



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА



Наташа Здравковић

**Експресија p16, p53 и VEGF и цитокински профил у колоректалном
карциному и инфламаторним болестима црева**

ДОКТОРСКА ДИСЕРТАЦИЈА

Ментор: Доц. др Иван Јовановић

КРАГУЈЕВАЦ, 2014. године

**Својим родитељима
и братанцима Матеји и Алекси...**

Овом приликом се захваљујем свом ментору доц. др Ивану Јовановићу на свесврдној помоћи током израде докторске дисертације, као и проф. др Небојши Арсенијевићу на иницијативи, подршци, сугестијама и залагању у реализацији тезе.

Захваљујем се доц. др Гордани Радосављевић и доц. др Слободанки Митровић Азањац на подршци, сугестијама и великом доприносу у реализацији ове тезе.

Хвала истраживачком тиму Центра за молекулску медицину и истраживање матичних ћелија Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу и колективу Центра за гастроентерохепатологију Клиничког центра Крагујевац на помоћи у реализацији тезе, као и Браниславу Стевановићу за уложени труд у финалној графичкој обради.

Захваљујем се проф. др Небојши Здравковићу на статистичкој обради.

Огромну захвалност дугујем својим родитељима Драгану и Милицы на безрезервној подршци.

САДРЖАЈ

УВОД	3
1.1. Иmunски систем и типови имунског одговора.....	3
1.2. Инфламацијске болести црева.....	5
1.2.1. Епидемиологија инфламацијских болести црева.....	5
1.2.2. Генетски фактори у развоју инфламацијских болести црева.....	6
1.2.3. Патогенеза инфламацијских болести црева.....	7
1.3. Улцерозни колитис.....	13
1.4. Кронова болест.....	14
1.5. Компликације инфламацијских болести црева.....	16
1.5.1. Интестиналне компликације улцерозног колитиса.....	16
1.5.2. Интестиналне компликације Кронове болести.....	16
1.5.3. Екстраинтестиналне манифестације инфламацијских болести црева.....	18
1.6. Колоректални карцином.....	19
1.6.1. Епидемиологија колоректалног карцинома.....	19
1.6.2. Класификација колоректалног карцинома.....	19
1.6.3. Онкогенеза колоректалног карцинома.....	21
1.6.4. Онкогенеза колоректалног карцинома насталог на терену инфламацијских болести црева.....	24
1.6.5. Онкогенеза спорадичног колоректалног карцинома.....	26
1.6.6. Прогностички фактори.....	28
1.7. Иmunски одговор на туморе.....	29

ЦИЉ РАДА	30
МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ	31
3.1. Испитивани узорак.....	32
3.2. Истраживачки поступак.....	33
3.3. Одређивање концентрација цитокина, CRP-а и туморских маркера у серуму.....	36
3.4. Анализа експресије p16, p53 и VEGF у циљаном ткиву.....	37
3.5. Статистичка обрада података	38
РЕЗУЛТАТИ	39
ДИСКУСИЈА	89
ЗАКЉУЧЦИ	107
СКРАЋЕНИЦЕ	108
ЛИТЕРАТУРА	112
ПРИЛОГ	143
8.1. КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАТИКА.....	143
8.2. KEY WORDS DOCUMENTATION.....	147
8.3. БИОГРАФСКИ ПОДАЦИ АУТОРА.....	151
8.4. СПИСАК ОБЈАВЉЕНИХ РАДОВА.....	152
8.5. THE LIST OF PUBLISHED PAPERS.....	155
8.6. ИДЕНТИФИКАЦИОНА СТРАНИЦА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ.....	157

УВОД

Предмет овог истраживања је анализа експресије маркера p16, p53 и VEGF у циљаном ткиву и концентрације TNF- α , TGF- β , IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, IL-27 и IFN- γ у серуму оболелих од запаљенских болести црева и колоректалног карцинома. У уводном делу, пре описивања и дискусије добијених резултата, приказали смо опште аспекте патогенезе инфламацијских болести црева и карциногенезе, као и основне механизме имунског одговора у овим болестима, који могу бити од значаја за разматрање наших резултата.

1.1. ИМУНСКИ СИСТЕМ И ТИПОВИ ИМУНСКОГ ОДГОВОРА

Имуност је дефинисана као отпорност на болест. Скуп ћелија, ткива и молекула који посредује у отпорности на инфекцију назива се имунски систем, а координисана реакција тих ћелија и молекула на ифективне микроорганизме представља имунски одговор. Физиолошка функција имунског система је да спречи инфекције и искорени већ успостављене инфекције. Имунски систем је веома ефикасан у откривању и елиминисању страних инфективних агенаса, поштеђујући сопствене ћелије и ткива (1). Механизми одбране домаћина састоје се од урођене (зове се још природна, нативна) и стечене (зове се још специфична, адаптивна) имуности (1).

Функција урођене имуности је рана заштита од инфекција. Одбрану у урођеној имуности обезбеђују епителне баријере, специјализоване ћелије и природни антибиотици епитела који спречавају улазак микроорганизама. Ако микроорганизми ипак продру у ткива и циркулацију, на њих делују фагоцити, специјализовани лимфоцити названи „ћелије природне убице” (енгл. Natural Killer, NK) и протеини плазме, као што су протеини система комплемената. Кроз еволуцију многи микроорганизми су развили механизме којима избегавају урођену имуност. У одбрани од оваквих патогена централно место заузима стечена имуност. Стечена имуност посредована је лимфоцитима и њиховим продуктима, као што су антитела.

Постоје два типа стечене имуности: хуморална, која обезбеђује одбрану од екстрацелуларних микроорганизама и целуларна, која обезбеђује одбрану од интрацелуларних микроорганизама. Хуморални имунски одговор је посредован протеинима, који се називају антитела, а које стварају В лимфоцити. Антитела се луче у циркулацију и секрете мукоза и неутралишу и елиминишу микроорганизме и њихове токсине у крви и лумену гастроинтестиналног и респираторног тракта. Једна од главних функција антитела јесте да блокирају и неутралишу микроорганизме који се налазе на површини слузница и у крви. Целуларна имуност је посредована Т лимфоцитима. Антитела која стварају В лимфоцити препознају антигене екстрацелуларних микроорганизама, а Т лимфоцити препознају антигене интрацелуларних микроорганизама. Друга разлика између В и Т лимфоцита је, да већина Т лимфоцита препознаје само протеинске антигене, док су антитела способна да препознају већи број различитих типова молекула, укључујући протеине, угљене хидрате и липиде.

У ћелије имунског система спадају лимфоцити, специјализоване ћелије које хватају и презентују антигене микроорганизама и ефекторске ћелије, које елиминишу микроорганизме. Антигенима се могу сматрати сви молекули за које стечена имуност има рецептор. Лимфоцити су ћелије са јединственим рецепторима који су специфични за антиген и представљају главне медијаторе стечене имуности. Ове ћелије се разликују по површинским протеинима који се могу идентификовати панелима моноклонских

антитела. Стандардна номенклатура за ове протеине је CD (енгл. Cluster of Differentiation) и бројчана ознака, како би се описао површински протеин који дефинише одговарајући тип ћелије или фазу ћелијске диференцијације и које препознаје група антитела.

Међу Т лимфоцитима, CD8⁺ Т лимфоцити се називају цитотоксички или цитолитички Т лимфоцити (CTL, енгл. Cytotoxic T lymphocytes), зато што убијају (лизирају) ћелије инфициране интрацелуларним микроорганизмима. CD4⁺ Т лимфоцити се зову помагачки (енгл. T helper-Th), зато што помажу В лимфоцитима да продукују антитела и фагоцитима да униште ингестиране микроорганизме. Неки CD4⁺ Т лимфоцити припадају посебној субпопулацији чија је функција да спрече или ограниче имунски одговор и називају се регулаторни Т лимфоцити. Трећа врста лимфоцита су ћелије „урођене убице“ (енгл. Natural killer, NK) које уништавају инфициране аутологе ћелије, али ове ћелије не исказују клонски дистрибуиране рецепторе као Т и В лимфоцити и зато су компонента урођене имуности и способне су да брзо нападну инфициране ћелије.

Сви лимфоцити потичу од матичне ћелије костне сржи. В лимфоцити сазревају у костној сржи, а Т лимфоцити у тимусу. То су места у којима настају зрели лимфоцити и називају се централни лимфни органи. Зрели лимфоцити напуштају централне лимфне органе, улазе у циркулацију и периферне лимфне органе, где се срећу са антигеном за који експримирају специфичне рецепторе. Када наивни лимфоцити препознају антигене микроорганизама и добију додатне сигнале које индукују микроорганизми, антиген-специфични лимфоцити пролиферишу и диферентују се у ефекторске ћелије. Ефекторски В лимфоцити, названи плазмцити, луче антитела. Ефекторски CD4⁺ Т лимфоцити стварају протеине који се називају цитокини, којима активирају В лимфоците и макрофаге. Ефекторски CD8⁺ Т лимфоцити активирају машинерију за убијање инфициране ћелије домаћина.

Улазна врата за микроорганизме као што су кожа, гастроинтестинални и репираторни и урогенитални тракт, садрже у епителу специјализоване антиген презентујуће ћелије (APC, енгл. Antigen presenting cell), које сакупљају антигене, транспортују их до периферних лимфних органа и тамо их приказују лимфоцитима. Њихова функција је најбоље проучена код дендритских ћелија (енгл. Dendritic cells, DCs). Ове ћелије сакупљају протеинске антигене микроорганизама који продиру кроз епител и транспортују их до регионалних лимфних чворова, где делове антигена презентују Т лимфоцитима. Специјализоване ћелије које приказују антигене Т ћелијама и обезбеђују додатне активационе сигнале називају се „професионалне APC“. В лимфоцити могу директно да препознају антигене микроорганизама. Фоликулске дендритске ћелије (енгл. Follicular dendritic cell, FDC) приказују антигене који стимулишу диференцијацију В лимфоцита, а не презентују антигене Т лимфоцитима.

