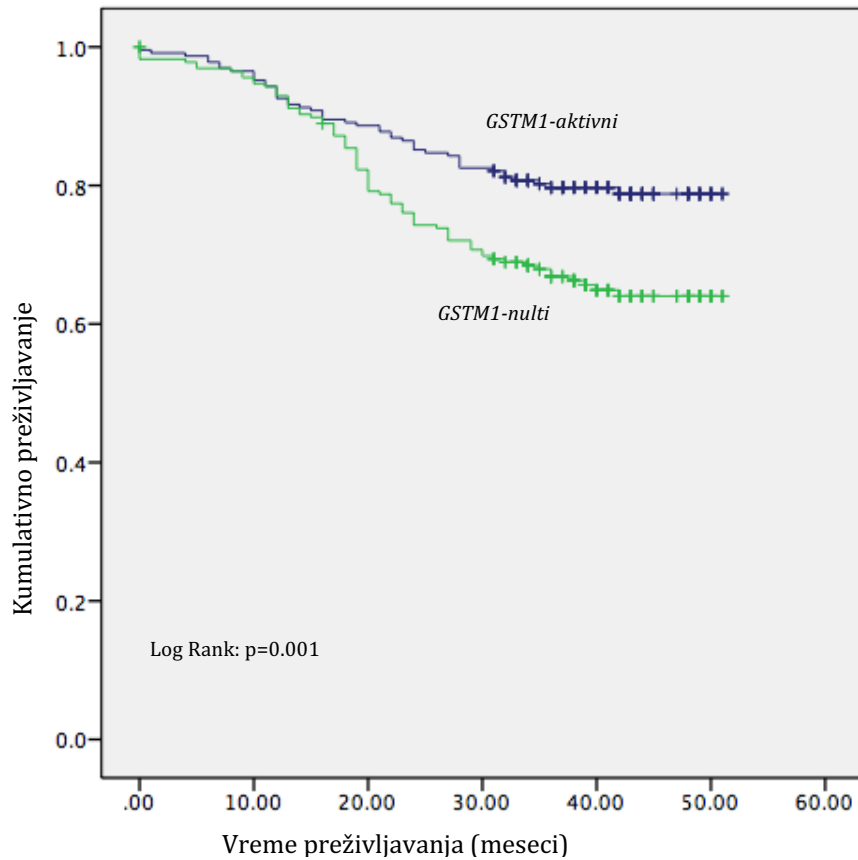


**Figura 22.** Kaplan-Meier krive preživljavanja prema *GSTT1* polimorfizmu; *Aktivni* ukoliko je jedan aktivni alel prisutan; *Nulti* ako ni jedan aktivni alel nije prisutan



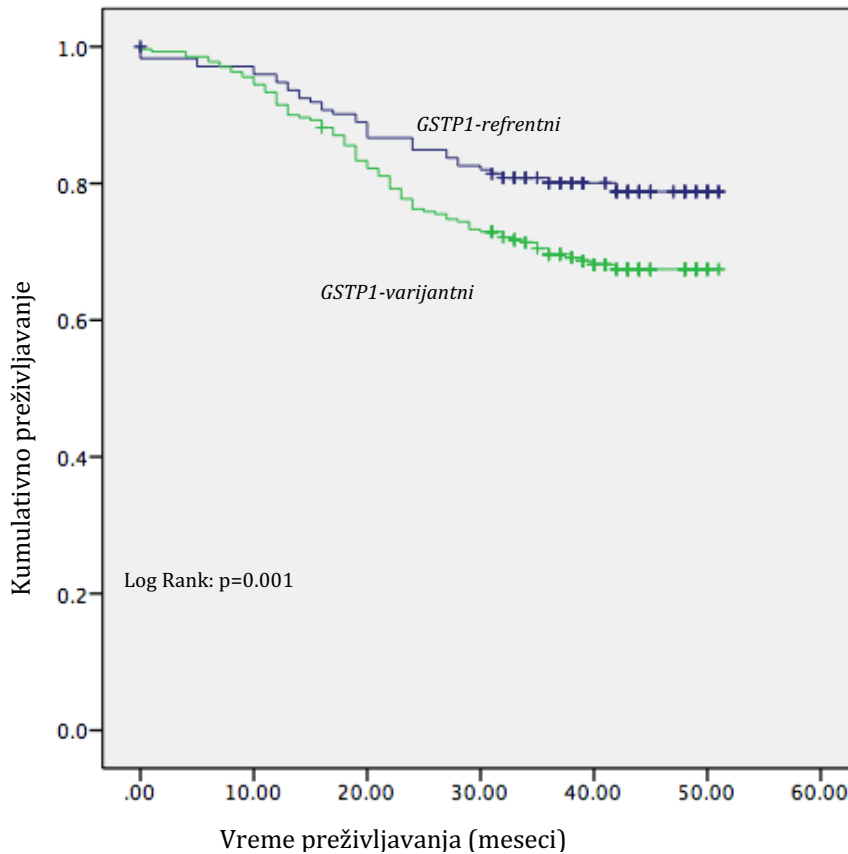
**Figura 23.** Kaplan-Meier krive preživljavanja prema *GSTA1* polimorfizmu;  
*Slabo-aktivan* ako je bar jedan *T* alel prisutan.

Međutim Kaplan-Meier analiza pokazala je da postoji statistički značajna razlika u preživljavanju pacijenata sa *GSTM1* genotipom, naime pacijenti sa *GSTM1-nultim* genotipom imali su značajno lošije ukupno preživljavanje (Figura 24;  $p < 0.01$ ).



**Figura 24.** Kaplan-Meier krive preživljavanja prema *GSTM1* polimorfizmu; *Aktivni* ukoliko je jedan aktivni alel prisutan; *Nulti* ako ni jedan aktivni alel nije prisutan

Takođe, Kaplan-Meier analizom je utvrđeno postojanje statistički značajne razlike u preživljavanju kod pacijenata sa *GSTP1* genotipom ( $p < 0.01$ ). Naime pacijenti nosioci *GSTP1*-varijantnog genotipa imali su statistički značajno lošije preživljavanje (Figura 25;  $p < 0.05$ ).



**Figura 25.** Kaplan-Meier krive preživljavanja prema *GSTP1* polimorfizmu; Varijantni, ukoliko je bar jedan *Val* alel prisutan



Tabele 11-13 prikazuju povezanost različitih *GST* genotipova i ukupnog mortaliteta bolesnika sa KRK, prilagođeno različitim kovarijatama u tri posebna modela. Prema našim rezultatima multivarijantne *Cox* analize *GSTM1-nulti* genotip kao i *GSTP1-varijantni* genotip bili su nezavisni prediktori mortaliteta kod pacijenata sa KRK. Naime, ovi genotipovi imali su značajan HR u sva tri prikazana modela.

Tabela 11. *GST* polimorfizmi kao prediktori mortaliteta pacijenata sa KRK, Model 1

Model 1	
HR (95% CI)	p-vrednost
Rizik od mortaliteta nosioca <i>GSTM1-nultog</i> <sup>a</sup> genotipa u poređenju sa nosiocima <i>GSTM1-aktivnog</i> <sup>b</sup> genotipa	
1.81 (1.22-2.68)	0.003
Rizik od mortaliteta nosioca <i>GSTT1-nultog</i> <sup>a</sup> genotipa u poređenju sa nosiocima <i>GSTT1-aktivnog</i> <sup>b</sup> genotipa	
1.24 (0.82-1.87)	0.301
Rizik od mortaliteta nosioca <i>GSTA1-smanjene aktivnosti</i> <sup>c</sup> genotipa u poređenju sa nosiocima <i>GSTA1-aktivnog</i> <sup>b</sup> genotipa	
1.03 (0.69-1.53)	0.873
Rizik od mortaliteta nosioca <i>GSTP1-varijantnog</i> <sup>d</sup> genotipa u poređenju sa nosiocima <i>GSTP1-referentnog</i> genotipa	
1.53 (0.67-2.46)	0.048

Model 1 prilagođen polu i godinama; <sup>a</sup>*Aktivni*, ako je bar jedan aktivan alel prisutan <sup>b</sup>*Nulti*, nijed aktivan alel nije prisutan; <sup>c</sup>*Smanjene aktivnosti* ako je bar jedan *T* alel prisutan; <sup>d</sup>*Varijantni*, ako je b jedan *Val* alel prisutan; HR, hazard ratio; CI, interval poverenja

Tabela 12. *GST* polimorfizmi kao prediktori mortaliteta pacijenata sa KRK, Model 2

Model 2	
HR (95% CI)	p-value
Rizik od mortaliteta nosioca <i>GSTM1-nultog</i> <sup>a</sup> genotipa u poređenju sa nosiocima <i>GSTM1-aktivnog</i> <sup>b</sup> genotipa	
1.79 (1.21-2.65)	0.004
Rizik od mortaliteta nosioca <i>GSTT1-nultog</i> <sup>a</sup> genotipa u poređenju sa nosiocima <i>GSTT1-aktivnog</i> <sup>b</sup> genotipa	
1.24 (0.82-1.88)	0.300
Rizik od mortaliteta nosioca <i>GSTA1-smanjene aktivnosti</i> <sup>c</sup> genotipa u poređenju sa nosiocima <i>GSTA1-aktivnog</i> <sup>b</sup> genotipa	
1.00 (0.67-1.50)	0.986
Rizik od mortaliteta nosioca <i>GSTP1-varijantnog</i> <sup>d</sup> genotipa u poređenju sa nosiocima <i>GSTP1-referentnog</i> genotipa	
1.57 (1.03-2.39)	0.035

Model 2 prilagođen kovarijatama Modela 1 i poznatih faktora rizika za KRK (pušenje, BMI) <sup>a</sup>*Aktivni*, ako je bar jedan aktivan alel prisutan <sup>b</sup>*Nulti*, nijedan aktivan alel nije prisutan; <sup>c</sup>*Smanjene aktivnosti* ako je bar jedan *T* alel prisutan; <sup>d</sup>*Varijantni*, ako je bar jedan *Val* alel prisutan; HR, hazard ratio; CI, interval poverenja

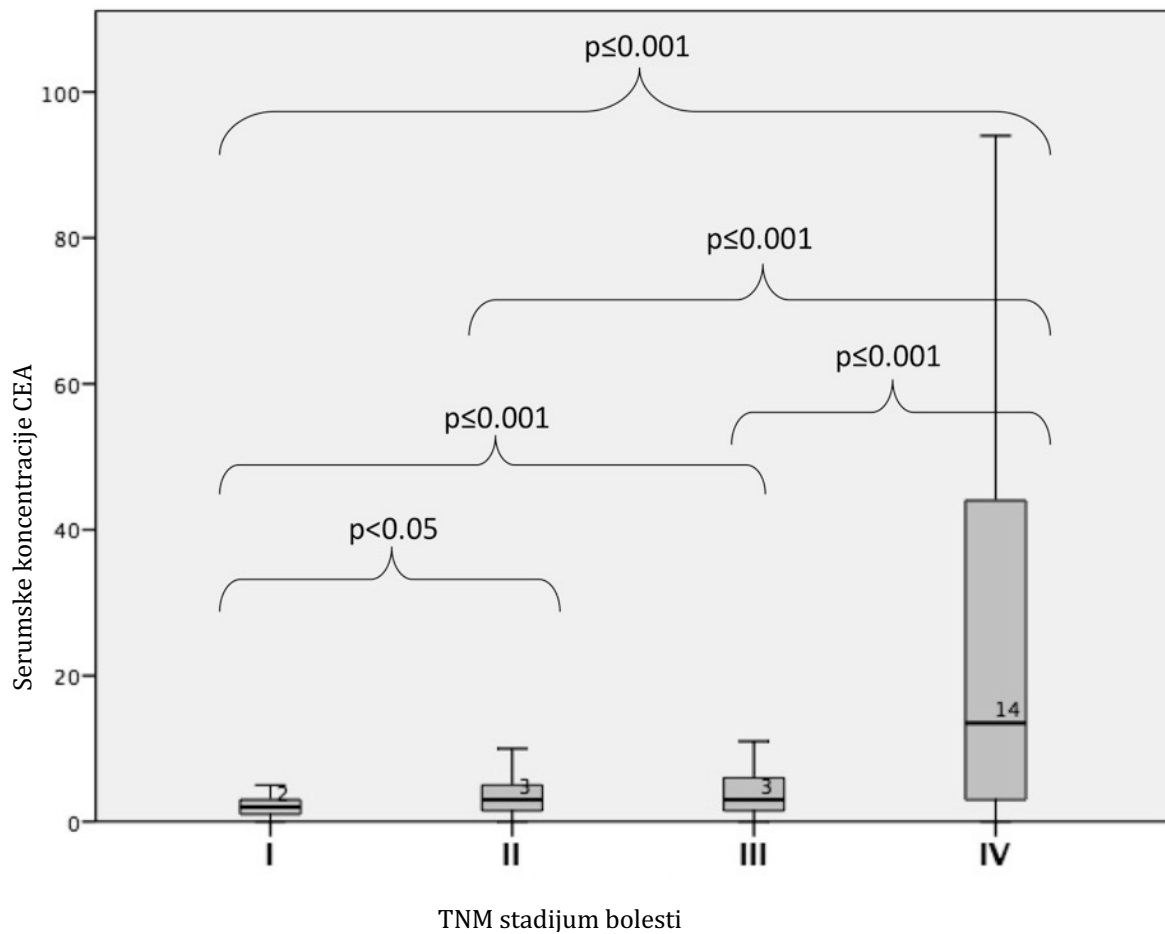
Tabela 13. *GST* polimorfizmi kao prediktori mortaliteta pacijenata sa KRK, Model 3