Th лимфоцити усмеравају функцију других имунских ћелија секрецијом цитокина. Помагачки CD4⁺ Т лимфоцити (енгл. T helper, Th) могу се диференцирати у специјализоване ефекторске ћелије (Th1, Th2 и Th17 лимфоците) које продукују различите цитокине, па самим тим обављају различите ефекторске функције. Макрофаги, NK ћелије и дендритске ћелије, такође могу секретовати цитокине (1).

Адекватније је имунски одговор означити са тип-1, тип-2 или тип-17, при чему је критеријум за разликовање специфичног цитокинског профила: цитокини тип-1: IFN- γ , TNF- α , IL-2, IL-12 и IL-18, тип-2: IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 и IL-13, тип-17: IL-6 и IL-17, регулаторни цитокини: IL-10 и TGF- β .

Најважнији цитокини Th1 лимфоцита су IFN- γ и TNF- α . Th1 лимфоцити покрећу ћелијски имунски одговор у борби против вируса и других интрацелуларних микроба, елиминишу карциномске ћелије и стимулишу касни тип преосетљивости. Тип-2 имунски одговор је праћен секрецијом интерлеукина-4 (IL-4), интерлеукина-5 (IL-5), интерлеукина-9 (IL-9) и интерлеукина-13 (IL-13) (2). Тип-2 цитокини активирају В лимфоците и учествују у хуморалном имунском одговору, укључујући продукцију антитела против екстрацелуларних патогена (3).

Обележје тип-17 имунског одговора је интерлеукин-17 (IL-17), потентни медијатор инфламаторног одговора у аутоимунским болестима (4,5). Последњих година IL-17 је класификован као медијатор урођене и стечене имуности (6). IL-17 и игра важну улогу у одбрани од инфекција као и у запаљенским и аутоимунским болестима, укључујући хроничну грануломатозну болест црева (7), мултиплу склерозу (8) и реуматоидни артритис (9). Показано је да овај цитокин игра кључну улогу у акутној инфламацији, у којој доминирају неутрофили (10). На тип-17 имунски одговор, као негативни регулатор, утиче интерлеукин-27 (IL-27), цитокин који продукују углавном дендритске ћелије, моноцити и макрофаги (11).

Регулаторне Т ћелије (T_{reg}) имају важну улогу у контроли имунског одговора и њихова смањена активност повећава ризик за развој аутоимунских болести (12). T_{reg} лимфоцити контролишу имунски одговор тако што мембранским молекулима или секрецијом цитокина супримирају пролиферацију Т лимфоцита (13). Укључени су у патогенезу бројних аутоимунских болести (нпр. мултипла склероза, дијабетес, хронична грануломатозна болест плућа), одбацивања трансплантата, болести калем против домаћина и алергија (13).

1.2. ИНФЛАМАЦИЈСКЕ БОЛЕСТИ ЦРЕВА

Кронова болест и улцерозни колитис су идиопатске инфламацијске болести црева (енгл. Inflammatory bowel disease, IBD) које карактеришу периоди релапса и ремисије. Инфламација је доминантно присутна у слuzници колона (понекад и у танком цреву,) код оболелих од улцерозног колитиса, док се код оболелих од Кронове болести инфламација која је углавном сегметног и трансмуралног типа може регистровати у свим деловима дигестивног тракта (од усне дупље до ануса), а нарочито у танком и дебелом цреву (14). Присутне су и бројне екстраинтестиналне манифестације ових болести. И улцерозни колитис и Кронова болест се клинички карактеришу рекурентним запаљењима сегмената гастроинтестиналног тракта и разноликим клиничким манифестацијама, често врло непредвидивим, па чак и фаталним (14).

1.2.1. Епидемиологија инфламацијских болести црева

Резултати бројних епидемиолошких студија указују на високу инциденцу улцерозног колитиса и Кронове болести у индустријским земљама Скандинавије, Велике Британије, северозападне Европе, северне Америке и Аустралије, а ниску инциденцу у Азији и Јужној Америци (15). Учесталост улцерозног колитиса варира од око 2 до 14 случајева на 100000 особа годишње и 3 до 14 случајева Кронове болести на 100000 особа годишње у Сједињеним Америчким Државама (16). Инциденца улцерозног колитиса стабилна је од педесетих година 20. века до данас, са десетоструком разликом учесталости у подручјима са високом и ниском инциденцом уз изузетак јужне Европе,

где детаљне епидемиолошке студије последњих година не детектују разлике у северној Европи, што је вероватно последица раног препознавања блажих облика болести. Стопа инциденце Кроне болести, посебно Крон колитиса, се битно разликује од кретања улцерозног колитиса. Забележено је шестероструко повећање у периоду од 1960. до 1980. након чега се појављује плато фаза у земљама са високомincidенцом ове болести. Улцерозни колитис је учесталији код мушкараца, а Кронева болест код жена. IBD показује бимодалну добну дистрибуцију, са највећом учесталашћу од 20 до 40 година и са могућношћу секундарног пораста инциденце у доби од 60 до 80 година (17). Етничке студије су показале да је инфламацијска болест црева најучесталија у белаца. Инциденца болести је виша у Јевреја и не-Јевреја у истој регији, у односу на становништво других регија. Постоје и разлике међу Јеврејима који живе у Израелу. Јевреји који су емигрирали у Израел из северне Америке и Европе имају већи ризик за настанак IBD-а од Јевреја који су рођени у Израелу, а који опет имају већи ризик од Јевреја рођених у Африци и Азији. Истраживања су показала фамилијарни карактер болести. Рођаци првога реда, посебно браћа и сестре, имају 10 до 15 пута већи ризик за настанак болести (18).

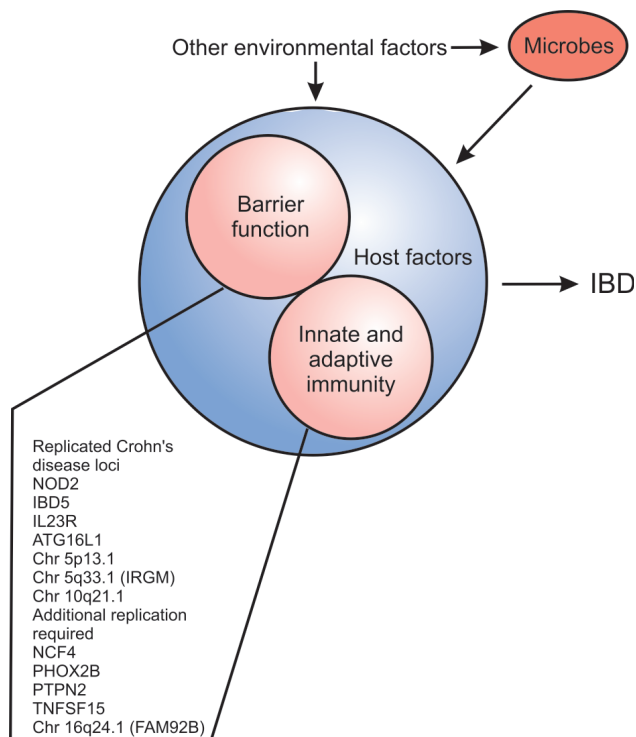
1.2.2. Генетски фактори у развоју инфламацијских болести црева

Улцерозни колитис и Кронева болест представљају хетерогене комплексне полигенске поремећаје. Сматра се да утицај генетских фактора у настанку улцерозног колитиса износи око 40%, а код Кроне болести око 60%. Природа генетске предиспозиције само је делимично разјашњена. Потврђена је удруженост улцерозног колитиса и HLA (енгл. Human leukocyte antigen) локуса на кратком краку хромозома 6 (18). Примећено је да је Кронева болест у вези са генски детерминисаним болестима као што су тирозин-позитивни албинизам, анкилозирајући спондилитис, цистична фиброза и Turner-ов синдром (18). Сматра се да у Кроневој болести дисрегулисан имунски одговор на антигене у лумену црева индукује хроничну упалу код генетски осетљивог домаћина. У физиолошким условима имунски одговор на антигене у цревима је супримиран, али код Кроне болести постоји прекид у толеранцији на ове антигене што за последицу има поремећен имунски одговор на антигене у цревима. Ћелије интестиналног епитела могу да експримирају и HLA молекуле II класе (HLA-DR и HLA-DP) који презентују антигене Т лимфоцитима. Дистрибуција ових молекула у зиду гастроинтестиналног тракта (ГИТ) корелира са анатомском дистрибуцијом Кроне болести: готово их нема у једњаку и желуцу, расте им експресија према танком цреву, максимална је у завршном илеуму, а затим опада у дебелом цреву (19). Резултати студија заснованих на анализи генома указују на постојање гена осетљивости за развој Кроне болести, а који је смештен на хромозому 16 (IBD 1 локус). Новије студије су показале да број мутација тог гена има утицај на фенотип болести, тако да је више од две мутације повезано са настанком стриктура. Ген осетљивости за оба IBD фенотипа нађен је у 41 сМ регији 12q13-14 на хромозому 12 (IBD 2 локус). Нађене су још непотврђене повезаности са локусима хромозома 1p (IBD локус), 4q (локус за улцерозни колитис) и др. Очито је да су потребне велике генетске епидемиолошке студије које би довеле до потврде сигурне повезаности одређених гена и IBD (20).