Model 3	
HR (95% CI)	p-value
Rizik od mortaliteta nosioca <i>GSTM1-nultog</i> <sup>a</sup> genotipa u poređenju sa nosiocima <i>GSTM1-aktivnog</i> <sup>b</sup> genotipa	
1.89 (1.30-2.73)	0.001
Rizik od mortaliteta nosioca <i>GSTT1-nultog</i> <sup>a</sup> genotipa u poređenju sa nosiocima <i>GSTT1-aktivnog</i> <sup>b</sup> genotipa	
1.25 (0.85-1.84)	0.250
Rizik od mortaliteta nosioca <i>GSTA1-smanjene aktivnosti</i> <sup>c</sup> genotipa u poređenju sa nosiocima <i>GSTA1-aktivnog</i> <sup>b</sup> genotipa	
1.02 (0.70-1.48)	0.918
Rizik od mortaliteta nosioca <i>GSTP1-varijantnog</i> <sup>d</sup> genotipa u poređenju sa nosiocima <i>GSTP1-wild type</i> genotipa	
1.47 (0.99-2.20)	0.056

Model 3 prilagođen kovarijatama lokalizacije tumora i stepena diferencijacije <sup>a</sup>*Aktivni*, ako je bar jed aktivan alel prisutan <sup>b</sup>*Nulti*, nijedan aktivan alel nije prisutan; <sup>c</sup>*Smanjene aktivnosti* ako je bar jedan *T* alel prisutan; <sup>d</sup>*Varijantni*, ako je bar jedan *Val* alel prisutan; HR, hazard ratio; CI, interval poverenja

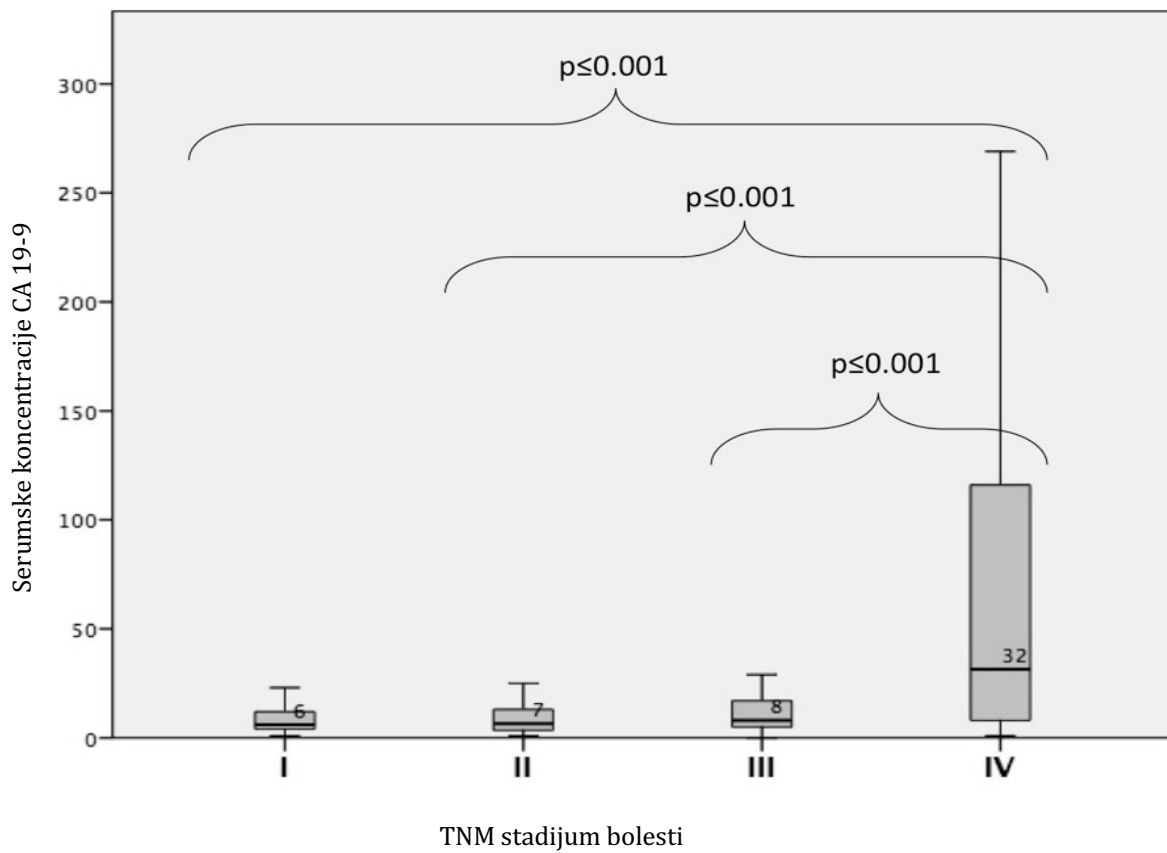
#### 4.4. POVEZANOST BIOHEMIJSKIH MARKERA CEA i CA 19-9 SA PATOHISTOLOŠKIM KARAKTERISTIKAMA TUMORA

Postojala je statistički značajna razlika u vrednostima serumskog CEA između različitih TNM stadijuma KRK ( $p < 0.01$ ).



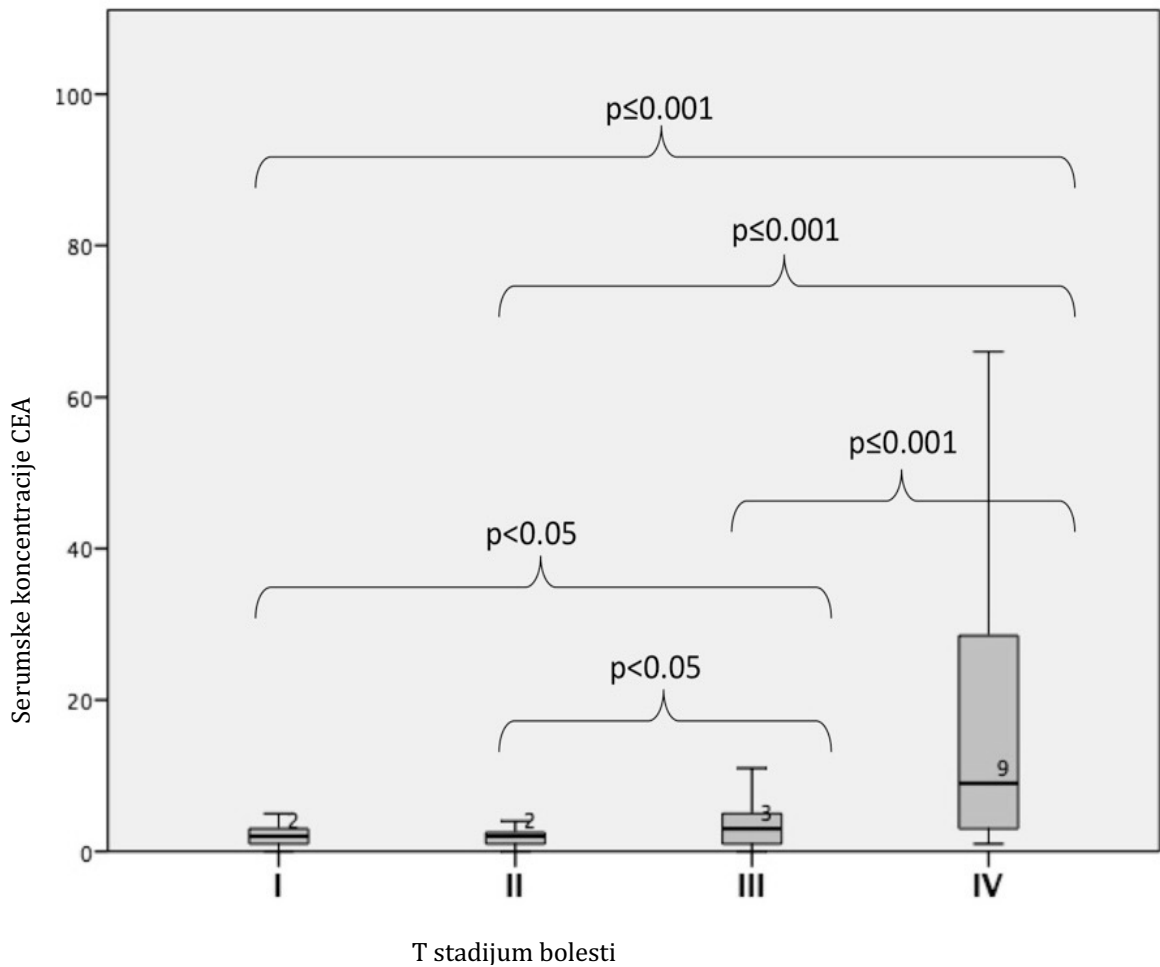
**Figura 26.** Serumske vrednosti CEA stratifikovane kroz TNM stadijume

Postojala je statistički značajna razlika u vrednostima serumskog CA 19-9 između različitih TNM stadijuma KRK ( $p < 0.01$ ).



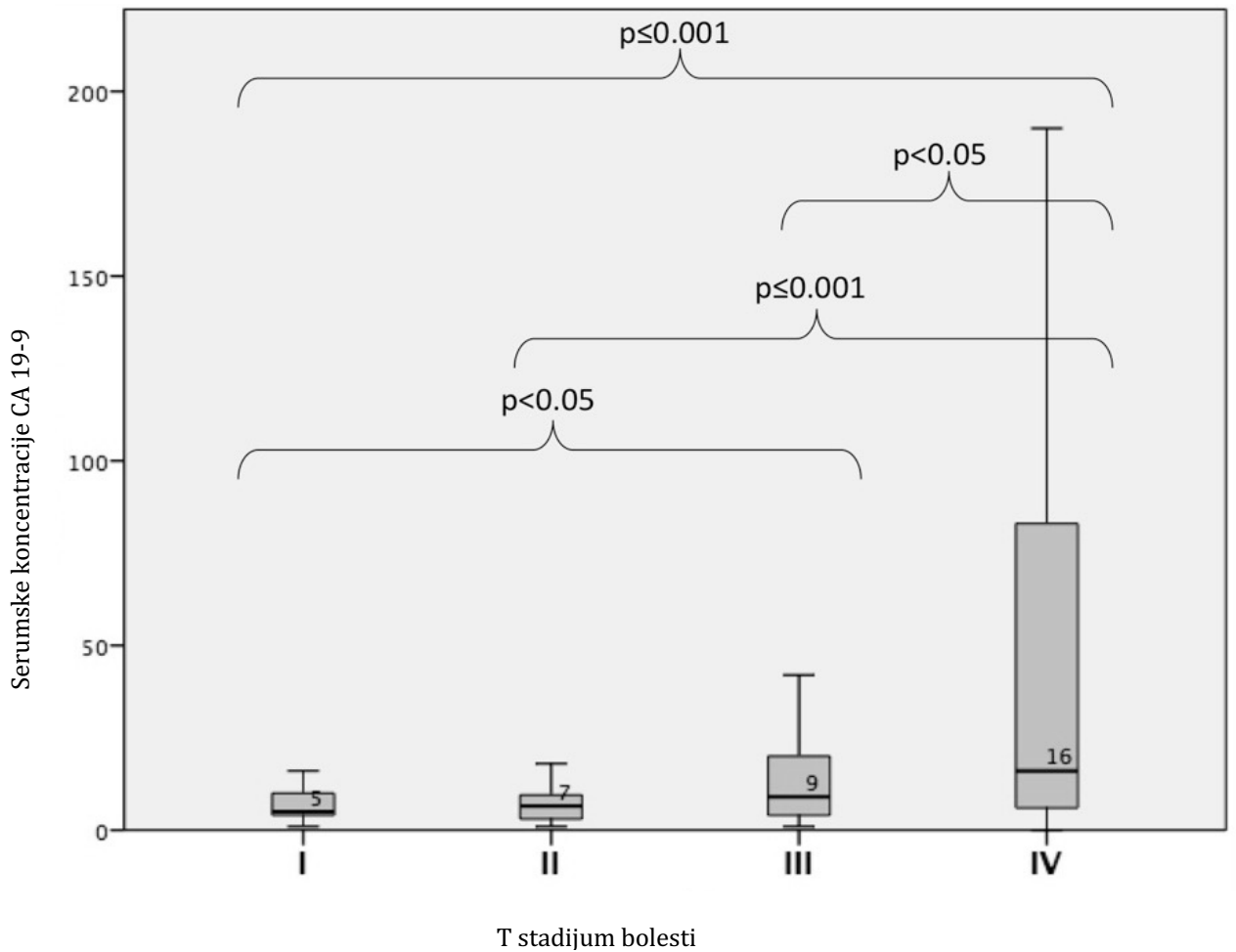
**Figura 27.** Serumske vrednosti CA 19-9 stratifikovane kroz TNM

Uočena je statistički značajna razlika u vrednostima CEA u različitim T stadijumima, naročito kada smo poredili stadijume 1, 2, 3 u odnosu na stadijum 4. Prosečne vrednosti CEA bile su T1  $3.76 \pm 8.73$ ; T2  $5.68 \pm 17.27$ , T3  $7.56 \pm 14.81$ , i T4  $70.90 \pm 253.2$  ng/ml.



**Figura 28.** Serumske vrednosti CEA stratifikovane kroz T stadijum

Kada smo ispitivali serumske vrednosti CA 19-9 po T stadijumima, takođe smo uočili postojanje značajne razlike između stadijuma, naročito stadijuma T4. Prosečne vrednosti CA 19-9 bile su T1  $9.65 \pm 11.03$ , T2  $9.83 \pm 11.09$ ; T3  $19.58 \pm 36.91$ , i T4  $228.9 \pm 985.38$ .