1.2.3. Патогенеза инфламацијских болести црева

Кронова болест и улцерозни колитис су последица генетске предиспозиције и абнормалног имунског одговора на коменсалне микроорганизме који насељавају слузницу црева. Тип имунског одговора одређује манифестацију болести. Претпоставља се да измењен мукус код улцерозног колитиса и абнормална интестинална епителна пермеабилност код обе болести, олакшавају приступ луминалних дијеталних и бактеријских продуката слузници. Ови продукти се обрађују у антиген презентујућим ћелијама и њихови пептиди се приказују у склопу молекула МНС које препознају Т лимфоцити специфични за тај антиген. Код здравих особа ова презентација резултира имунском толеранцијом. Код IBD, због поремећаја у имунорегулацији, долази до неконтролисаног и пролонгираног запаљенског одговора. Оштећена епителна баријера узрокује сталан продор микроорганизама и њихову интензивну фагоцитозу. Постоји мишљење да је кључ поремећене имунорегулације дефицијенција регулаторних Т лимфоцита. Повећана експресија нуклеарних транскрипцијских фактора (NFAT, AP-1, NFκB) изазива ексцесивно локално накупљање посредника запаљења, попут цитокина, фактора раста, реактивних оксидативних метаболита, леукотриена, тромбосана, простагландина, активатора тромбоцита, протеаза и неуропептида. Оштећење слузнице олакшава транслокацију луминалног садржаја, што перпетуира запаљенски одговор (18). Специфична етиологија инфламацијских болести је још увек непозната. У етио патогенези Кронове болести и улцерозног колитиса важни су: наслеђе (генетска предиспозиција, мутација гена за NOD2 (енгл. Nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 2), микроорганизми присутни у лумену црева, фактори спољашње средине (дуван, стрес, употреба нестероидних анти инфламаторних лекова, итд...), поремећај имунског одговора (слика 1) (21). Мутација гена за NOD2 на 16.-ом хромозому повезана је са готово петином случајева Кронове болести. Експресија NOD2 рецептора карактеристична је за моноците. NOD2 представља интрацитоплазматски рецептор за молекулске обрасце коменсалних бактерија у гастроинтестиналном тракту. Ови рецептори препознају продукте микроорганизама, али и агенсе који указују на оштећење ћелија. Након препознавања, рецептори се олигомеризују са адаптерским протеинима, активирају каспазу 1, која сече и активира цитокин IL-1β. Комплекс који граде NOD рецептор, адапторни протеин и каспаза 1 назива се инфламазом. Мутације NOD гена појачавају активност инфлазома и узрок су аутоинфламаторног синдрома (1). Услед мутације NOD2 гена настаје поремећај у елиминацији фагоцитованих бактерија. Макрофаги слабије елиминишу фагоцитоване микроорганизме и слабије презентују антигене Т лимфоцитима чиме је ослабљен Т ћелијски имунски одговор. Још један од етиолошких фактора је и поремећај тесних веза између епителних ћелија, што такође омогућава продор микроорганизама. Као одговор на продор микроорганизама, Т лимфоцити продукују велику количину про инфламаторних цитокина TNF-α, IFN-γ, IL-12 што узрокује снажну инфламацију у цревима и индукује продукцију металопротеиназа матрикса одговорних за деструкцију ткива. IL-10 има заштитну улогу у патогенези инфламацијских болести црева, обзиром да се симптоми карактеристични за Кронову болест спонтано јављају код мишева којима је уклоњен ген за IL-10. Уз то, код експерименталних модела је уочено да регулаторни Т лимфоцити превенирају колитис и то продукцијом TGF-β и IL-10. У патогенези улцерозног колитиса важну улогу имају и NKT ћелије (енгл. Natural killer T cell) које имају протективно дејство на епителне ћелије слузнице црева. Антиген презентујуће

ћелије из lamina propria-е презентују антигене у склопу CD1 молекула NKT ћелијама. Активиране NKT ћелије испољавају директно протективно дејство на епителне ћелије слузнице црева или продукцијом IL-13 који појачава тесне везе између епителних ћелија, одржавајући интегритет епителне баријере (21).



Слика 1. Етиопатогенеза инфламацијских болести црева (преузето из: Xavier RJ and Podolsky DK. Nature 2007: 448:427-434)

Гастроинтестинални тракт је највећи орган имунског система. Преко 90% свих контаката са микроорганизмима дешава се на слузници гастроинтестиналног тракта и преко 400 врста бактерија живи у гастроинтестиналном тракту. Он је заштићен неколицином неспецифичних механизма.

Епителне ћелије формирају важну физичку баријеру, тесним везама између ћелија и брзим животним циклусима (24-96 сати). Свако оштећење епителне баријере резултује миграцијом суседних ћелија које прекривају оштећену површину-реституција. Кисели рН желуца представља хемијску баријеру продору микроорганизма. Пролазак микроорганизма кроз ову баријеру чест је код болесника са ахлорхидријом код атрофичног гастритиса. Промена нормалне микрофлоре гастроинтестиналног тракта може омогућити „ширење“ патогена (18). Гастроинтестинални површински епител поседује способност брзог успостављања интегритета након повреде. Брза репарација слузнице постиже се процесом епителне реституције, коју касније прати пролиферација епителних ћелија и њихова диференцијација. Епителна реституција је праћена миграцијом вијабилних епителних ћелија из подручја око и испод оштећене слузнице, које брзо прекривају дефект слузнице. Реституција је посредована регулаторним пептидима, факторима раста и цитокинима. Најважнији су регулаторни пептиди који делују на базолатералној страни епителне површине (TGF- β -зависни пут) и TFF пептид (енгл. Trefoil factor family) који делују са апикалне стране интестиналног епитела заједно са гликопротеинима слузи. TFF пептиде који су резистентни на дигестију протеаза, стварају ћелије дуж читавог гастроинтестиналног тракта. У процесу

реституције епитела учествују и други пептиди (коагулацијски фактори, фактори екстрацелуларног матрикса) и непептидни молекули као што су фосфолипиди, масне киселине кратких ланаца, аденински нуклеотиди. Ти се молекули отпуштају из тромбоцита, ћелија строме, активираних епителних ћелија и имају важну улогу у модулацији интестиналне повреде (18).

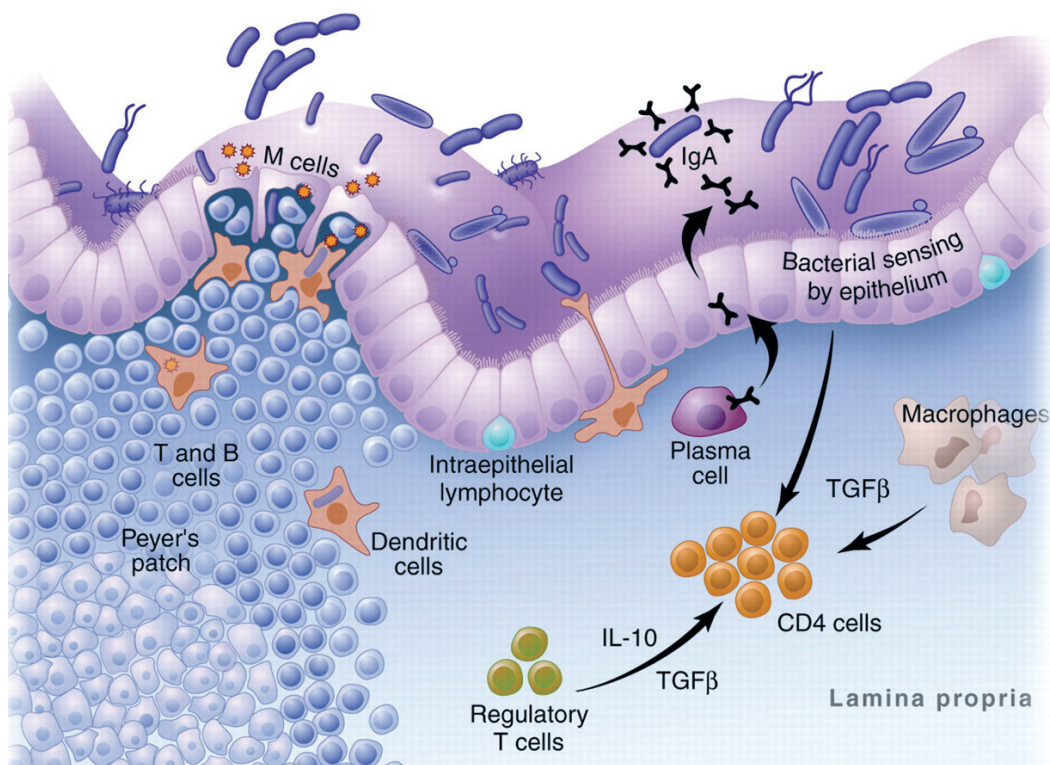
Лимфно ткиво гастроинтестиналног тракта (енгл. Gut associated lymphoid tissue, GALT) чине Пајерове плоче и дифузно дистрибуирани лимфоцити (слика 2). Пајерове плоче су прекривене специјализованим епителом (епител придружен фоликулима). Међу епителним ћелијама налазе се и М ћелије (енгл. Microfold: ћелије са „набораном мембраном”), епителне ћелије специјализоване за транспорт микроорганизама из лумена црева до Т и В лимфоцита. У Пајеровим плочама налазе се и специјализовани В и помагачки Th (од енгл. T helper) лимфоцити. Th лимфоцити посредством продукције TGF- β узрокују промену класе антитела у В лимфоцитима, односно подстичу продукцију IgA. В лимфоцити који секретују превасходно IgA мигрирају из Пајерових плоча, кроз лимфне судове и мезентеричне лимфне чворове, до ductus thoracicus-а и улазе у циркулацију. Из циркулације се враћају у lamina propria-у, где сазревају у плазмците који секретују IgA. IgA је у тзв. секретованој форми присутан у лумену црева у форми димера кога чине два молекула IgA спојена J (енгл. Joining) ланцем. IgA неутралишу вирусе, бактерије и токсине тако што спречавају адхеренцију патогених микроорганизама за епител (23). Интраепителни Т лимфоцити експримирају HML1 (енгл. Human mucosal lymphocyte antigen 1, означен и као CD103) лиганд за E-кадхерин, који им омогућује интраепително задржавање. Интраепителне Т лимфоците чине три популације ћелија. Највећу популацију чине CD8⁺ лимфоцити који експримирају $\gamma\delta$ Т-ћелијски рецептор, за разлику од Т лимфоцита периферне крви који доминантно експримирају $\alpha\beta$ Т ћелијски рецептор. Међу интраепителним Т лимфоцитима постоји и популација лимфоцита која експримира $\alpha\beta$ Т ћелијски рецептор, док трећу популацију чине они који експримирају и CD4 и CD8 корецептор (24).

Лимфоцити присутни у lamina propria-и експримирају $\alpha4\beta7$ интегрин (лиганд за Mad-Cam1) и CCR9 хемокински рецептор који им омогућују долазак у lamina propria-у. Међу њима доминирају Т лимфоцити (4:1 у односу на В лимфоците). Ови Т лимфоцити слабије пролиферишу након стимулације TCR рецептора, али продукују велику количину цитокина: TNF- α , IFN- γ , IL-4, IL-2 (25, 26).

Ингестија антигена може да покрене локални или системски имунски одговор или оралну толеранцију (посебан облик нереаговања на антиген).

Велики број макромолекула се абсорбује из гастроинтестиналног тракта у портну и системску циркулацију. Фагоцити у јетри (Купферове ћелије) уништавају многе антигене, али неки од ових антигена пролазе кроз јетру и индукују системску продукцију антитела, углавном у слезини.

Јединствена способност имунског система у слезници гастроинтестиналног тракта јесте да спречи имунски одговор на антигене хране и тако индукује оралну толеранцију на ове антигене (18).



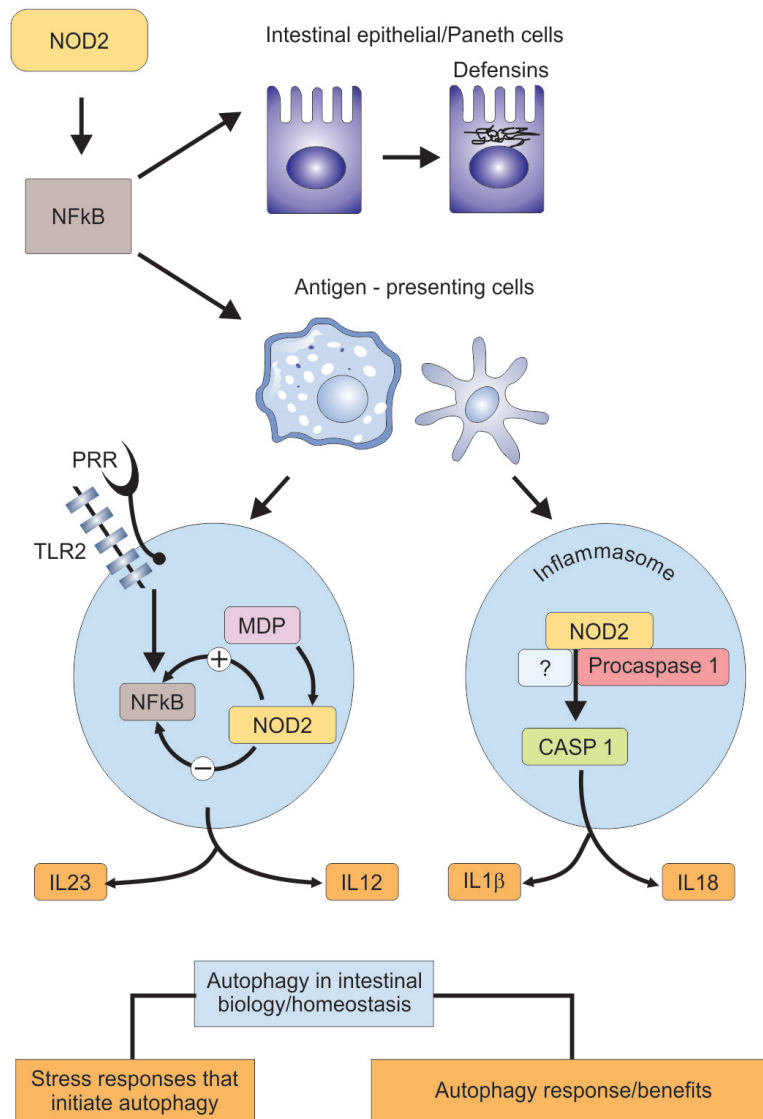
Слика 2. Лимфно ткиво гастроинтестиналног тракта (преузето из: Cheroutre H, Madakamutil L. Nat Rev Immunol 2004; 4: 290-300)

Имунски систем заузима централно место у патогенези инфламацијских болести црева и прогресији болести (22). Тип имунског одговора у Кроновој болести се разликује од типа имунског одговора у улцерозном колитису, што потврђују и патохистолошке промене као што је присуство гранулома у Кроновој болести, а у улцерозном колитису инфилтрација неутрофила праћена епителном деструкцијом. У Кроновој болести доминира ћелијски имунски одговор посредован Th1 лимфоцитима уз продукцију цитокина IL-2, IL-8, IL-12, IFN- γ и TNF- α . У улцерозном колитису доминира Th2 тип имунског одговора са продукцијом IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 и IL-13, који карактерише углавном хуморални имунски одговор. Стога не изненађује да је улцерозни колитис удружен са аутоимунским болестима, попут Hashimotovog тиреоидитиса и SLE (енгл. Systemic lupus erythematosus) и праћен је повећаном продукцијом аутоантитела pANCA (енгл. Perinuclear anti-neutrophil cytoplasmic antibodies). Код Кронове болести су присутни грануломатозни инфилтратаи у слузници и повећана реактивност Т лимфоцита. Оштра подела на два типа имунског одговора није увек присутна, тако да се врло често могу уочити преклапања, као код рефрактерног pouchitisa код болесника са улцерозним колитисом који хистолошки наликује Кроновој болести, укључујући фистулизацију. У тим случајевима кључни фактор је промена микрооколине и изложеност слузнице танког црева микрофлори колона. Управо због тога, код оцене типа имунског одговора важно је уз генетску подлогу и тип имунског одговора, препознати и луминални садржај као важан чинилац имунског одговора. Промене луминалних фактора се јављују код ентероентералних фистула у Кроновој болести, током проктоколектомије код улцерозног колитиса и приликом давања пробиотика. Лекови такође могу утицати и на тип имунског одговора, јер је познато да се након низа година примене терапије може променити тип имунског одговора код истог болесника (18). До данас нису разјашњени механизми овог феномена.

Имунски одговор код улцерозног колитиса и Кроне болести

Број макрофага и дендритских ћелија је повећан у слузници и ове ћелије имају проинфламаторни фенотип у улцерозном колитису и Кроневој болести. Продукција проинфламаторних цитокина и хемокина је појачана у инфламацијским болестима црева као и експресија адхезивних молекула и костимулативних молекула. Цитокини типа Th1 и Th17 су укључени у природном имунском одговору (нпр. IL-12, IL-23 и IL-27), међутим, селективно су активирани у Кроневој болести. Адхезивни молекули као што је интра ћелијски адхезивни молекул 1 (ICAM1) је неопходан за циркулишуће ћелије да би се адхезирале за активирани ендотел, што је први корак у екстравазацији моноклеарних и полинуклеарних ћелија у инфламаторни фокус. Поред тога адхезивни молекули посредују у миграцији имунских ћелија кроз строму до извора хемокина, као и кроз епител до лумена, где производе криптне апсцесе. Проинфламаторне молекуле превасходно продукују моноцити и полиморфонуклеарне ћелије које мигрирају у инфламаторни фокус, али не и присутни макрофаги. Цревни макрофаги имају ограничен капацитет да одговоре на бактеријске молекулске обрасце захваљујући регулацији њихових рецептора бактеријског препознавања, као што су TLR (енгл. Toll-like receptors) и CD14 (енгл. Cluster of differentiation), колиганд за липополисахарид. Слично томе, цревне епителне ћелије обично имају низак ниво експресије TLR. TLR молекули су изражени на површини различитих ефекторских ћелија урођеног имунског одговора. Као CARD15 (енгл. Caspase recruitment domain containing protein), ови рецептори селективно се везују за специфични адјуванс микроба и иницирају сигнализацију преко NFκB (енгл. Nuclear factor kappa light chain enhancer of activated B cells) (слика 3) (21). Иако сваки тип TLR везује специфични бактеријски адјуванс (TLR4 и CD14 везују липополисахарид, а TLR2 везује пептидогликан), сви ови сигнали конвергирају по истом путу преко мијелоидног диференцираног протеина примарног одговора MyD88 (енгл. Myeloid differentiation primary response gene 88) који активира NFκB (21). Активација NFκB стимулише експресију бројних молекула релевантних за патогенезу инфламације. Ово укључује молекуле који су укључени у инфламаторни одговор, као што су IL-1β, TNF, IL-6, IL-8 и остали хемокини, ICAM1 и други адхезиони молекули и костимулативни молекули, укључујући CD40, CD80, CD86 и индукцибилни Т-ћелијски костимулатор ICOS (енгл. Inducible T-cell costimulator) (21). Експресија сваког од ових проинфламаторних молекула је повећана у активним формама инфламацијских болести црева. Насупрот томе, цитокини који индукују Th1 и Th17 одговоре су селективно усходно регулисани код активне Кроне болести, али не код улцерозног колитиса. Штавише, блокада TNF-α неутрализацијом моноклонским антителима побољшава клиничку слику активне Кроне болести и улцерозног колитиса (21). Селективна инхибиција већине ових цитокина слаби појаву експерименталног колитиса. Као додатак индукцији експресије инфламаторних гена, NFκB истовремено стимулише експресију различитих заштитних молекула, као што су TNF-индукованог протеина 3 (раније A20), CARD15, циклооксигеназа 2, β дефензина, PPARγ (енгл. Peroxisome proliferator activated receptors) и сопствени инхибитор, IκBα (енгл. Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha), да инхибирају инфламаторне одговоре. NFκB се активира у ткивима болесника са инфламацијским болестима црева и његова инхибиција може ублажити експериментални колитис, сходно томе, NFκB пут се сматра да има претежно проинфламаторну активност. Студије селективне делеције гена су, међутим, показале да NFκB има позитивне и негативне ефекте на инфламацију, са различитим функцијама