**Figura 29.** Serumske vrednosti CA 19-9 stratifikovane kroz T stadijum

Srednje vrednosti CEA i CA 19-9 bile su značajno više kod pacijenta sa zahvaćenim regionalnim limfnim nodusima. (CEA  $37.21 \pm 177.85$  vs  $4.79 \pm 9.90$ , CA19-9  $119.51 \pm 687.71$  vs  $12.24 \pm 17.69$ ,  $p < 0.05$ ).

Srednje vrednosti CEA i CA 19-9 su bile značajno više kod pacijenata sa udaljenim metastazama (CEA  $86.56 \pm 277.65$  vs  $5.98 \pm 12.98$ , i CA19-9  $273.27 \pm 1073.46$  vs  $4.98 \pm 3142$ ,  $p < 0.001$ ).

Nisu uočene statistički značajne razlike u vrednostima CEA i CA 19-9 u odnosu na pol, godine, pušenje ili stepen patološke diferencijacije ( $p > 0.05$ ).

Nije uočeno postojanje statistički značajne razlike u vrednostima CEA i CA 19-9 između osoba sa nultim odnosno aktivnim *GSTM1*, *GSTT1*, *GSTP1*, kao i *GSTA1* genotipom ( $p > 0.05$ ).

Uočena je statistički značajna razlika u preživljavanju bolesnika sa višim odnosno nižim vrednostima CEA i CA 19-9 (CEA  $11.04 \pm 59.88$  vs  $467.40 \pm 430.25$ ; CA19-9  $27.64 \pm 94.29$  vs  $155.72 \pm 752.06$ ;  $p < 0.005$ )

Spirmanova Ro korelacija pokazala je da vrednosti CEA i CA 19-9 međusobno pozitivno koreliraju.

Kod 20 pacijenata ispitali smo korelaciju CEA-EIA i CEA-RIA. Nivo korelacije bio je izuzetno visok sa korelacionim koeficijentom 0.882 ( $p < 0.01$ ). Senzitivnost obe metode bila je vrlo slična, (70% vs. 73%) za cut-off vrednosti od 5ng/ml.

ROC kriva za CEA u svim stadijumima bolesti imala je 53.15% senzitivnosti za cut-off od 2.5ng/mL, dok je za CA19-9 48.37% za cut-off od 8.5U/mL. ROC kriva za CEA kod pacijenata TNM stadijuma IV za cut-off nivo od 2.5ng/mL pokazala je senzitivnost od 76.2% i specifičnost od 59% sa AUC 0.738, i za CA19-9 cut-off od 11.5U/mL senzitivnost od 70% i specifičnost od 70% sa AUC 0.740.

ROC kriva kod pacijenata sa zahvaćenim limfnim nodusima, za CEA vrednosti od 3.5ng/mL pokazala je senzitivnost i specifičnost od 60% tj. 70%, a za CA 19-9 vrednost od 7.5U/mL senzitivnost od 70.3% i specifičnost od 53%.

ROC kriva kod pacijenata sa dokazanim udaljenim metastazama za CEA vrednosti 3.5ng/mL pokazala je senzitivnost od 76.8% i specifičnost of 71.8%, dok za CA19-9 vrednosti 5.5 U/mL imala je senzitivnost od 80.4% i specifičnost od 40%.

#### 4.5. PARAMETRI SISTEMSKE INFLAMACIJE KOD PACIJENATA SA KRK

U grupi pacijenata sa KRK zabeležene su značajno više vrednosti ANC i trombocita u poređenju sa kontrolnom grupom. Takođe u grupi KRK pacijenata uočene su statistički značajno niže vrednosti ALC, MVP i RBC ( $p < 0.01$ ).

Uočena je visoko statistički značajna razlika u vrednostima NLR i PLR kod pacijenata sa KRK u poređenju sa kontrolnom grupom ( $p < 0.01$ ). Naime, pacijenti sa KRK imali su statistički značajno više vrednosti NLR i PLR u odnosu na kontrolnu grupu.

Nije uočeno postojanje statistički značajne razlike u vrednostima NLR, PLR i MVP u odnosu na pol ili uzrast ( $p > 0.05$ ).

**Tabela 14.** Vrednosti parametara sistemske inflamacije pacijenata sa KRK i zdravih kontrola

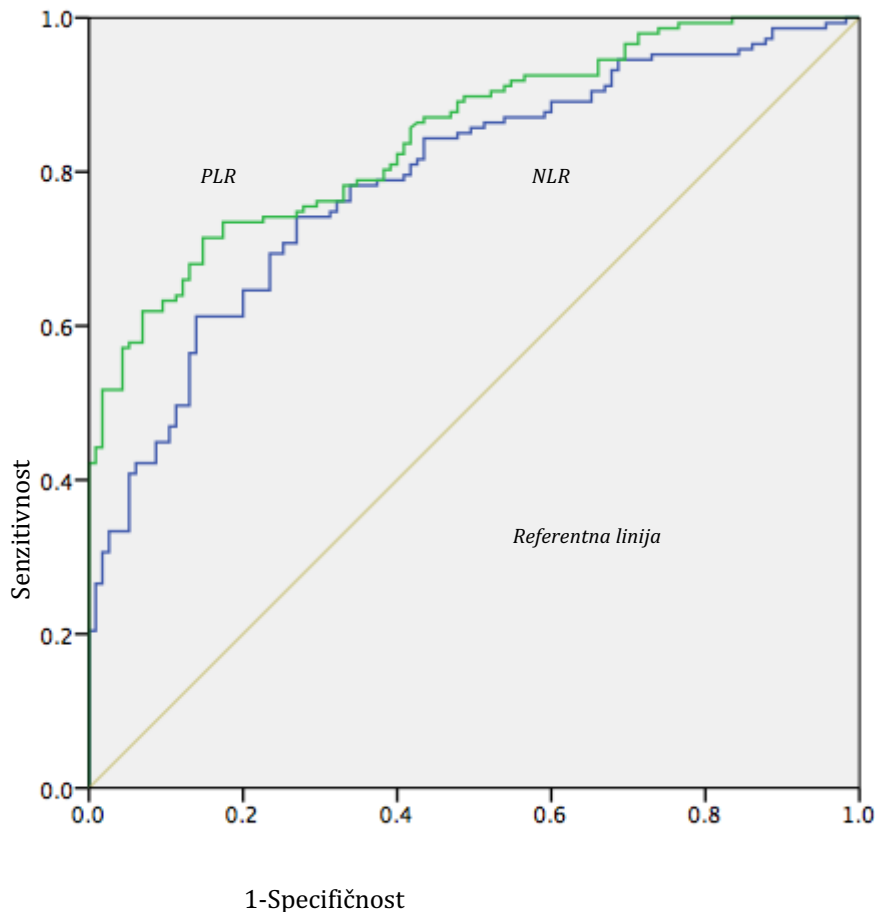
	KRK	Kontrolna grupa	P vrednost
<b>WBC</b> (sr.vred±SD) ( $10^9/L$ )	7.20±2.63	7.02±1.76	>0.05
<b>ANC</b> (sr.vred±SD) (%)	4.89±2.43	4.02±1.55	<0.01
<b>ALC</b> (sr.vred±SD) (%)	1.52±0.64	2.39±0.76	<0.01
<b>PLT</b> (sr.vred±SD) ( $10^9/L$ )	255.31±77.97	218.48±56.84	<0.01
<b>NLR</b> (sr.vred±SD)	4.80±7.61	1.82±0.83	<0.01
<b>PLR</b> (sr.vred±SD)	221.63±209.47	97.51±31.67	<0.01
<b>MPV</b> (sr.vred±SD) (fL)	7.61±1.21	9.06±1.41	<0.01

WBC Leukociti; ANC apsolutni broj neutrofila; ALC apsolutni broj limfocita, PTL trombociti; NLR odnos neutrofila i limfocita, PLR odnos trombocita i limfocita; MPV srednji volumen trombocita



ROC kriva za NLR imala je najbolje cut off vrednosti od 2.15 za detekciju KRK (AUC=0.790, 95%CI 0.736-0.884, Se=74.1% and Sp=73%), dok je za vrednosti PLR od 123 (AUC=0.846, 95%CI 0.801-0.891, Se= 74% and Sp= 80%).

ROC kriva za vrednosti MVP od 8.5 (AUC=0.816, 95%CI 0.764-0.869, Se= 74% and Sp= 88%).

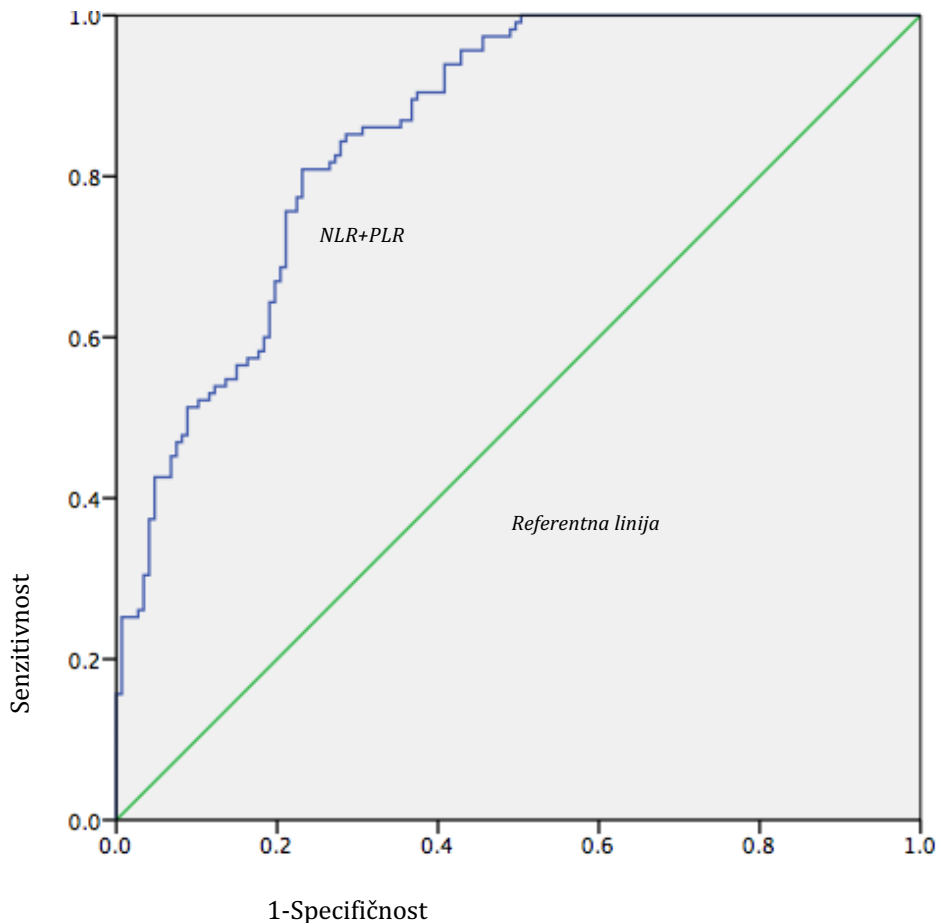


**Figura 30.** ROC kriva za NLR i PLR pojedinačno

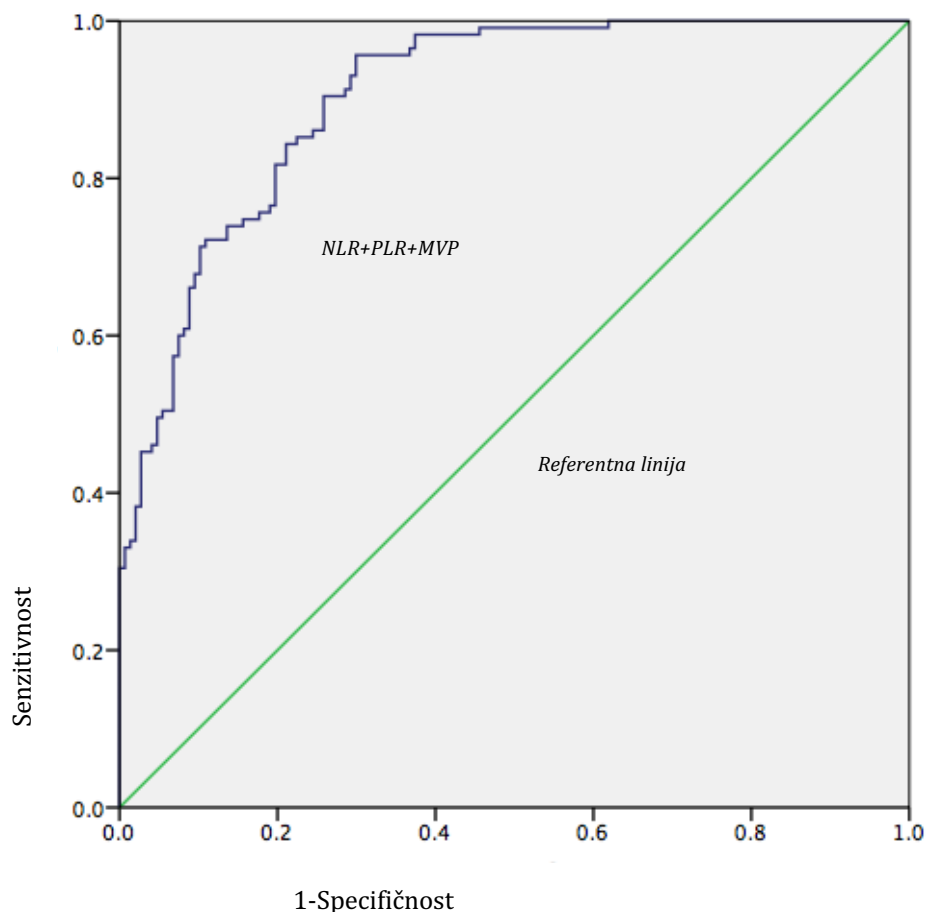
#### 4.5.1. Kombinovani inflamatorni markeri kod pacijenata sa KRK

Izračunali smo AUC za NLR i PLR skupa i pokazala je izuzetnu dijagnostičku vrednost (AUC=0.856, 95%CI 0.812-0.899, Se= 76% and Sp= 80%).