у различитим типовима ћелија. На пример, NFκB је од суштинског значаја за епителијалну хомеостазу, али је такође интегрално укључен у патогенезу интестиналне инфламације. Слично томе, код мишева, делеција Msd88 гена погоршава колитис изазван декстраном натријум сулфата, вероватно блокирањем епителне NFκB активације од стране коменсалних цревних бактерија. За разлику од урођеног имунског одговора, који се на сличан начин активира у свим облицима инфламацијских болести црева, профили Т лимфоцита су различити у Кроновој болести и улцерозном колитису (слика 3) (21, 23).



Слика 3. Шематски приказ NOD2/CARD15 сигналног пута код инфламацијских болести црева (преузето из: Xavier RJ and Podolsky DK. Nature 2007; 448: 427-434)

1.3. УЛЦЕРОЗНИ КОЛИТИС

Улцерозни колитис је инфламацијска болест дебелог црева која се карактерише запаљењем слузнице и у мањој мери субмукозе. Нису захваћени дубљи мишићни слојеви и сероза. У питању је континуирана лезија која почиње у ректуму и шири се проксимално (14). Већина болесника (60-75%) има интермитентан ток болести са повременим раздобљима активности болести различитог степена тежине и са периодима ремисије (18). Хронично континуиран ток болести има 10-15% болесника.

Активност, екстензивност болести и лабораторијске анализе

Клиничка слика варира од болесника до болесника, па и код истог болесника у различитим раздобљима болести. Болест се дефинише као блага, умерено-тешка и тешка, на бази индекса активности болести према Truelovsu и Wittsu из 1955. године (28).

Дефиниција клиничке активности улцерозног колитиса је прилагођена водичима добре клиничке праксе Америчке школе за гастроентерологију (енгл. American College of Gastroenterology, ACG) (29). Болесници са благом активношћу болести (≤ 3 столице дневно, са незнатним крварењем и минималном анемијом, нормалном телесном температуром и нормалним пулсом, седиментацијом < 30 mm/сат и без системских манифестација); болесници са умерено тешком активношћу болести (4-6 столице дневно, са знатнијим крварењем и анемијом, повишеном телесном температуром, тахикардични, седиментацијом еритроцита > 30 mm/сат, са екстраинтестиналним манифестацијама); болесници са тешком формом болести (≥ 7 течних столица дневно са ректалним крварењем, са знацима токсичности и системским манифестацијама: високом температуром, губитком телесне тежине $\geq 10\%$, дехидрирани, са ортостатском хипотензијом, тежом анемијом и вредностима хемоглобина ≤ 10 g/dL, хипоалбуминемичном и потребом за хоспитализацијом) (29). Блага болест се јавља у 60% болесника, умерено-тешка у 25% болесника, а тешка форма болести је присутна код 15% болесника. Недостаци овакве класификације тежине болести су релативно ниска сензитивност и само три нивоа тежине болести. Powell и Tuck су 1978. године предложили индекс активности болести, који је већу важност придавао квантитативној процени тежине болести, укључујући ендоскопске промене и екстраинтестиналне манифестације болести (30).

Екстензивност улцерозног колитиса се дефинише према захваћености оболелог сегмента дебелог црева. Локализована болест у пределу ректума се дефинише као улцерозни проктитис, захваћеност ректума и сигме, проктосигмоидитис, левог колона, левострани колитис и захваћеност целог дебелог црева, панколитис (31). Код панколитиса се некада може запазити запаљенски измењена слузница краћег сегментна терминалног илеума (енгл. Backwash ileitis), где данас постоје мишљења да код таквих болесника треба размишљати о варијанти Кронове болести.

Екстензивност болести кључни је фактор који дефинише тежину и ток болести. Болесници са субтоталним колитисом или панколитисом, чешће имају тешке форме болести и чешће захтевају хируршку терапију (готово трећина са панколитисом, у односу на 8% оних који имају ограничену болест) током прве године (18). Након прве године болести, ток болести постаје сличан код свих болесника без обзира на екстензивност болести, са потребом за проктоколектомијом код 1% болесника годишње (18). Болесници са проктитисом углавном имају бенигни ток болести, али често болест

прогредира проксимално (20% унутар 10 година, 30% унутар 20 година) (18). У лабораторијским анализама, карактеристични налази акутног напада су хипокалијемија, хипоалбуминемија, пораст акутних реактаната запаљења попут седиментације еритроцита, фибриногена, CRP, α -1 антитрипсина, α -1 киселог гликопротеина, хаптоглобина, церулоплазмина и серумског амилоида А (18). Благо повишење аспартат трансминаза и алкалне фосфатазе током акутне фазе болести, су последица масне јетре и деловања токсемије, сепсе и лоше нутриције на јетру (18).

Ендоскопски прегледи и хистолошки налаз

Ендоскопски прегледи су најважнији дијагностички поступци за постављање дијагнозе и процену проширености болести (проктосигмоидоскопија и колоноскопија). Слuzница колона је нормално влажна и сјајна, са јасним васкуларним цртежом. Најраније промене су хиперемија и едем слuzнице, који уз инфилтрацију слuzнице запаљенским ћелијама индукују губитак субмукозног васкуларног цртежа (18). Интензивирањем упале слuzница постаје неравна (гранулирана) и вулнерабилна и контактено крвари. Даље запаљенске промене подразумевају настанак улцерација, псеудополипа и стриктура (18). Слuzница између улкуса је увек запаљенски измењена. Карактеристична је оштра граница између запаљенски измењене и нормалне слuzнице. У фази ремисије слuzница је равна и бледа. Псеудополипи су одраз процеса зацељења ранијих запаљенских промена са хипетрофијом преосталих делова слuzнице. Стриктуре чине или подручја задебљања мишићног слоја црева (тада су реверзибилне) или карцином настао на терену улцерозног колитиса (18). Степен ендоскопских промена слuzнице колона је класификован по модификованом Вагон-овом скору: нормална слuzница; губитак субмукозног васкуларног цртежа; гранулирана и невулнерабилна слuzница; контактена вулнерабилност; спонтано крварење и улцерације (32).

Запаљенске промене слuzнице колона се верификују биопсијом слuzнице колона за патохистолошку анализу. Степеновање хистолошких промена слuzнице је следеће: 1. нема значајнијег запаљења (архитектонске промене хроничне болести, жаришта лимфоцита, без криптних апсеса и без епителне деструкције); 2. благо до умерено запаљење (едем, повећана васкуларност, повећан број акутних и хроничних запаљенских ћелија, епител интактан); 3. тешко запаљење (инфилтрати акутних и хроничних запаљенских ћелија, криптни апсеси, улцерације површинског епитела и пурулентни ексудат) (33).

1.4. КРОНОВА БОЛЕСТ

Кронова болест је инфламацијска болест црева коју карактерише трансмуралност и дисконтинуираност запаљења (skip lesions), где се запаљенски измењени сегменти смеђују са нормалним сегментима (14). Може да захвати било који део гастроинтестиналног тракта, почев од уста до ануса. Према Бечкој класификацији запаљенски процес се развија у три основна клиничка фенотипа и то: (1) нестриктурирајући непенетрирајући облик, (2) стриктурирајући облик (фибростенотично-опструктивни тип), (3) пенетрирајући фистулизирајући облик болести. Опструкција је једна од основних карактеристика природног тока Кронове болести. У раним фазама болести едем и спазам цревног зида доводе до интермитентне опструкције, обично постпрандијално. У каснијим фазама болести, хронична упала доводи до фибростенотичног сужења и стриктура. Фистулизација је последица

трансмуралности запаљења када се формирају синусни трактови који се завршавају слепо или формирањем интраабдоминалних апсцеса (34).

Активност, екстензивност болести и лабораторијске анализе

Постоје различити клинички индекси за процену активности болести. Неки индекси узимају у обзир углавном клиничке симптоме и клиничке знакове. Тој групи припадају de Dombalov индекс (35), CDAI (Crohn,s Disease Activity Index) (36), педијатријски CDAI (37) и Harvey-Bradshawov индекс (38). Индекс van Hees (39) базиран је искључиво на објективним клиничким и лабораторијским подацима. Неки индекси комбинују физикални налаз и лабораторијске параметре. То су Oxford индекс (40) и Cape Town индекс (41). Неки индекси имају предиктивну вредност (42). Већина клиничара за процену активности болести користи појединачне лабораторијске параметре. Најчешће су примењивани маркери запаљенске активности: седиментација еритроцита, број тромбоцита, CRP, фибриноген, α -1- кисели гликопротеин, фекални α -1-антитрипсин. Болест се најчешће појављује у терминалном илеуму и у десном колону. Анатомска дистрибуција болести је врло варијабилна. Изоловану болест танког црева има 30-40% болесника, болест истовремено захвата и танко и дебело црево у 40-55% болесника, од изолованог колитиса оболева 15-25% болесника, а од перианалне болести 30% болесника (18). Ректум је захваћен само код 50% болесника, било изоловано, било у континуитету са сигмом.

Лабораторијске анализе су неспецифичне и резултат су запаљења и малапсорпције. Верификује се анемија, леукоцитоза, убрзана седиментација еритроцита, хипоалбуминемија, хипокалијемија, хипомагнезијемија, хипокалцијемија (18).

Ендоскопски преглед и хистолошки налаз

Ендоскопски прегледи су најважнији дијагностички поступци за постављање дијагнозе и процену проширености болести (колоноскопија са терминалном илеоскопијом, езофагогастроуденоскопија и ентероскопија). Приликом ендоскопских прегледа узимају се биопсије са запаљенско измењених цревних сегмената. Хистолошки најранија лезија је криптно запаљење, након чега се формирају криптни апсцеси од накупљених полиморфонуклеарних леукоцита (18). Лезије су фокалног карактера. Затим се појављује повећање лимфоидних фоликула, окружених прстеном еритема, на слузници настаје афтоидна улцерација која током болести прогредира у дубоке, најчешће лонгитудиналне улцерације (29). Оток запаљеног ткива уз дубоке фисуре и улцерације, даје слузници калдрмаст изглед (18). Накупљају се макрофаги и друге запаљенске ћелије и формирају се грануломи без казеозне некрозе који садрже епителоидне и мултинуклеарне циновске ћелије (18). Грануломи могу бити у свим слојевима цревног зида, од слузнице до серозе, а макроскопски се могу видети као милијарни чворићи (33). Поред цревног зида грануломи могу постојати и у лимфним чворовима, мезентеријуму, перитонеуму и јетри. Грануломи су присутни код 50-60% болесника (33).

1.5. Компликације инфламацијских болести црева

1.5.1. Интестиналне компликације улцерозног колитиса

У интестиналне компликације улцерозног колитиса спадају: перианална болест, псеудополипи, стриктуре колона, токсични мегаколон и перфорација колона (18). **Перианална болест**, хемороиди, аналне фисуре, перианални и иксиоректални апсцеси, пролапс ректума су чешћа појава код панколитиса и одраз су учесталих столица код тог облика болести (18).

Псеудополипи (инфламаторни полипи), су резултат хиперпластичне регенерације денудираних слузница. Није реч ни о епителним, ни гландуларним формацијама, тако да се не сврставају у полипе и премалигне лезије (36).

Стриктуре колона, се појављују у 6-10% болесника. Имају предилекцију за ректум и трансверзални колон и могу бити мултипле (36).

Токсични мегаколон, се дефинише као фулминантни колитис са акутном дилатацијом колона на више од 6-7 cm у промеру уз поремећену или одсутну хаустрацију колона, а узрокован је прогресијом запаљења кроз мишићне слојеве цревног зида до серозе уз парализу мускулатуре колона (18).

Перфорација колона, настаје најчешће као последица токсичног мегаколона. Највећи ризик од перфорације је при првом нападу тешког колитиса, због не сасвим јасних разлога (18).

1.5.2. Интестиналне компликације Кронове болести

Прогресивна фиброза доводи до цревних стеноза, настају фистуле између цревних вијуга, као и између црева и суседних органа, често са апсцесима. Ризик од настанка колоректалног карцинома код болесника са Кроновом болешћу је слична као код улцерозног колитиса.

Карцином колона - Америчка гастроентеролошка организација (енгл. American Gastroenterologic Association, AGA) (43) и Америчка школа за гастроентерологију (енгл. American College of Gastroenterology, ACG) (44) и Америчко удружење ендоскописта (енгл. American Society for Gastrointestinal Endoscopy, ASGE) (45) потврђују да болесници са инфламацијским болестима црева имају повећан ризик настанка колоректалног карцинома. Карцином колона може бити солитаран или мултифокалан (18). Постоји као мукозни инфилтративни плак, а ређе као полипоидна промена или стриктура (18). Хистолошки је врло често анапластичан са тенденцијом раног метастазирања (18). Пре појаве колоректалног карцинома се појављују местимично дисплазије које се верификују ендоскопском биопсијом, али 25% болесника са колоректалним карциномом нема епителних дисплазија у колону. Колоректални карцином у већини случајева настаје на терену дисплазија (46). Препоруке за колоноскопско праћење болесника, зависе од дужине трајања болести и екстензивности болести. Колоноскопски скрининг треба почети осме године након постављања дијагнозе код болесника са панколитисом и после 15 година код болесника са левостраним колитисом. Детекција дисплазија се ради код болесника који болују од панколитиса дуже од 8 година, периодичним колоноскопијама уз узимање биопсија из свих регија колона (46). Правило је да биопсије треба узимати сваких 10 cm дуж колона,

тако да по правилу треба узети више од 30 биопсија по колоноскопији, где је пракса да се у једну бочицу не ставља више од четири биопсије (18). Биопсије треба узимати у незапаљеним деловима слузнице колона, што значи да колоноскопију са циљем детекције дисплазија треба радити у фази ремисије болести (46). Колоноскопске биопсије слузнице болесника са инфламацијским болестима црева „у погледу дисплазије” се карактеришу као негативне, неодређене или позитивне за дисплазију. Дисплазија се даље класификује као дисплазија ниског степена (енгл. Low-grade dysplasia, LGD) или висок степен дисплазије (енгл. High-grade dysplasia, HGD). Учесталост колоректалног карцинома код дисплазија ниског степена је >20% (47, 48, 49-53). Насупрот томе, висок степен дисплазије носи већу вероватноћу (~60 %) прогресије у колоректални карцином (49,54). Налаз дисплазија високог степена (HGD) индикација је у већем броју центара за профилактичну проктоколектомију (49). Дисплазије ниског степена (LGD) су налаз који захтева понављање колоноскопија са биопсијама за неколико недеља, ако се потврди налаз дисплазије, потребно је размотрити могућност за проктоколектомију, а ако се не нађу дисплазије, колоноскопију треба поновити за 6 месеци (50). Значајна је и метода проточне цитометрије за детекцију DNA анеуплоидије, јер постоји добра корелација између те промене и дисплазије (55). Контролне колоноскопије, ако се не нађу дисплазије, треба радити унутар једне до три године, а идеално би било једном годишње. Дисплазије у контексту DALM лезије (енгл. Dysplasia associated lesion mass) упућују на присуство карцинома на том месту (55). Болесници са дугогодишњом инфламацијском болешћу црева имају повећан ризик од развоја колоректалног карцинома. Ризик од развоја прекарциномских лезија као што је дисплазија или од развоја инвазивног карцинома експоненцијално расте са дужином трајања болести (56). Ризик од настанка колоректалног карцинома почиње да расте 8 или 10 година након успостављања дијагнозе инфламацијских болести црева (57-62). У зависности од студије и земље, ризик од развоја колоректалног карцинома код пацијената са улцерозним колитисом креће се између 0,9-8,8 пута, а између 0,8-23 пута код болесника са панколитисом (57). Вероватноћа развијања колоректалног карцинома, 10 година од постављања дијагнозе је 2%, достигавши ниво од 8% након 20 година и 18% после 30 година (54). У неким земљама није утврђен повећан ризик од развоја колоректалног карцинома на терену инфламацијских болести црева (59, 60). Студија спроведена на Данској популацији је показала да је кумулативна вероватноћа колоректалног карцинома била 0,4%, након 10 година, 1,1%, након 20 година, а 3,1% након 30 година од постављања дијагнозе улцерозног колитиса (59). Ниска стопа развоја колоректалног карцинома може бити у вези са високим стопама проктоколектомија (24% након 10 година и 32,4% након 25 година трајања болести) (59).

1.5.3. ЕКСТРАИНТЕСТИНАЛНЕ МАНИФЕСТАЦИЈЕ ИНФЛАМАЦИЈСКИХ БОЛЕСТИ ЦРЕВА

У екстраинтестиналне манифестације инфламацијских болести црева спадају: масна метаморфоза јетре, примарни склерозирајући холангитис, холелитијаза, коштанозглобне промене, хематопоезне промене, афтозни стоматитис, промене на уропоетском систему, очне промене и кожне промене.

Масна метаморфоза јетре, настаје као резултат малнутриције и хроничног запаљења. Код 50-90% болесника са инфламацијским болестима црева, налазе се абнормалности у биоптичком материјалу, а сигнификантна болест јетре се дијагностикује код 1-3% болесника. Хронични активни хепатитис и постнекротична цироза јетре су ређе компликације (61-71).

Примарни склерозирајући холангитис, у 50% случајева је удружен с инфламацијским болестима црева и то најчешће са улцерозним колитисом. Као последица хроничног запаљења интрахепатичких и екстрахепатичких жучних путева долази до мултифокалне опструкције билијарног тракта, што доводи до опструктивног иктеруса, холангитиса и секундарне билијарне цирозе. Обзиром на висок проценат удружености примарног склерозирајућег холангитиса и улцерозног колитиса, препорука је све болеснике са примарним склерозирајућим холангитисом обрадити у смислу инфламацијских болести црева и без присуства цревних симптома (71).

Холелитијаза, настаје као последица поремећаја метаболизма жучних киселина и стварања литогене жучи код болесника са запаљењем танкога црева или код болесника са ресекцијом терминалног илеума (71).