Nadalje smo spojili MVP sa NLR i PLR i dijagnostička tačnost bila je još veća (AUC=0.904, 95%CI 0.869-0.938, Se= 96% and Sp= 70%) (Figura 31.)

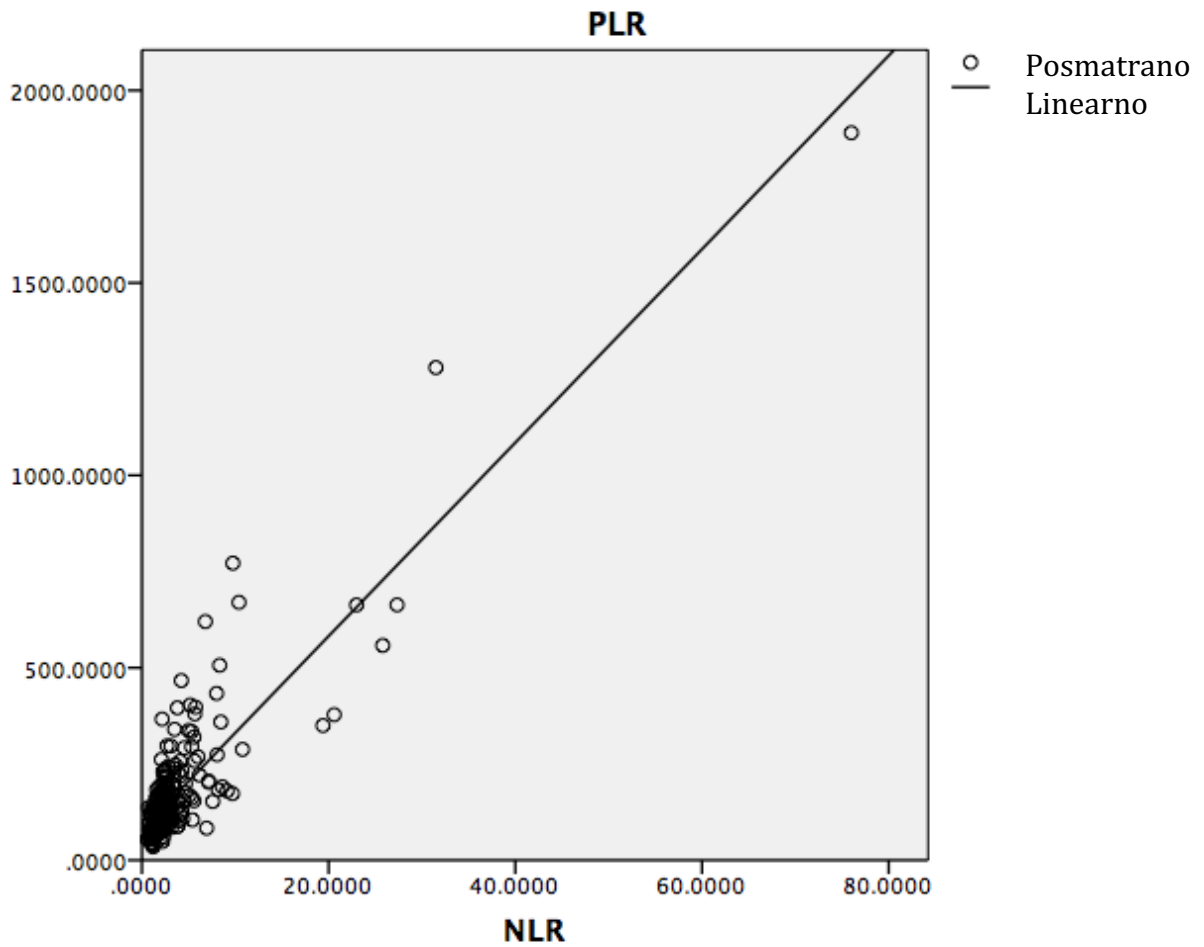


**Figura 31.** ROC kriva za NLR i PLR zajedno



**Figura 32.** ROC kriva za NLR, PLR i MPV zajedno

Takođe uočena je pozitivna asocijacija između NLR i PLR, što je pokazano regresionom jednačinom  $y=79.311+25.138x$  ( $R^2=0.766$ ;  $P<0.01$ ) kao i značajna negativna asocijacija MVP sa NLR i PLR ( $r=-0.281$ , and  $r= -0.488$ ;  $P<0.01$ ).



**Figura 33.** Korelacija NLR i PLR

#### 4.5.2. Inflamatorni markeri i fenotipske karakteristike tumora

NLR i PLR bili su značajno viši u svim TNM stadijumima (I, II, III, IV) u odnosu na kontrolnu grupu ( $P < 0.01$ ), dok su vrednosti MVP bile značajno niže ( $P < 0.01$ ). Postojala je statistički značajna razlika u vrednostima NLR i PLR u ranim stadijumima bolesti (I, II) u odnosu na kasnije stadijume (III, IV) ( $P = 0.023$ ,  $P = 0.07$ ,  $P < 0.05$ ), dok nije zabeleženo postojanje značajne razlike u vrednostima MVP, iako je trend opadanja primećen ( $P = 0.662$ ). Dodatno kombinacija NLR, PLR i MVP je bila statistički značajno drugačija u stadijumu IV u poređenju sa drugim stadijumima ( $P = 0.04$ ,  $P < 0.05$ ).

Nadalje Kruskal-Wallis test pokazao je značajnu povezanost T stadijuma sa NLR ( $P = 0.04$ ), sa tendencijom porasta od stadijuma I do IV. Međutim Kruskal-Wallis test nije pokazao značajnu povezanost PLR kao ni MVP sa T stadijumom ( $P = 0.19$ ,  $P = 0.62$ ,  $P > 0.05$ ). Nije bilo statistički značajne razlike u vrednostima NLR, PLR ili MVP u odnosu na stepen diferencijacije tumora ( $P = 0.421$ ,  $P = 0.383$ ,  $P > 0.05$ ).

**Tabela 15.** Vrednosti parametara sistemske inflamacije stratifikovane po TNM

	Kontrolna grupa	TNM I	TNM II	TNM III	TNM IV
NLR(sr.vred±SD)	1.82±0.77	3.50±0.46	3.81±0.43	6.19±1.3	6.47±2.19
PLR(sr.vred±SD)	97.51±2.95	175.72±11.54	201.83±21.55	254.30±31.67	276.80±58.54
MVP(sr.vred±SD)	9.10±0.13	7.71±0.18	7.68±0.15	7.68±0.17	7.20±0.32

## 5. DISKUSIJA

Uloga polimorfizama GST kao potencijalnog faktora rizika u procesu karcinogeneze KRK i dalje je predmet brojnih istraživanja. U ovoj studiji je ispitivana potencijalna uloga polimorfizma četiri najznačajnije klase GST (GSTM, GSTT, GSTA i GSTP) u riziku za nastanak KRK. Rezultati su ukazali da osobe sa *GSTT1-nultim* i *GSTP1-varijantnim* genotipom imaju statistički značajno veći rizik od nastanka KRK u odnosu na osobe sa referentnim genotipom. Nadalje, ovaj rizik se povećavao ukoliko su osobe bile nosioci kombinacije ova dva genotipa, ili kombinacije ova dva genotipa sa još jednim od ispitivanih genotipova, *GSTA1* ili *GSTP1*. Osobe sa kombinovanim *GSTM1-nulti/GSTT1-nulti/GSTA1-smanjene aktivnosti/GSTP1-varijantnim* genotipom su imale 2.71 puta veću podložnost za nastanak KRK u odnosu na nosioce referentne kombinacije genotipova.

Imajući u vidu da faktori sredine imaju izuzetno značajnu ulogu i razvoju i progresiji KRK, genski polimorfizmi enzima koji u čestvuju u metabolizmu ksenobiotika bili su predmet brojnih istraživanja (61,67). Iako su istraživanja na ovu temu brojna, rezultati su i dalje kontradiktorni.

*GSTM1-nulti* genotip je najčešće ispitivan genotip GST prema dostupnoj literaturi. Naime, ovaj genotip je najviše ispitivan u kontekstu faktora rizika za nastanak različitih karcinoma. Međutim, povezanost *GSTM1* polimorfizma i rizika od KRK razlikuje se značajno u brojnim istraživanjima, pre svega zbog uključivanja osoba različite etničke pripadnosti i geografskog porekla, a poznato je da na GST genotip značajan uticaj ima upravo etnička pripadnost, kao i da se učestalost aktivnog i nultog genotipa razlikuje između regiona (68).

U velikoj meta-analizi koju su radili *Economopoulos* i sar. (69), rezultati su ukazali da osobe sa *GSTM1-nultim* ili *GSTT1-nultim* genotipom imaju veći rizik od obolevanja od KRK. Nasuprot tome, rezultati ove meta-analize pokazali su da osobe sa *GSTA1-smanjene aktivnosti* ili *GSTP1-varijantim* genotipom nisu imale povećan rizik od nastanka KRK. Treba imati u vidu da su u ovu meta-analizu bile uključene svega tri studije koje su ispitivale GST genotipove kod belaca (70–72). U dve od tri studije, *GSTM1-nulti* genotip nije bio faktor rizika, što je u skladu sa našim rezultatima.

Distribucija *GSTM1* genotipova u ovom istraživanju bila je slična distribuciji u drugim studijama na beloj populaciji (58,64,73), dok je, očekivano, bila značajno drugačija u odnosu na studije koje su rađene na populaciji Azijata (53).

Kombinovani efekat *GSTM1-nultog* i *GSTT1-nultog* genotipa analiziran u studiji *Martineza i sar.* ukazao je da postoji povećan rizik od KRK kod osoba nosilaca ove kombinacije (71). To je donekle u skladu je sa rezultatima našeg istraživanja, s obzirom da rezultati pokazuju da pacijenti sa ovom kombinacijom genotipova imaju 1.5 puta veći rizik od obolevanja, ali bez statističke značajnosti (OR = 1.50, 95%CI: 0.95-2.35, p = 0.080).

U meta analizi *Yan i saradnika* (74) koja je uključila 15 studija, pacijenti sa KRK i *GSTM1-nultim* genotipom imali su značajno lošije preživljavanje, te se *GSTM1 nulti* genotip zapravo pokazao kao potencijalni prognostički faktor kod ovih bolesnika. Rezultati našeg istraživanja takođe su pokazali da je *GSTM1 nulti* genotip udružen sa lošijim preživljavanjem bolesnika sa KRK. Naime rezultati našeg istraživanja pokazali su da bolesnici nosioci *GSTM1-nultog* genotipa imaju statistički značajno lošije preživljavanje u odnosu na bolesnike nosioce *GSTM1-aktivnog* genotipa.

Imajući u vidu da delecioni polimorfizam *GSTT1* vodi do smanjene ekspresije *GSTT1* u gastrointestinalnom traktu, kao i slabljenja primarne funkcije u procesu detoksikacije, ovaj polimorfizam bio je predmet ispitivanja brojnih studija. (23, 24, 25). Naime *GSTT1-nulti* genotip prepoznat je kao faktor rizika za nastanak KRK naročito kod belaca (54). Meta analiza *Qin i sar.* kao i *Wan i sar.* (76,77) ukazala je da osobe koje su nosioci *GSTT1-nultog* genotipa imaju 1.21 odnosno 1.32 puta veći rizik od obolevanja od KRK. Takođe u skorašnjem istraživanju *Masood i sar.* (78) delecioni polimorfizam *GSTT1* povezan je sa povećanim rizikom od KRK. Rezultati ovog istraživanja su u skladu sa prethodnim, gde osobe koje su nosioci *GSTT1-nultog* polimorfizma imaju 1.35 puta veći rizik od obolevanja od KRK. Ovo je naročito značajno ukoliko su nosioci ovog genotipa izloženi supstancama koje su prepoznate kao supstrati za *GSTT1*, kao što je npr etilen oksid koji se pronalazi u duvanskom dimu (79).



*GSTT1*-nulti polimorfizam u našem istraživanju nije se pokazao od značaja u preživljavanju bolesnika. Ovo je u skladu sa istraživanjem Rodrigues-Fleming i sar. kao i Funke i sar (80,81).

Još jedan od polimorfizama koji je ispitivan u našem istraživanju je *GSTA1*. Naime ovaj polimorfizam je ispitivan u značajno manjoj meri u odnosu na ostale polimorfizme GST-a. U studiji Martinez i sar. (71) nije pokazana povezanost *GSTA1* polimorfizma sa nastankom KRK. U već pomenutoj meta-analizi Economopoulos i sar. (14), nije uočena veza između postojanja *GSTA1* polimorfizma i nastanka KRK. U skorašnjoj meta-analizi Deng et al. (28) takođe su potvrdili da *GSTA1* nije prepoznat kao faktor rizika za nastanak KRK. Rezultati našeg istraživanja u skladu su sa prethodno objavljenim.

Nije pokazano postojanje statistički značajne razlike u preživljavanju pacijenata sa *GSTA1*-smanjene aktivnosti polimorfizmom u odnosu na osobe sa referentnim genotipom u našoj kohorti. U dostupnoj literaturi ne nailazi se na podatak o uticaju *GSTA1* polimorfizma na preživljavanje bolesnika sa KRK.