Коштанозглобне промене: Болесници са активном болешћу углавном имају артралгије. Миграторни периферни серонегативни недеструктивни артритис се јавља код 10-15% болесника и корелира са активношћу основне болести (18). Сакроилеитис се дијагностикује код 12-15% болесника и већина болесника су негативни на HLA-B27. Анкилозирајући спондилитис се јавља код 1-2% болесника и 20 пута је чешћи код болесника са инфламацијским болестима. Болест се често јавља пре појаве цревних симптома и активност ове болести не корелира са активношћу цревне болести, а може перзистирати и након колектомије. Батичасти прсти се најчешће дијагностикују код болесника са екстензивном болешћу танког црева. Карлични остеомијелитис настаје као последица ширења фистула танког црева у карлицу и у кук. Остеомалација је ређа компликација инфламацијских болести црева и настаје као последица поремећаја минерализације костију услед малапсорпције. Остеопороза је присутна код 15% болесника са улцерозним колитисом и код 40% болесника са Кроновом болешћу. Код болесника са инфламацијским болестима црева додатни фактори ризика за настанак остеопорозе су кортикостероидна терапија и активно хронично запаљење, будући да инфламаторни цитокини инхибирају формирање коштаног ткива (IL-6 стимулише остеокласте) (67-70).

Хематопоезне компликације: Хемолитичка анемија је најчешће последица употребе сулфасалазина. Описана је и идиопатска Coombs позитивна аутоимуна хемолитичка анемија. Мегалобластна анемија се јавља у случају развоја цирозе. Леукоцитоза је честа, а може бити последица примене кортикостероидне терапије. Код тежих болести може се дијагностиковати хипопротромбинемија, најчешће код удружене болести јетре, ниског уноса протеина и витамина К, пролонгиране антибиотске терапије (63-66). Чест налаз су тромбоцитоза уз повишење фактора V и VII, фибриногена и снижење циркулишућег антитромбина III, што доводи до настанка тромбоза дубоких вена (71).

Афтозни стоматитис, се појављује код 80% болесника са инфламацијским болестима црева (71).

Уропоетски тракт: Две најчешће компликације су пијелонефритис и уролитијаза. Малапсорпција, односно стеатореја код Кронове болести повећавају цревну апсорпцију оксалата, што доводи до настанка оксалатних каменаца код 5-10% болесника са Кроновом болешћу танког црева (71).

Очне болести: Код 5-10% болесника се јављају у форми иритиса (увеитиса). Патогенеза ових болести није јасна, али њихова честа удруженост са периферним артритисом, нодозним еритемом и афтозним улцерацијама упућује на системски имунски феномен (61, 62).

Кожне промене: Код 2-4% болесника са акутном болешћу долази до појаве erythema nodosum, која корелира са активношћу цревне болести и рецидивантно се појављује код 20% болесника. Pyoderma gangrenosum се јавља код 2-5% болесника са улцерозним колитисом и представља гнојне улцерирајуће кожне лезије, најчешће код болесника са панколитисом, са предилекцијом на месту раније трауме. Корелира са активношћу цревне болести (61).

1.6. КОЛОРЕКТАЛНИ КАРЦИНОМ

Колоректални карцином (карцином колона и/или ректума) представља озбиљан светски здравствени проблем.

1.6.1. Епидемиологија колоректалног карцинома

Годишње у свету од колоректалног карцинома оболи око 1,2 милиона, а умире око 600 хиљада људи, што га по учесталости чини четвртим узроком смрти услед карцинома (171). По учесталости, колоректални карцином се налази на трећем месту у свету у мушкараца и на другом у жена (171). Скоро 60% свих случајева оболелих се јавља у развијеним земљама (172). Највећа инциденца је процењена у Аустралији са Новим Зеландом и западној Европи, а најнижа у Африци (изузев јужне Африке) и јужној и централној Азији (72, 73). Што се тиче стопе морталитета, она је нижа у жена него у мушкараца, осим за подручје Кариба. Највеће стандардизоване стопе морталитета за оба пола процењене су у централној и источној Европи (20,1/100000 за мушкарце, 12,2/100000 за жене), а најниже у централној Африци (3,5 и 2,7 респективно).

Последњих година дошло је до значајног пораста његове инциденце и сада она износи 19,9/100000 мушкараца и 11,2/100000 жена, док стопа морталитета износи 9,4/100000 и 5,9/100000 респективно (74). На основу података Републичког завода за статистику у периоду од 1997-2010. године, запажен је пораст морталитета услед малигнух тумора колона и ректума за 16,0% (Републички завод за статистику, 2010. године). Колоректални карцином представља други најчешћи узрок смрти услед карцинома у Србији, одмах после рака плућа код мушкараца и рака дојке код жена (75).

1.6.2. Класификација колоректалног карцинома

Малигнуом трансформацијом епителних ћелија колона и/или ректума настаје колоректални карцином (енг. Colorectal cancer, CRC). Овај тип карцинома се може односити само на карциноме колона или на карциноме ректума, у зависности у ком од ових ткива настане (колон и ректум заједно чине дебело црево). Обзиром да ова два

типа карцинома имају много заједничких карактеристика, најчешће се описују као један ентитет. Код већине људи CRC се развија споро током периода од 5 до 15 година (76). Најпре настају бенигни, неканцерогени полипи, од којих неки могу прећи касније у малигне туморе. Вероватноћа преласка полипа у карцином зависи од његовог типа: (1) аденоматозни (аденом)-полип који прелази у карцином, често се зове и „преканцерозно стање“ и (2) хиперпластични и инфламаторни-полип који генерално не претходи карциному (76). Још један тип „преканцерозног стања“ је и дисплазија, део зида колоне или ректума у којем гледано под микроскопом ћелије изгледају абнормално (али немају изглед правих карциномских ћелија). Дисплазија се чешће јавља код људи који су имали улцерозни колитис или Кронову болест (77).

Након стадијума полипа, карциномске ћелије почињу да се шире у слојеве зида колоне и/или ректума и формирају малигни тумор. Даљим ширењем преко крвних и лимфних судова до удаљених органа формирају се метастазе. Постоји неколико типова карцинома који могу да настану и то: (1) аденокарциноми, више од 95% CRC-а су овог типа; формирају се неопластичном трансформацијом жлезданих ћелија које луче мукус у лумен дебелог црева (78), (2) карциноидни тумори, настају од специјализованих ћелија црева које луче хормоне, (3) гастроинтестинални стромални тумори (енгл. Gastrointestinal stromal tumour, GIST) настају у Сајал-овим ћелијама колоне и могу се наћи било где у дигестивном тракту, (4) лимфоми, карциноми ћелија имунског система који атипично могу да настану и у дебелом цреву, као и у другим органима, (5) саркоми, ретки тумори који настају у крвним судовима, мишићном и везивном ткиву дебелог црева (77).

Открићем анатомског тока ширења колоректалног карцинома, настало је низ класификација. Dukes 1929. године према макроскопском изгледу при операцији разврстава карцином ректума у три стадијума. Касније је направљен низ модификација постојеће класификације, најпознатија је Astler-Collerova у три подврсте, зависно од хистолошке слике, дубине продора тумора и захваћености лимфних чворова (18). Да би се направила класификација, применљива за већину карцинома, а на тај начин омогућила и адекватно тријажирање болесника за терапијске поступке, уведена је TNM класификација, која укључује податке о проширености примарног тумора (T), о регионалним лимфним чворовима (N), о присутности удаљених метстаза (M) (18).

Израелска класификација из 1999. године укључује уз хистолошки податак о дубини продора примарног тумора и стања регионалних лимфних чворова и нови податак: хистолошку поделу инвазије вена малигним ћелијама, чиме је направљен скор за нову класификацију (18).

T-категоризација

Tx: Примарни тумор не може бити одређен.

T0: Нема присуства примарног тумора.

Tis: Карцином ин ситу. Интраепителни или инвазија слоја laminae propriae.

T1: Тумор се шири у субмукозу.

T2: Тумор се шири у слој muscularis propria.

T3: Тумор се шири кроз слој muscularis propria у периколоректално ткиво.

T4a: Тумор пробија серозу (висцерални перитонеум).

T4b: Тумор директно врши инвазију или је адхериран на друге органе или структуре.

N-категоризација

Nx: Регионални лимфни чворови не могу бити одређени.

N0: Нема тумора у регионалним лимфним чворовима.

N1: Метастазе у 1-3 регионална лимфна чвора.

N1a: Туморске ћелије нађене у 1-ом регионалном лимфном чвору.

N1b: Туморске ћелије нађене у 2-3 регионална лимфна чвора.

N1c: Туморски депозити у субсерози, мезентеријуму, или у перитонеалном периколону или периректалном ткиву без метастаза у регионалним чворовима.

N2: Туморске ћелије нађене у ≥ 4 регионална лимфна чвора.

N2a: Туморске ћелије нађене у 4-6 регионалних лимфних чворова.

N2b: Туморске ћелије нађене у ≥ 7 регионалних лимфних чворова.

M-категоризација

M0: Нема удаљених метастаза.

M1: Постоје удаљене метастазе.

M1a: Метастазе ограничене на 1 орган или место (нпр. јетра, плућа, нерегионални чвор).

M1b: Метастазе у >1 органу/месту или у перитонеуму.

Стадијуми се означавају Римским бројевима од I (најмање унапредовали) до IV (највише унапредовали) (79).

Приликом дијагностиковања, колоректални карциноми се деле на хистолошке типове, градусе тумора и TNM стадијуме. Градус тумора је препознат као важан прогностички параметар код колоректалног карцинома. Градуси означавају степен диференцираности тумора, тј. показују колико је тумор сличан нормалном ткиву колоректума гледано под микроскопом. Скала која се користи иде од G1 (добро диферентован, карцином личи на нормално ткиво) до G4 (слабо диферентован, карцином има абнормалан изглед) (80). Често се градуси поједностављују у две групе: низак градус, „low-grade” (G1 или G2) и висок градус, „high-grade” (G3 или G4) (81, 82).