Jedan od najviše ispitivanih GST polimorfizama je *GSTP1*. Naime ovaj polimorfizam je bio predmet istraživanja u različitim malignitetima, uključujući i KRK (80,82,83), što ukazuje na značajnu ulogu ovog enzima u metabolizmu brojnih kancerogena, ali i antitumorskih lekova (58). Ono što je karakteristično i za ostale GST polimorfizme, distribucija *GSTP1* genotipa razlikuje se u zavisnosti od etničke ili geografske pripadnosti, što nije zanemarljivo kada se uzme u obzir da su rezultati vezani za uticaj *GSTP1* polimorfizma na nastanak KRK i dalje izrazito kontradiktorni. Naime rezultati Tan i sar. (63) kao i Economopoulos i sar. (69) nisu ukazali na postojanje veze između *GSTP1*-varijantnog genotipa i rizika od nastanka KRK. Ovo je potpuno u suprotnosti sa rezultatima ovog istraživanja. Međutim, rezultati Matakova i sar. (84), Wang i sar. (85), Kassab i sar. (86), kao i meta-analiza Ramsey i sar. (87) su u skladu sa ovim istraživanjem.

Osobe nosioci varijantnog *GSTP1*-genotipa su imale statistički značajno lošije ukupno preživljavanje u odnosu na pacijente sa referentnim genotipom. U dostupnoj literaturi podaci su oskudni i uglavnom se tiču preživljavanja bolesnika sa ovim polimorfizmom, koji su na terapiji Oksaliplatinom. U studiji Kap i sar. (88)

GSTP1 polimorfizam nije imao uticaja na preživljavanje, dok je u studiji *Kumamota i sar.* GSTP1 varijantni genotip bio povezan sa boljim odgovorom na Oksaliplatinu i boljim preživljavanjem (89) Naši rezultati ukazuju da *GSTP1-varijantni* genotip u ispitivanoj kohorti nema uticaja na ukupno preživljavanje bolesnika na terapiji.

Uz ispitivanje uticaja pojedinačnih polimorfizama na nastanak KRK, ovo istraživanje podrazumevalo je i ispitivanje uticaja kombinacije dva, tri ili sva četiri polimorfizma.

Naime, prvo je ispitan kombinovani efekat dva potencijalna rizična genotipa u poređenju sa genotipovima manjeg rizika. Od ukupnog broja bolesnika, 40% imalo je kombinaciju *GSTT1-nultog* sa *GSTP1-varijantnim* genotipom što je povećavalo rizik za nastanak KRK za skoro dva puta. Kombinacija *GSTM1-nultog* i *GSTP1-varijantnog* bila je prisutna u 64% bolesnika sa KRK, dok je kombinacija *slabo aktivnog* i *GSTP1-varijantnog* genotipa bila prisutna kod 76% bolesnika sa KRK. Naime osobe sa *GSTM1-nulti* i *GSTP1-varijantnim* genotipom imale su 1.5 veći rizik, dok su osobe nosioci kombinacije *GSTA1-smanjene aktivnosti* i *GSTP1-varijantnog* genotipa imale 1.8 puta veći rizik od obolevanja od KRK.

Većina ranijih istraživanja ispitivala je kombinaciju *GSTM1-nultog* i *GSTT1-nultog* genotipa koja u ovom istraživanju nije predstavljala faktor rizika za nastanak KRK (23, 33, 34). U istraživanju *Matakova i sar.* (84) kombinacija *GSTM1-nultog* i *GSTP1-varijantnog* genotipa predstavljala je faktor rizika za nastanak KRK. U istraživanju *Wang i sar.* (85) kombinacija *GSTT1-nultog* i *GSTP1-varijantnog* genotipa pokazala je 1.9 puta veći rizik od obolevanja u odnosu na referentni genotip, što je vrlo slično rezultatima ovog istraživanja. Kombinacija *GSTA1-smanjene aktivnosti/GSTP1-varijantnog* genotipa ispitivana je prethodno u jednoj studiji koja se odnosila na kolorektalne adenome i kruciferozno povrće (73).

U našem istraživanju analizirana je kombinacija tri genotipa kao potencijalni faktor rizika za nastanak KRK. Pokazano je da osobe sa kombinacijom *GSTM-nultog*, *GSTT1-aktivnog* i *GSTP1-varijantnog* genotipa imaju 2 puta veći rizik za nastanak KRK, što je u skladu sa rezultatima *Ates i sar.* kao i *Wang i sar.* (85,90).

Pretragom literature, zaključeno je da je ovo prvo istraživanje gde je ispitivana kombinacija četiri genotipa *GSTM1-nulti/GSTT1-nulti/GSTA1-smanjene aktivnosti/GSTP1-varijantni*.

Ispitivanjem poznatih faktora rizika, poput pušenja i gojaznosti u korelaciji sa genotipovima u ovom istraživanju nisu uočene statističke značajnosti. moguće objašnjenje je u činjenici da postoji veća incidenca gojaznih i pušača u kontrolnoj grupi.

U ovom trenutku i dalje je nejasno da li biohemijski marker, poput CEA i CA 19-9, mogu pružiti dodatne podatke o stadijumu bolesti. CEA i CA19-9 i dalje se ne preporučuju kao testovi za otkrivanje KRK, a podaci koji govore u prilog njihovoj upotrebi kao neinvazivnih testova koji mogu dati informacije o progresiji bolesti takođe su u ovom trenutku oskudni (91).

Rezultati ovog istraživanja ukazuju da bolesnici sa TNM stadijumom bolesti I, imaju statistički značajno niže vrednosti CEA u poređenju sa drugim TNM stadijumima. Ovi rezultati u skladu su sa prethodno publikovanim (92) . Uz to, različita istraživanja ukazuju da serumske vrednosti CEA mogu imati prognostičku vrednost. Naime, više vrednosti serumskog CEA ukazuju na uznapredovalu bolest, što je u saglasnosti sa rezultatima ove studije (93,94).

Rezultati ovog istraživanja takođe pokazuju statistički značajno više vrednosti TNM stadijuma IV u poređenju sa stadijumom I, što je takođe u skladu sa prethodno publikovanim istraživanjima (95). Saglasno sa istraživanjem *Wang* i sar, rezultati ovog istraživanja pokazali su da su vrednosti CEA i CA 19-9 značajno više u TNM stadijumima III i IV u poređenju sa stadijumom I (34).

Rezultati istraživanja *Rogmuna* i sar., kao i *Chapmana* i sar. pokazuju da je stepen diferencijacije tumora u korelaciji sa vrednostima CEA u serumu (96,97). Ovo je u suprotnosti sa rezultatima ovog istraživanja, gde nije postojala razlika u vrednostima CEA između različitih stepena diferencijacije. Pretragom literature dobija se podatak da su rezultati istraživanja *Wanga* i sar. , *Moertela* i sar., kao i *Mayera* i sar. u skladu sa rezultatima ovog istraživanja (34, 96, 97). Nameće se zaključak da su potrebne dodatne multicentrične randomizovane studije koje će

pre svega biti usmerene na molekularne mehanizme produkcije tumorskih markera.

Rezultati ovog istraživanja ukazuju da visoke preoperativne vrednosti CEA i CA 19-9 ukazuju na zahvatanje limfnih nodusa, što je u skladu sa prethodnim istraživanjima (100).

Udaljene metastaze su glavni uzrok mortaliteta kod bolesnika sa KRK. Najčešća mesta metastaza kod bolesnika sa KRK su jetra, pluća i peritoneum. Više od 50% bolesnika sa KRK će u nekom trenutku razviti metastaze u jetri, što je udruženo sa lošom prognozom ovih bolesnika (101,102). U istraživanju *Pakdela i sar.* pokazana je povezanost između preoperativnih vrednosti CEA i sinhronih metastaza na jetri (103). U pomenutom istraživanju, zaključeno je da kod bolesnika sa povišenim vrednostima CEA potrebno intenzivnije praćenje i skrining potencijalnih metastaza. Rezultati našeg istraživanja su u skladu sa rezultatima ovog istraživanja.

Kod malog broja bolesnika sa KRK (njih 20) u ovom istraživanju poređene su vrednosti CEA rađene sa dve metode (EIA i RIA). Obe metode imale su sličnu senzitivnost. RIA je metoda izbora s obzirom da koristi radioobeležene molekule, ali u slučaju kada iz nekog razloga RIA nije dostupna EIA takođe može biti upotrebljena s obzirom na sličnu senzitivnost (104). Rezultati ovog istraživanja u skladu su sa prethodnim koje se tiču različitih cut-off vrednosti ispitivanih markera (104,105). Pretragom literature, može se zaključiti da je ovo najveća studija u Srbiji koja se ticala markera CEA i CA 19-9 i korisnosti istih u dijagnostikovanju sinhronih metastaza na jetri i limfnim nodusima.

Uloga sistemske inflamacije u procesu karcinogeneze KRK je detaljno ispitivana i opisana u prethodnim istraživanjima (106,107). Naime, nekoliko studija ukazalo je da inflamacija ima ključnu ulogu u razvoju KRK kao i formiranju displazije, s obzirom da inflamacija dovodi do indukcije DNK oštećenja uz pomoć oksidativnog stresa (108–110). Povrh toga, ćelije kancera proizvode različite inflamatorne citokine, što dovodi do infiltracije tumora leukocitima. Dodatno, inflamatorni citokini, bili su predmet istraživanja u smislu njihove uloge u proliferaciji, invaziji i metastazama ćelija KRK (111). U istraživanjima *Itzkowitz* i

*Yio* i sar. naglašeno je da hronična inflamacija dovodi do razvoja KRK bez klasične adenom-karcinom sekvence (112). Štaviše u prilog tome, istraživanje *Burr* i sar. naglašava da nesteroidni antiinflamatorni lekovi dovode do smanjenja sistemske inflamacije i smanjenog rizika od KRK kao i drugih prekanceroznih promena (113). Ovo dodatno podržava teoriju *Mariani* i sar. gde se potencira da zapravo sistemska inflamacija ima izuzetno značajnu ulogu u ranom razvoju karcinoma (114). Stoga NLR, PLR i MVP kao markeri sistemske inflamacije mogu biti korisni u proceni bolesnika sa KRK.

Neutrofili predstavljaju veliku subklasu leukocita, koji imaju ulogu u proliferaciji, angiogenezi i metastaziranju malignih ćelija, najpre zbog stvaranja proangiogenih hemokina i faktora rasta, kao što su vaskularni endotelijalni faktor rasta (VEGF) i PK2/Bv8 (115). Nasuprot ovome, limfociti produkuju citokine, koji inhibiraju proliferaciju i metastatsko širenje kancerskih ćelija i dovode do citotoksične ćelijske smrti (116). U procesu karcinogeneze uočava se povećanje u broju cirkulišućih neutrofila i smanjen broj cirkulišućih limfocita (117). Viši broj neutrofila stimuliše produkciju hemokina: interleukina 1, 6 kao i tumor nekrotizirajućeg faktora, što sve zajedno dovodi do progresije tumora. Signalni putevi aktivirani interleukinom 6 (IL-6) su bili predmet interesovanja brojnih studija karcinogeneze KRK kod pacijenata sa inflamatornim bolestima creva (118). U istraživanju *Tanga* i sar. pokazano je da koncentracije IL-6 koreliraju sa progresijom KRK (119). Imajući ovo u vidu, NLR reflektuje balans između protumorskog i antitumorskog inflamatornog statusa kod bolesnika sa KRK. Stoga disbalans u odnosu neutrofila i limfocita može biti povezan sa progresijom karcinoma.

Rezultati ovog istraživanja u skladu su sa prethodno publikovanim. Naime, rezultati ovog istraživanja ukazuju da bolesnici sa KRK imaju značajno više vrednosti NLR u odnosu na zdrave kontrole, što je takođe u skladu sa prethodno publikovanim podacima (120). Potom, NLR, PLR i MVP kod bolesnika sa KRK značajno se razlikuju u odnosu na iste vrednosti zdravih kontrola, što sugeriše na njihovu potencijalnu ulogu u smislu neinvazivnih dijagnostičkih biomarkera. *Peng* i sar. nakon opsežnog istraživanja došli su do istog zaključka (35).

U skorašnjoj meta-analizi *Li i sar.*, naglašeno je da povišene vrednosti NLR koreliraju sa TNM stadijumom bolesti i sa lošijom patološkom diferencijacijom tumora (121). Rezultati ovog istraživanja su u skladu sa navedeni nalazima, gde je pokazano da vrednosti NLR rastu kroz TNM stadijume I-IV, i da se vrednosti NLR u TNM stadijumu IV značajno razlikuju u poređenju sa svim drugim stadijumima. Istraživanje *Zahorec i sar.* ukazalo je na korelaciju NLR sa napredovanjem bolesti, što je u skladu sa rezultatima ovog istraživanja, imajući u vidu da bolesnici sa uznapredovalom bolesti imaju lošiju dugoročnu prognozu (122).

Tačan mehanizam kojim trombociti učestvuju u procesu karcinogeneze i dalje nije do kraja razjašnjen. Do danas, brojni autori su pokušali da ispituju ulogu trombocita u procesu karcinogeneze. U istraživanju *Nieswandt i sar.* trombociti su prepoznati kao promotori metastaza, s obzirom da poseduju sposobnost da oblože tumorske ćelije i na taj način učine ih neprepoznatljivim za ćelije NK (123). Još jedan od potencijalnih načina na koji trombociti utiču na proces karcinogeneze opisan je u istraživanju *Gourban i sar.* gde su uočene povišene vrednosti VEGF, PDGF i PF4, što se uklapa u pretpostavku da trombociti imaju ulogu u procesu formiranja novih krvnih sudova, kao i da sprečavanju krvarenje iz istih, što sve zajedno vodi do proliferacije tumorskih ćelija (124). Dodatno *Tang i sar.* pokazali su da je trombocitni VEGF značajno viši kod bolesnika sa karcinomima u poređenju sa zdravim kontrolama (119). Trombociti takođe imaju ulogu u signalnim putevima reparacionog sistema DNK preko aktivacije receptora epidermalnog faktora rasta i DNK zavisne protein kinaze (124).

U velikim studijama koje su pratile ishod pacijenata sa KRK, PLR je opsežno ispitivan. U studiji *Kilincalp i sar.* kao faktori koji govore u prilog lošoj prognozi pacijenata sa KRK pokazali su se i NLR i PLR (120). Takođe u istraživanju *Peng i sar.* zaključeno je da i NLR i PLR mogu da se koriste u svakodnevnoj kliničkoj praksi kao rani dijagnostički marker KRK, što je u skladu sa rezultatima ovog istraživanja (35).

MPV je marker veličine trombocita kao i aktivnosti trombocita, i koristi se u svakodnevnom kliničkom radu. Takođe MPV je prepoznat kao inflamatorni marker u kardiovaskularnim, cerebrovaskularnim, reumatološkim, ali i

gastroenterološkim oboljenjima (35,121,123). U prethodnim istraživanjima MPV prepoznat je kao rani dijagnostički marker kod karcinoma želuca, pankreasa, jetre ali kod KRK (113,125). Nažalost svega nekoliko studija ispitivalo je MPV samo kod KRK, i postojeći rezultati su i dalje kontradiktorni. Rezultati ovog istraživanja u skladu su sa rezultatima *Wiesner* i sar. ali u suprotnostima sa rezultatima *Kilincalp* i sar. (120,125). Ova diskrepanca može se objasniti velikim brojem pacijenata sa karcinomom rektuma koji su uključeni u ovo istraživanje, kao i visokim BMI kontrolne grupe, imajući u vidu da gojaznost utiče na vrednost MPV (124).

Većina prethodnih istraživanja ispitivala je markere sistemske inflamacije pojedinačno, a svega nekoliko studija je analiziralo kombinovani efekat dva različita markera (35). Ovo je prvo istraživanje koje je uključilo kombinaciju tri markera i ima izuzetno visoku dijagnostičku tačnost. Nadalje, ovo je prvo istraživanje u srpskoj populaciji i prema pretrazi literature i u ovom regionu Evrope, što je od značaja imajući u vidu da je prevalenca KRK u ovom regionu među najvišim u Evropi (126).

## 6.ZAKLJUČCI



Na osnovu prikazanih rezultata i diskusije, mogu se doneti sledeći zaključci:

1. Nosioци *GSTM1-nultog* i *GSTA1-smanjene aktivnosti* genotipa nemaju veću podložnost za nastanak KRK.
2. Nosioци *GSTT1-nultog* i *GSTP1-varijantnog* genotipa imaju veću podložnost za nastanak KRK. Naime, nosioци *GSTT1-nultog* genotipa su pod 1.35 puta većim rizikom od nastanka KRK u poređenju sa osobama koje imaju *GSTT1-aktivni* genotip, dok nosioци *GSTP1-varijantnog* genotipa imaju 1.39 puta veću podložnost za nastanak KRK u odnosu na nosioce referentnog genotipa.
3. Nosioци *GSTM1-nultog/GSTT1-nultog/GSTA1-smanjene aktivnosti/GSTP1-varijantnog* genotipa, koji predstavlja kombinaciju sva četiri *GST* genotipa koji se mogu dovesti u vezu sa rizikom za nastanak KRK, imaju 2.71 puta veću podložnost za nastanak KRK u odnosu na nosioce kombinacije referentnih genotipova.
4. Nije uočena povezanost genotipova *GSTM1* i *GSTT1* sa stepenom patološke diferencijacije i progresije KRK.
5. Uočena je povezanost *GSTA1-smanjene aktivnosti* genotipa sa stadijumom tumora. Naime, uočeno je postojanje granične statistički značajne razlike između nosioca *GSTA1-smanjene aktivnosti* T1 stadijuma u odnosu na ostale T stadijume.
6. Uočena je povezanost *GSTP1* genotipa i stepena patološke diferencijacije tumora, Štaviše, prisutan je trend porasta učestalosti *GSTP1-varijantnog* genotipa sa povećanjem stadijuma tumora.
7. Nije uočena povezanost između *GST* genotipova i vrednosti tumorskih markera CEA i CA 19-9 .
8. *GSTM1-nulti* i *GSTP1-varijantni* genotip mogu predstavljati prognostičke faktore u KRK, jer je kod nosilaca ovih genotipova uočena sstatistički

značajna razlika u preživljavanju u odnosu na osobe sa *GSTM1-aktivnim* i *GSTP1-referentnim* genotipom.

9. Preoperativne vrednosti CEA i CA 19-9 mogu pružiti informacije o stadijumu bolesti u trenutku postavljanja dijagnoze, naime pacijenti sa uznapredovalom bolešću imali su statistički značajno veće vrednosti CEA i CA 19-9.
10. Parametri sistemske inflamacije mogu poslužiti kao neinvazivni markeri u proceni stadijuma bolesti. Naime NLR i PLR bili su značajno viši u svim TNM stadijumima (I, II, III, IV) u odnosu na kontrolnu grupu, dok su vrednosti MVP bile značajno niže .

## 7.LITERATURA

1. Batut DMJ. Health of Population of Serbia. :176.
2. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2019. *CA Cancer J Clin*. 2019 Jan;69(1):7–34.
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(4):683–91.
4. White A, Joseph D, Rim SH, Johnson CJ, Coleman MP, Allemani C. Colon cancer survival in the United States by race and stage (2001-2009): Findings from the CONCORD-2 study. *Cancer*. 2017 Dec 15;123 Suppl 24:5014–36.
5. Hagggar FA, Boushey RP. Colorectal cancer epidemiology: incidence, mortality, survival, and risk factors. *Clin Colon Rectal Surg*. 2009 Nov;22(4):191–7.
6. Tiemersma EW, Voskuil DW, Bunschoten A, Hogendoorn EA, Witteman BJM, Nagengast FM, et al. Risk of colorectal adenomas in relation to meat consumption, meat preparation, and genetic susceptibility in a Dutch population. *Cancer Causes Control CCC*. 2004 Apr;15(3):225–36.
7. Wong MCS, Chan CH, Lin J, Huang JLW, Huang J, Fang Y, et al. Lower Relative Contribution of Positive Family History to Colorectal Cancer Risk with Increasing Age: A Systematic Review and Meta-Analysis of 9.28 Million Individuals. *Am J Gastroenterol*. 2018 Jun 5;
8. Kennelly RP, Gryfe R, Winter DC. Familial colorectal cancer: Patient assessment, surveillance and surgical management. *Eur J Surg Oncol J Eur Soc Surg Oncol Br Assoc Surg Oncol*. 2017 Feb;43(2):294–302.
9. Song M, Chan AT. Environmental Factors, Gut Microbiota, and Colorectal Cancer Prevention. *Clin Gastroenterol Hepatol Off Clin Pract J Am Gastroenterol Assoc*. 2018 Jul 18;
10. Boland CR, Goel A. Microsatellite instability in colorectal cancer. *Gastroenterology*. 2010 Jun;138(6):2073-2087.e3.
11. Ogino S, Goel A. Molecular classification and correlates in colorectal cancer. *J Mol Diagn JMD*. 2008 Jan;10(1):13–27.
12. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*. 1990 Jun 1;61(5):759–67.
13. Pino MS, Chung DC. The chromosomal instability pathway in colon cancer. *Gastroenterology*. 2010 Jun;138(6):2059–72.

14. Boland CR, Thibodeau SN, Hamilton SR, Sidransky D, Eshleman JR, Burt RW, et al. A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res.* 1998 Nov 15;58(22):5248–57.
15. Thirunavukarasu P, Talati C, Munjal S, Attwood K, Edge SB, Francescutti V. Effect of Incorporation of Pretreatment Serum Carcinoembryonic Antigen Levels Into AJCC Staging for Colon Cancer on 5-Year Survival. *JAMA Surg.* 2015 Aug;150(8):747–55.
16. 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. *Int J Mol Sci.* 2017 Jan 19;18(1).
17. Esteller M, Sparks A, Toyota M, Sanchez-Cespedes M, Capella G, Peinado MA, et al. Analysis of adenomatous polyposis coli promoter hypermethylation in human cancer. *Cancer Res.* 2000 Aug 15;60(16):4366–71.
18. Iacopetta B. TP53 mutation in colorectal cancer. *Hum Mutat.* 2003 Mar;21(3):271–6.
19. Kandioler D, Mittlböck M, Kappel S, Puhalla H, Herbst F, Langner C, et al. TP53 Mutational Status and Prediction of Benefit from Adjuvant 5-Fluorouracil in Stage III Colon Cancer Patients. *EBioMedicine.* 2015 Aug;2(8):825–30.
20. Miyamoto Y, Suyama K, Baba H. Recent Advances in Targeting the EGFR Signaling Pathway for the Treatment of Metastatic Colorectal Cancer. *Int J Mol Sci.* 2017 Apr 2;18(4).
21. Vacante M, Borzì AM, Basile F, Biondi A. Biomarkers in colorectal cancer: Current clinical utility and future perspectives. *World J Clin Cases.* 2018 Dec 6;6(15):869–81.
22. Bond CE, Whitehall VLJ. How the BRAF V600E Mutation Defines a Distinct Subgroup of Colorectal Cancer: Molecular and Clinical Implications. *Gastroenterol Res Pract.* 2018;2018:9250757.
23. Cicenás J, Tamosaitis L, Kvederaviciute K, Tarvydas R, Staniute G, Kalyan K, et al. KRAS, NRAS and BRAF mutations in colorectal cancer and melanoma. *Med Oncol Northwood Lond Engl.* 2017 Feb;34(2):26.
24. Wang Q, Shi Y-L, Zhou K, Wang L-L, Yan Z-X, Liu Y-L, et al. PIK3CA mutations confer resistance to first-line chemotherapy in colorectal cancer. *Cell Death Dis.* 2018 Jul 3;9(7):739.
25. Hsu Y-L, Lin C-C, Jiang J-K, Lin H-H, Lan Y-T, Wang H-S, et al. Clinicopathological and molecular differences in colorectal cancer according to location. *Int J Biol Markers.* 2019 Mar;34(1):47–53.

26. McKeown E, Nelson DW, Johnson EK, Maykel JA, Stojadinovic A, Nissan A, et al. Current approaches and challenges for monitoring treatment response in colon and rectal cancer. *J Cancer*. 2014 Jan 1;5(1):31–43.
27. Kahi CJ, Anderson JC, Rex DK. Screening and surveillance for colorectal cancer: state of the art. *Gastrointest Endosc*. 2013 Mar;77(3):335–50.
28. False-positive elevations of carcinoembryonic antigen in patients with a history of resected colorectal cancer. - PubMed - NCBI [Internet]. [cited 2019 May 15]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24925201>
29. Ning S, Wei W, Li J, Hou B, Zhong J, Xie Y, et al. Clinical significance and diagnostic capacity of serum TK1, CEA, CA 19-9 and CA 72-4 levels in gastric and colorectal cancer patients. *J Cancer*. 2018;9(3):494–501.
30. Dressen K, Hermann N, Manekeller S, Walgenbach-Bruenagel G, Schildberg FA, Hettwer K, et al. Diagnostic Performance of a Novel Multiplex Immunoassay in Colorectal Cancer. *Anticancer Res*. 2017;37(5):2477–86.
31. Khare P, Bose A, Singh P, Singh S, Javed S, Jain SK, et al. Gonadotropin and tumorigenesis: Direct and indirect effects on inflammatory and immunosuppressive mediators and invasion. *Mol Carcinog*. 2017;56(2):359–70.
32. Zhang T, Wang F, Wu J-Y, Qiu Z-C, Wang Y, Liu F, et al. Clinical correlation of B7-H3 and B3GALT4 with the prognosis of colorectal cancer. *World J Gastroenterol*. 2018 Aug 21;24(31):3538–46.
33. Jovanovic M, Gajovic N, Zdravkovic N, Jovanovic M, Jurisevic M, Vojvodic D, et al. Fecal Galectin-3: A New Promising Biomarker for Severity and Progression of Colorectal Carcinoma. *Mediators Inflamm*. 2018;2018:8031328.
34. Wang J, Wang X, Yu F, Chen J, Zhao S, Zhang D, et al. Combined detection of preoperative serum CEA, CA19-9 and CA242 improve prognostic prediction of surgically treated colorectal cancer patients. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015;8(11):14853–63.
35. Peng H-X, Yang L, He B-S, Pan Y-Q, Ying H-Q, Sun H-L, et al. Combination of preoperative NLR, PLR and CEA could increase the diagnostic efficacy for I-III stage CRC. *J Clin Lab Anal*. 2017 Sep;31(5).
36. Haram A, Boland MR, Kelly ME, Bolger JC, Waldron RM, Kerin MJ. The prognostic value of neutrophil-to-lymphocyte ratio in colorectal cancer: A systematic review. *J Surg Oncol*. 2017 Mar;115(4):470–9.
37. Chu SG, Becker RC, Berger PB, Bhatt DL, Eikelboom JW, Konkle B, et al. Mean platelet volume as a predictor of cardiovascular risk: a systematic review and meta-analysis. *J Thromb Haemost JTH*. 2010 Jan;8(1):148–56.

38. Sanford KW, McPherson RA. Fecal occult blood testing. *Clin Lab Med*. 2009 Sep;29(3):523–41.
39. Fleming M, Ravula S, Tatishchev SF, Wang HL. Colorectal carcinoma: Pathologic aspects. *J Gastrointest Oncol*. 2012 Sep;3(3):153–73.
40. Luo C, Cen S, Ding G, Wu W. Mucinous colorectal adenocarcinoma: clinical pathology and treatment options. *Cancer Commun [Internet]*. 2019 Mar 29 [cited 2019 Jul 29];39. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6440160/>
41. Edge SB, Compton CC. The American Joint Committee on Cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM. *Ann Surg Oncol*. 2010 Jun;17(6):1471–4.
42. Akkoca AN, Yanık S, Özdemir ZT, Cihan FG, Sayar S, Cincin TG, et al. TNM and Modified Dukes staging along with the demographic characteristics of patients with colorectal carcinoma. *Int J Clin Exp Med*. 2014 Sep 15;7(9):2828–35.
43. Geng F, Wang Z, Yin H, Yu J, Cao B. Molecular Targeted Drugs and Treatment of Colorectal Cancer: Recent Progress and Future Perspectives. *Cancer Biother Radiopharm*. 2017 Jun;32(5):149–60.
44. Hayes JD, Flanagan JU, Jowsey IR. Glutathione transferases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2005;45:51–88.
45. Hayes JD, McLellan LI. Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a co-ordinately regulated defence against oxidative stress. *Free Radic Res*. 1999 Oct;31(4):273–300.
46. Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem*. 1974 Nov 25;249(22):7130–9.
47. Haimeur A, Conseil G, Deeley RG, Cole SPC. The MRP-related and BCRP/ABCG2 multidrug resistance proteins: biology, substrate specificity and regulation. *Curr Drug Metab*. 2004 Feb;5(1):21–53.
48. Pljesa-Ercegovac M, Savic-Radojevic A, Matic M, Coric V, Djukic T, Radic T, et al. Glutathione Transferases: Potential Targets to Overcome Chemoresistance in Solid Tumors. *Int J Mol Sci*. 2018 Nov 28;19(12).
49. Coles B, Nowell SA, MacLeod SL, Sweeney C, Lang NP, Kadlubar FF. The role of human glutathione S-transferases (hGSTs) in the detoxification of the food-derived carcinogen metabolite N-acetoxy-PhIP, and the effect of a polymorphism in hGSTA1 on colorectal cancer risk. *Mutat Res*. 2001 Oct 1;482(1–2):3–10.

50. Strange RC, Jones PW, Fryer AA. Glutathione S-transferase: genetics and role in toxicology. *Toxicol Lett.* 2000 Mar 15;112–113:357–63.
51. Bhattacharjee P, Paul S, Banerjee M, Patra D, Banerjee P, Ghoshal N, et al. Functional compensation of glutathione S-transferase M1 (GSTM1) null by another GST superfamily member, GSTM2. *Sci Rep.* 2013;3:2704.
52. Ma L, Lan B, Guo L, Nong S, Huang C, Wu Q, et al. GSTM1 and GSTT1 Gene Polymorphisms, Gene-Gene Interaction, and Esophageal Carcinoma Risk: Evidence from an Updated Meta-Analysis. *Genet Test Mol Biomark.* 2018 Jan;22(1):11–9.
53. Li J, Xu W, Liu F, Huang S, He M. GSTM1 polymorphism contribute to colorectal cancer in Asian populations: a prospective meta-analysis. *Sci Rep* [Internet]. 2015 Jul 29 [cited 2017 Dec 13];5. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4649893/>
54. Liao C, Cao Y, Wu L, Huang J, Gao F. An updating meta-analysis of the glutathione S-transferase T1 polymorphisms and colorectal cancer risk: a HuGE review. *Int J Colorectal Dis.* 2010 Jan;25(1):25–37.
55. Cong N, Liu L, Xie Y, Shao W, Song J. Association between Glutathione S-Transferase T1, M1, and P1 Genotypes and the Risk of Colorectal Cancer. *J Korean Med Sci.* 2014 Nov;29(11):1488–92.
56. Coles BF, Morel F, Rauch C, Huber WW, Yang M, Teitel CH, et al. Effect of polymorphism in the human glutathione S-transferase A1 promoter on hepatic GSTA1 and GSTA2 expression. *Pharmacogenetics.* 2001 Nov;11(8):663–9.
57. Coles BF, Kadlubar FF. Human alpha class glutathione S-transferases: genetic polymorphism, expression, and susceptibility to disease. *Methods Enzymol.* 2005;401:9–42.
58. Hezova R, Bienertova-Vasku J, Sachlova M, Brezkova V, Vasku A, Svoboda M, et al. Common polymorphisms in GSTM1, GSTT1, GSTP1, GSTA1 and susceptibility to colorectal cancer in the Central European population. *Eur J Med Res.* 2012 Jun 14;17(1):17.
59. Gao F-H, Liu F, Wei W, Liu L-B, Xu M-H, Guo Z-Y, et al. Oridonin induces apoptosis and senescence by increasing hydrogen peroxide and glutathione depletion in colorectal cancer cells. *Int J Mol Med.* 2012 Apr 1;29(4):649–55.
60. Tang Y, Kassie F, Qian X, Ansha B, Turesky RJ. DNA Adduct Formation of 2-Amino-9H-pyrido[2,3-b]indole and 2-Amino-3,4-dimethylimidazo[4,5-f]quinoline in Mouse Liver and Extrahepatic Tissues During a Subchronic Feeding Study. *Toxicol Sci.* 2013 Jun;133(2):248–58.



61. Koh W-P, Nelson HH, Yuan J-M, Van den Berg D, Jin A, Wang R, et al. Glutathione S-transferase (GST) gene polymorphisms, cigarette smoking and colorectal cancer risk among Chinese in Singapore. *Carcinogenesis*. 2011 Oct;32(10):1507–11.
62. McIlwain CC, Townsend DM, Tew KD. Glutathione S-transferase polymorphisms: cancer incidence and therapy. *Oncogene*. 2006 Mar 13;25(11):1639–48.
63. Tan Z, Feng M, Luo Y, Sun C, Fan Z, Tan Y, et al. GSTP1 Ile105Val polymorphism and colorectal cancer risk: an updated analysis. *Gene*. 2013 Sep 15;527(1):275–82.
64. Little J, Sharp L, Masson LF, Brockton NT, Cotton SC, Haites NE, et al. Colorectal cancer and genetic polymorphisms of CYP1A1, GSTM1 and GSTT1: a case-control study in the Grampian region of Scotland. *Int J Cancer*. 2006 Nov 1;119(9):2155–64.
65. Abdel-Rahman SZ, el-Zein RA, Anwar WA, Au WW. A multiplex PCR procedure for polymorphic analysis of GSTM1 and GSTT1 genes in population studies. *Cancer Lett*. 1996 Oct 22;107(2):229–33.
66. Stankovic S. Tumor markers: Analytical methodologies. *Jugosl Med Biohemija*. 2006;25(2):89–101.
67. Zhunussova G, Zhunusbekova B, Djansugurova L. Association between glutathione S-transferase M1 and T1 polymorphisms and colorectal cancer risk in patients from Kazakhstan. *Clin Lab*. 2015;61(1–2):161–8.
68. Polimanti R, Carboni C, Baesso I, Piacentini S, Iorio A, De Stefano GF, et al. Genetic variability of glutathione S-transferase enzymes in human populations: functional inter-ethnic differences in detoxification systems. *Gene*. 2013 Jan 1;512(1):102–7.
69. Economopoulos KP, Sergentanis TN. GSTM1, GSTT1, GSTP1, GSTA1 and colorectal cancer risk: a comprehensive meta-analysis. *Eur J Cancer Oxf Engl* 1990. 2010 Jun;46(9):1617–31.
70. van der Logt EMJ, Bergevoet SM, Roelofs HMJ, van Hooijdonk Z, te Morsche RHM, Wobbes T, et al. Genetic polymorphisms in UDP-glucuronosyltransferases and glutathione S-transferases and colorectal cancer risk. *Carcinogenesis*. 2004 Dec;25(12):2407–15.
71. Martínez C, Martín F, Fernández JM, García-Martín E, Sastre J, Díaz-Rubio M, et al. Glutathione S-transferases mu 1, theta 1, pi 1, alpha 1 and mu 3 genetic polymorphisms and the risk of colorectal and gastric cancers in humans. *Pharmacogenomics*. 2006 Jul;7(5):711–8.

72. Küry S, Buecher B, Robiou-du-Pont S, Scoul C, Colman H, Le Neel T, et al. Low-penetrance alleles predisposing to sporadic colorectal cancers: a French case-controlled genetic association study. *BMC Cancer*. 2008 Nov 7;8:326.
73. Tijhuis MJ, Wark PA, Aarts JMMJG, Visker MHPW, Nagengast FM, Kok FJ, et al. GSTP1 and GSTA1 polymorphisms interact with cruciferous vegetable intake in colorectal adenoma risk. *Cancer Epidemiol Biomark Prev Publ Am Assoc Cancer Res Cosponsored Am Soc Prev Oncol*. 2005 Dec;14(12):2943–51.
74. Yan S, Wang Z, Wang Z, Duan Q, Wang X, Li J, et al. Glutathione S-transferase M1 null genotype related to poor prognosis of colorectal cancer. *Tumour Biol J Int Soc Oncodevelopmental Biol Med*. 2016 Aug;37(8):10229–34.
75. de Bruin WC, Wagenmans MJ, Peters WH. Expression of glutathione S-transferase alpha, P1-1 and T1-1 in the human gastrointestinal tract. *Jpn J Cancer Res Gann*. 2000 Mar;91(3):310–6.
76. Qin X, Zhou Y, Chen Y, Li N, Chen B, Yang P, et al. Glutathione S-transferase T1 gene polymorphism and colorectal cancer risk: an updated analysis. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*. 2013 Dec;37(6):626–35.
77. Wan H, Zhou Y, Yang P, Chen B, Jia G, Wu X. Genetic polymorphism of glutathione S-transferase T1 and the risk of colorectal cancer: a meta-analysis. *Cancer Epidemiol*. 2010 Feb;34(1):66–72.
78. Masood N, Mubashar A, Yasmin A. Epidemiological factors related to GSTM1 and GSTT1 genes deletion in colon and rectum cancers: A case-control study. *Cancer Biomark Sect Dis Markers*. 2015;15(5):583–9.
79. Strange RC, Fryer AA. The glutathione S-transferases: influence of polymorphism on cancer susceptibility. *IARC Sci Publ*. 1999;(148):231–49.
80. Rodrigues-Fleming GH, Fernandes GM de M, Russo A, Biselli-Chicote PM, Netinho JG, Pavarino EC, et al. Molecular evaluation of glutathione S transferase family genes in patients with sporadic colorectal cancer. *World J Gastroenterol*. 2018 Oct 21;24(39):4462–71.
81. Funke S, Timofeeva M, Risch A, Hoffmeister M, Stegmaier C, Seiler CM, et al. Genetic polymorphisms in GST genes and survival of colorectal cancer patients treated with chemotherapy. *Pharmacogenomics*. 2010 Jan;11(1):33–41.
82. Klusek J, Nasierowska-Guttmejer A, Kowalik A, Wawrzycka I, Chrapek M, Lewitowicz P, et al. The Influence of Red Meat on Colorectal Cancer Occurrence Is Dependent on the Genetic Polymorphisms of S-Glutathione Transferase Genes. *Nutrients*. 2019 Jul 22;11(7).

83. Pan Z, Fu Z, Song Q, Cao W, Cheng W, Xu X. Genetic polymorphisms and haplotype of hormone-related genes are associated with the risk of breast cancer in Chinese women. *Genet Mol Res GMR*. 2016 May 13;15(2).
84. Matakova T, Sivonova M, Halasova E, Mistuna D, Dzian A, Masar J, et al. Polymorphisms of biotransforming enzymes (GSTs) and their association with colorectal cancer in the Slovak population. *Neoplasma*. 2009;56(5):422–7.
85. Wang J, Jiang J, Zhao Y, Gajalakshmi V, Kuriki K, Suzuki S, et al. Genetic polymorphisms of glutathione S-transferase genes and susceptibility to colorectal cancer: a case-control study in an Indian population. *Cancer Epidemiol*. 2011 Feb;35(1):66–72.
86. Kassab A, Msolly A, Lakhdar R, Gharbi O, Miled A. Polymorphisms of glutathione-S-transferases M1, T1, P1 and susceptibility to colorectal cancer in a sample of the Tunisian population. *Med Oncol Northwood Lond Engl*. 2014 Jan;31(1):760.
87. Ramsey SD, Holmes RS, McDermott CL, Blough DK, Petrin KL, Poole EM, et al. A Comparison of Approaches for Association Studies of Polymorphisms and Colorectal Cancer Risk. *Colorectal Dis Off J Assoc Coloproctology G B Irel*. 2012 Sep;14(9):e573–86.
88. Kap EJ, Richter S, Rudolph A, Jansen L, Ulrich A, Hoffmeister M, et al. Genetic variants in the glutathione S-transferase genes and survival in colorectal cancer patients after chemotherapy and differences according to treatment with oxaliplatin. *Pharmacogenet Genomics*. 2014 Jul;24(7):340–7.
89. KUMAMOTO K, ISHIBASHI K, OKADA N, TAJIMA Y, KUWABARA K, KUMAGAI Y, et al. Polymorphisms of GSTP1, ERCC2 and TS-3' UTR are associated with the clinical outcome of mFOLFOX6 in colorectal cancer patients. *Oncol Lett*. 2013 Sep;6(3):648–54.
90. Ateş NA, Tamer L, Ateş C, Ercan B, Elipek T, Ocal K, et al. Glutathione S-transferase M1, T1, P1 genotypes and risk for development of colorectal cancer. *Biochem Genet*. 2005 Apr;43(3–4):149–63.
91. Harrison LE, Guillem JG, Paty P, Cohen AM. Preoperative carcinoembryonic antigen predicts outcomes in node-negative colon cancer patients: a multivariate analysis of 572 patients. *J Am Coll Surg*. 1997 Jul;185(1):55–9.
92. Jeon BG, Shin R, Chung JK, Jung IM, Heo SC. Individualized Cutoff Value of the Preoperative Carcinoembryonic Antigen Level is Necessary for Optimal Use as a Prognostic Marker. *Ann Coloproctology*. 2013 Jun;29(3):106–14.
93. Nakagoe T, Sawai T, Ayabe H, Nakazaki T, Ishikaw H, Hatano K, et al. Prognostic value of carcinoembryonic antigen (CEA) in tumor tissue of patients with colorectal cancer. *Anticancer Res*. 2001 Aug;21(4B):3031–6.

94. Kirat HT, Ozturk E, Lavery IC, Kiran RP. The predictive value of preoperative carcinoembryonic antigen level in the prognosis of colon cancer. *Am J Surg*. 2012 Oct;204(4):447–52.
95. Lin P-C, Lin J-K, Lin C-C, Wang H-S, Yang S-H, Jiang J-K, et al. Carbohydrate antigen 19-9 is a valuable prognostic factor in colorectal cancer patients with normal levels of carcinoembryonic antigen and may help predict lung metastasis. *Int J Colorectal Dis*. 2012 Oct;27(10):1333–8.
96. Rognum T, Elgjo K, Brandtzaeg P, Orjasaeter H, Bergan A. Plasma carcinoembryonic antigen concentrations and immunohistochemical patterns of epithelial marker antigens in patients with large bowel carcinoma. *J Clin Pathol*. 1982 Sep;35(9):922–33.
97. Chapman MA, Buckley D, Henson DB, Armitage NC. Preoperative carcinoembryonic antigen is related to tumour stage and long-term survival in colorectal cancer. *Br J Cancer*. 1998 Nov;78(10):1346–9.
98. Moertel CG, O'Fallon JR, Go VL, O'Connell MJ, Thynne GS. The preoperative carcinoembryonic antigen test in the diagnosis, staging, and prognosis of colorectal cancer. *Cancer*. 1986 Aug 1;58(3):603–10.
99. Mayer RJ, Garnick MB, Steele GD, Zamcheck N. Carcinoembryonic antigen (CEA) as a monitor of chemotherapy in disseminated colorectal cancer. *Cancer*. 1978 Sep;42(3 Suppl):1428–33.
100. Park IJ, Kim HC, Yu CS, Yoo JH, Kim JC. Cutoff values of preoperative s-CEA levels for predicting survivals after curative resection of colorectal cancer. *J Korean Med Sci*. 2005 Aug;20(4):624–7.
101. Levy M, Visokai V, Lipska L, Topolcan O. Tumor markers in staging and prognosis of colorectal carcinoma. *Neoplasma*. 2008;55(2):138–42.
102. Polat E, Duman U, Duman M, Atici AE, Reyhan E, Dalgic T, et al. Diagnostic value of preoperative serum carcinoembryonic antigen and carbohydrate antigen 19-9 in colorectal cancer. *Curr Oncol Tor Ont*. 2014 Feb;21(1):e1-7.
103. Pakdel A, Malekzadeh M, Naghibalhossaini F. The association between preoperative serum CEA concentrations and synchronous liver metastasis in colorectal cancer patients. *Cancer Biomark Sect Dis Markers*. 2016;16(2):245–52.
104. Al-Shuneigat JM, Mahgoub SS, Huq F. Colorectal carcinoma: nucleosomes, carcinoembryonic antigen and ca 19-9 as apoptotic markers; a comparative study. *J Biomed Sci*. 2011 Jul 25;18(1):50.
105. Zheng C-X, Zhan W-H, Zhao J-Z, Zheng D, Wang D-P, He Y-L, et al. Prognostic value of preoperative serum levels of CEA, CA19-9 and CA72-4 in patients with colorectal cancer. *World J Gastroenterol*. 2001 Jun 15;7(3):431–4.

106. Siegel R, Ward E, Brawley O, Jemal A. Cancer statistics, 2011: the impact of eliminating socioeconomic and racial disparities on premature cancer deaths. *CA Cancer J Clin.* 2011 Aug;61(4):212–36.
107. Feng J-F, Huang Y, Zhao Q, Chen Q-X. Clinical significance of preoperative neutrophil lymphocyte ratio versus platelet lymphocyte ratio in patients with small cell carcinoma of the esophagus. *ScientificWorldJournal.* 2013;2013:504365.
108. D'Incà R, Cardin R, Benazzato L, Angriman I, Martines D, Sturniolo GC. Oxidative DNA damage in the mucosa of ulcerative colitis increases with disease duration and dysplasia. *Inflamm Bowel Dis.* 2004 Jan;10(1):23–7.
109. Rogler G. Chronic ulcerative colitis and colorectal cancer. *Cancer Lett.* 2014 Apr 10;345(2):235–41.
110. Marnett LJ. Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis.* 2000 Mar;21(3):361–70.
111. McDonald B, Spicer J, Giannais B, Fallavollita L, Brodt P, Ferri LE. Systemic inflammation increases cancer cell adhesion to hepatic sinusoids by neutrophil mediated mechanisms. *Int J Cancer.* 2009 Sep 15;125(6):1298–305.
112. Itzkowitz SH, Yio X. Inflammation and cancer IV. Colorectal cancer in inflammatory bowel disease: the role of inflammation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2004 Jul;287(1):G7-17.
113. Burr NE, Hull MA, Subramanian V. Does aspirin or non-aspirin non-steroidal anti-inflammatory drug use prevent colorectal cancer in inflammatory bowel disease? *World J Gastroenterol.* 2016 Apr 7;22(13):3679–86.
114. Mariani F, Sena P, Roncucci L. Inflammatory pathways in the early steps of colorectal cancer development. *World J Gastroenterol.* 2014 Aug 7;20(29):9716–31.
115. Tecchio C, Cassatella MA. Neutrophil-derived cytokines involved in physiological and pathological angiogenesis. *Chem Immunol Allergy.* 2014;99:123–37.
116. Spicer JD, McDonald B, Cools-Lartigue JJ, Chow SC, Giannias B, Kubes P, et al. Neutrophils promote liver metastasis via Mac-1-mediated interactions with circulating tumor cells. *Cancer Res.* 2012 Aug 15;72(16):3919–27.
117. Kurt M, Onal IK, Sayilir AY, Beyazit Y, Oztas E, Kekilli M, et al. The role of mean platelet volume in the diagnosis of hepatocellular carcinoma in patients with chronic liver disease. *Hepatogastroenterology.* 2012 Aug;59(117):1580–2.

118. Wang Z, Jin H, Xu R, Mei Q, Fan D. Triptolide downregulates Rac1 and the JAK/STAT3 pathway and inhibits colitis-related colon cancer progression. *Exp Mol Med*. 2009 Oct 31;41(10):717–27.
119. Tang H, Li B, Zhang A, Lu W, Xiang C, Dong J. Prognostic Significance of Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio in Colorectal Liver Metastasis: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PloS One*. 2016;11(7):e0159447.
120. Kilincalp S, Çoban Ş, Akinci H, Hamamcı M, Karaahmet F, Coşkun Y, et al. Neutrophil/lymphocyte ratio, platelet/lymphocyte ratio, and mean platelet volume as potential biomarkers for early detection and monitoring of colorectal adenocarcinoma. *Eur J Cancer Prev Off J Eur Cancer Prev Organ ECP*. 2015 Jul;24(4):328–33.
121. Li M-X, Liu X-M, Zhang X-F, Zhang J-F, Wang W-L, Zhu Y, et al. Prognostic role of neutrophil-to-lymphocyte ratio in colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *Int J Cancer*. 2014 May 15;134(10):2403–13.
122. Zahorec R. Ratio of neutrophil to lymphocyte counts--rapid and simple parameter of systemic inflammation and stress in critically ill. *Bratisl Lek Listy*. 2001;102(1):5–14.
123. Nieswandt B, Hafner M, Echtenacher B, Männel DN. Lysis of tumor cells by natural killer cells in mice is impeded by platelets. *Cancer Res*. 1999 Mar 15;59(6):1295–300.
124. Goubran HA, Stakiw J, Radosevic M, Burnouf T. Platelets effects on tumor growth. *Semin Oncol*. 2014 Jun;41(3):359–69.
125. Wiesner T, Bugl S, Mayer F, Hartmann JT, Kopp H-G. Differential changes in platelet VEGF, Tsp, CXCL12, and CXCL4 in patients with metastatic cancer. *Clin Exp Metastasis*. 2010 Mar;27(3):141–9.
126. He W, Yin C, Guo G, Jiang C, Wang F, Qiu H, et al. Initial neutrophil lymphocyte ratio is superior to platelet lymphocyte ratio as an adverse prognostic and predictive factor in metastatic colorectal cancer. *Med Oncol Northwood Lond Engl*. 2013 Mar;30(1):439.

## SKRAČENICE

5FU: 5-fluorouracil  
AJCC: Američko udruženje za ispitivanje kancera  
APC: adenomatous polyposis coli  
AUC : polje ispod krive  
BMI: bodi mass index  
BPDE: *benzo(a)pyrene diolepoxide*  
CA 19-9: karbohidratni antigen  
CEA: karcinoembriogeni antigen  
CI: interval poverenja  
CIN: hromozomska nestabilnost  
CIMP: CpG hipermetilacija  
CRM: cirkumferencijalna resekciona margina  
CT: kompjuterizovana tomografija  
DNK: dezoksiribonukleinska kiselina  
EDTA: *ethylenediaminetetraacetic acid*  
ELISA: *enzyme linked immunosorbent assays*  
ESMO: Evropsko udruženje za medicinsku onkologiju  
FAP: familijarna adenomatozna polipoza  
FOBT: test na okultnu krv u stolici  
KB: Kronova bolest  
KRK: kolorekalni karcinom  
GST: glutation transferaza  
GSH: glutatione  
HNPC: hereditarni nepolipozni kolorektalni karcinom  
HAA: heterociklični aromatični amini  
HT: hemioterapija  
LV: leukovorin  
MMR: DNK mismatch repair put  
MSI: mikrosatelitska nestabilnost  
MVP: srednji volumen trombocita  
NLR: odnos neutrofila i limfocita u leukocitarnoj formuli



OR: odnos šansi  
PAH: policiklični aromatični ugljovodonici  
PARP: Poly (ADP-ribose) polymerase  
PCR: *polymerase chain reaction*  
PJS: Peutz-Jeghers sindrom  
PLR: odnos trombocita i limfocita u leukocitarnoj formuli  
ROC: *receiver operator characteristics*  
RTG: roentgen  
RFLP: restriction fragment length polymorphism  
RNOS: reactive nitrogen oxygen species  
ROS: reactive oxygen species  
RIA: radioimunoesej  
SD: standardna devijacija  
SNP: *single nucleotide polymorphism*  
TNM: tumor-node-metastasis  
UK: ulcerozni colitis  
UZ: ultrazvuk abdomena  
WHO: svetska zdravstvena organizacija

## BIOGRAFIJA

Milica Stojković Lalošević rođena je 1985 god. u Beogradu gde je završila osnovnu školu i V beogradsku gimnaziju sa odličnim uspehom.

Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu upisala je 2004. godine, a na istom fakultetu diplomirala je 2010. godine sa prosečnom ocenom 9.50 i stekla zvanje doktora medicine. Iste godine upisala je specijalističke akademske studije, a završni rad „Pouzdanost ultrazvučne dijagnostike u proceni stepena portne hipertenzije u pacijenata sa cirozom jetre“ odbranila je 2012. godine i stekla zvanje akademskog specijaliste. Stručni ispit za doktore medicine položila je 2011 godine. Iste godine upisala je doktorske studije iz oblasti Molekularne medicine na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu. Od 2012. godine nalazi se u stalnom radnom odnosu na Klinici za gastroenterologiju i hepatologiju Kliničkog centra Srbije. Specijalizaciju iz interne medicine upisala je 2013.godine, a zvanje lekara specijaliste interne medicine stekla je 2018. godine. U zvanje kliničkog asistenta na katedri interne medicine izabrana je 2019. godine. Tokom marta i aprila 2013.godine usavršavala se na Odseku za portnu hipertenziju, AKH, Beč, Austrija i Krankenhaus Hietzing mit Neurologischem Zentrum Rosenhügel, Beč, Austrija. Tokom marta 2014. godine usavršavala se u Jedinici za transplantaciju jetre, Bolnica Merkur, Zagreb, Hrvatska. Pohađala je više kurseva koje organizuje Udruženje evropske gastroenterologije (UEG) kao i Evropsko udruženje za ispitivanje bolesti jetre (EASL). Dobitnik je više nagrada za najbolje radove na Evropskim kongresima gastroenterologa i hepatologa. Autor/koautor je u 25 radova, od kojih je 20 publikovano u časopisima indeksiranim u SCI. Njeni radovi citirani su 84 puta prema SCOPUS-u i h indeks iznosi 6.

## Изјава о ауторству, о истоветности штампане и електронске верзије и о коришћењу

Име и презиме аутора \_\_\_\_\_ Milica Stojković Lalošević \_\_\_\_\_  
Број индекса \_\_\_\_\_ ММ 15/11 \_\_\_\_\_

### Изјављујем

1) да је завршни рад под насловом

ODREĐIVANJE POLIMORFIZAMA GENA ZA GLUTATION TRANSFERAZU I  
BIOHEMIJSKIH MARKERA KOD BOLESNIKA SA KOLOREKTALNIM KARCINOMOM

- резултат сопственог стручног и истраживачког рада;
- да рад у целини ни у деловима није био предложен 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;

2) да је штампана верзија мог завршног 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, 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.

3) да овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе мој завршни рад који је моје ауторско дело.

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

Мој завршни рад, похрањен у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступан 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, \_20.01.2020\_\_\_\_\_

*Мимица Ђурђић*