1.6.3. Онкогенеза колоректалног карцинома

Малигна трансформација настаје као последица структурне и/или функционалне промене у генима важним за функцију ћелије. За потпуну ћелијску трансформацију потребно је више генетских дефеката типа мутације, делеције, амплификације или поремећаја експресије, од којих зависи клиничка слика и исход болести (18, 83). Сматра се да је за малигну трансформацију неопходна појава 5-6 специфичних промена у геному соматске ћелије, али новији подаци указују да можда и само две генске лезије могу бити довољне (83). Fearon и Vogelstein (84) су 1990 године направили алгоритам генетских догађаја у карциногенези колоректалног карцинома (хипер активација онкогена и инактивација тумор-супресорских гена; потребно је неколико мутација за настанак карцинома; укупно накупљање генетских промена је битније од редоследа мутација). Онкогени су еволутивно високо конзервирани гени битни за опстанак ћелије и кодирају протеине укључене у сигналне путеве који стимулишу ћелијску пролиферацију. Тумор-супресорски ген или антионкоген може да се дефинише и као сваки ген, који губитком своје функције доприноси развоју тумора (18). Активација

протоонкогена и инактивација тумор-супресорских гена су кључни догађаји у развоју малигног фенотипа. Клонском експанзијом трансформисане ћелије развија се карцином, који временом стиче нове генетичке промене, способност ангиогенезе и метастатски потенцијал. Поред индивидуалне генетичке позадине (енг. Background), на развој карцинома утичу и фактори средине.

Michael и Varmus су 1989. године добили Нобелову награду за допринос у истраживању протоонкогена и њихове способности да се претворе у онкогене који узрокују настанак карцинома. Протоонкогени који подстичу ћелијски раст и антионкогени или тумор-супресорски гени, две су врсте нормалних, регулаторних гена. Мутирани су алели протоонкогена доминантни јер претварају ћелије у малигне и поред постојања њиховог нормалног пара. Са друге стране оба нормална алела тумор-супресорског гена морају бити измењена да би настала малигна трансформација (18).

Генски поремећаји у колоректалном карциному се могу сврстати у три групе: алтерација у протоонкогенима, губитак тумор-супресорских генских активности и анормална репарација погрешно спарених парова база у току репликације DNA (18). **Тумор-супресорски гени** који спречавају раст тумора често су код колоректалног карцинома инактивирани мутацијом или делецијом алела (18). Тумор супресорски гени кључни за колоректалну карциногенезу су: p53, p16, DCC и APC.

Ген 53, класични тумор-супресорски ген се налази на кратком краку хромозома 17 (17p). У нормалној ћелији надзире репликацију DNA. Описује се као „чувар генома” који препознаје оштећење DNA, зауставља ћелијски циклус, дајући ћелији довољно времена да поправи оштећење, а ако је оштећење превелико за поправку, индукује апоптозу, процес „програмиране ћелијске смрти”. Губитак функције гена p53 индукује даље дељење ћелије са генетским оштећењем. Већином се ради о тачкастим мутацијама које изазивају замену аминокиселина приликом биосинтезе p53. Последица је настанак протеина са продуженим полувеком, који се накупља у једрима оштећених ћелија, где се може доказати имунохистохемијски. Мутација једног алела у туморским ћелијама често је праћена потпуном делецијом другог алела, на позицији гена p53. У колоректалном карциному је нађена делеција p53 у више од 75% оболелих (18, 85, 86). У аденомима дебелог црева дефекти гена p53 су врло ретки, чак и у великим аденомима са жариштима карциномски измењених ћелија, што указује на чињеницу да оштећење гена p53 настаје у каснијој фази карциногенезе (86). Делеција гена p53 је повезана са прогресијом тумора од аденома према карциному и корелира са стадијумом туморске болести по Dukesu и преживљавањем болесника (85, 86).

Тумор супресорски ген p16^{ink4a} је инхибитор циклин зависних киназа 4 и 6 и досадашња истраживања су показала да постоји значајна корелација између смањене експресије p16^{ink4a} и туморске прогресије (87). Представља мултипли тумор-супресорски ген који инхибише фосфорилацију ретинобластом протеина и узрокује застој ћелијског циклуса у G1 фази (87). Мутирани p16^{ink4a} је инактивиран због чега ћелије неконтролисано расту и малигно се трансформишу (88, 89). Оштећење тумор-супресорског гена p16^{ink4a} присутно је код различитих хуманих малигнома, укључујући разне типове гастроинтестиналног карцинома, карцинома мокраћне бешике и плућа и малигног меланома (89). Најчешћи механизам његове инактивације је тачкаста мутација и делеција, али се спомиње и метилација промотера (90). Поред улоге у карциногенези, као инхибитор прогресије ћелијског циклуса, p16^{ink4a} игра важну улогу у модулацији имунског одговора (90).

Ген DCC (енгл. Deleted in colon cancer) припада тумор-супресорским генима. Његов протеински продукт показује сличност са адхезијским молекулима и учествује у

интеракцији између ћелија, као и између ћелије и спољашњег ванћелијског матрикса (18). Његова је експресија смањена или изостаје у ткиву колоректалног карцинома, а цитогенетска испитивања су показала да се код 70% карцинома и код 50% већих аденома може наћи делеција дугог крака 18. хромозома на 21. позицији (18q21) (18). Услед делеције DCC настаје малигна трансформација аденома и прогресија у инвазивни карцином (18). Пронађен је још један тумор-супресорски ген DPC4/Smad4 (енгл. Deleted in pancreatic cancer) који се такође налази на 18q21 и има улогу у малигној трансформацији аденома колоректума (18).

Ген APC (енгл. Adenomatous polyposis coli, аденоматозна полипоза дебелог црева) грађен је од 15 аксона и налази се на дугом краку хромозома 5 и у литератури се означава као „gatkeeper” у процесу колоректалне карциногенезе (18). Већину установљених мутација чине делеције и инсерције кратких делова нуклеотида, што више говори за грешке у репликацији него о деловању мутагена. Соматске мутације гена нађене су у више од 80% спорадичних карцинома и аденома дебелог црева, те су најранији и најчешћи генетски поремећај у развоју колоректалног карцинома (18). Најчешћа алтерација онкогена код колоректалног карцинома је мутација онкогена

K-ras (18). Гени *ras* фамилије (K-ras, H-ras, N-ras) кодирају цитоплазматске протеине који играју важну улогу у преносу ћелијских сигнала (18). Мутације ових гена, а најчешће K-ras, откривене су у око 50% колоректалног карцинома и у аденомима већег промера од 1 cm (18). У аденомима мањег промера од 1 cm, мутације гена K-ras су нађене у мање од 10% оболелих, а доводе се у везу са повећаним ризиком од развоја карцинома локализованих на више места у организму (18).

Гени hMSH2 и hMLH1 и њима сродни гени **hPMS1** и **hPMS2** играју улогу у поправци погрешно спарених (енгл. Mismatch) парова база у току репликације DNA. Њихове алтерације изазивају грешку у том процесу и повећавају инциденцу мутација, а битну улогу имају и у настанку наследног неполипозног карцинома дебелог црева (енгл. Hereditary non-polyposis colorectal cancer, HNPCC), иако се у мањем проценту налазе и у спорадичном колоректалном карциному (18).

Геномска нестабилност представља важан догађај у колоректалној прогресији. Доступношћу технике секвенцирања хуманог генома и развитком *omics* технологија омогућено је анализирање читавог генома карцинома, а самим тим и утврђивање спектра соматских мутација које доприносе патогенези CRC-а. Оваквим приступима откривен је еволуциони диверзитет карцинома и имплицирано је постојање већег репертоара карциномских гена него што је то раније претпостављано (91). На основу студије у којој је секвенцирано више хиљада гена у серијама CRC-а, показано је да је 69 гена значајно за патогенезу овог карцинома, док су индивидуални тумори имали у просеку по 9 мутираних гена (92). Штавише, сваки испитивани тумор је имао различит мутациони генски профил (92, 93). Међутим, само мали број соматских мутација које су присутне у сваком тумору заправо индукује и „води” процес карциногенезе (енгл. Drivers). Ове *driver* мутације су позитивно селектоване током онкогенезе јер дају предност туморској ћелији, нпр. промовисањем ћелијског раста или избегавањем апоптозе (94). Обзиром да постоји велики број гена са ниском стопом мутација, тешко је разликовати које од тих мутација су *driver*, а које се јављају накнадно (енгл. Passengers) и не утичу на прогресију тумора (95). Постоје и бројни докази који указују да *driver* мутације често чине карциномске ћелије физиолошки зависним од конститутивне активације онкогена, одговорних за одржавање њиховог малигног фенотипа (нпр. мутације PIK3CA у колоректалним ћелијским линијама). Овај феномен је познат као „онкогена зависност“ (енгл. Oncogene addiction) (96-98).

1.6.4. Онкогенеза колоректалног карцинома насталог на терену инфламацијских болести црева

Попут других врста карцинома, настанак колоректалног карцинома на терену инфламацијских болести црева је мултистепенни процес који укључује запаљење, регенерацију епитела до формирања хиперпластичног епитела, појаву дисплазија и на крају настанак инвазивног карцинома (56).

Молекуларне промене код IBD повезане колоректалне карциногенезе као и код спорадичног колоректалног карцинома укључују акумулацију генетских поремећаја који се могу сврстати у три групе: алтерација у протоонкогенима, губитак тумор-супресорских генских активности и анбормална репарација погрешно спарених парова база у току репликације DNA (18). Иако постоје сличности у молекуларној патогенези IBD повезане колоректалне карциногенезе и спорадичног колоректалног карцинома, постоје и многе разлике. Оксидативни стрес код хроничног запаљења игра кључну улогу код IBD повезане колоректалне карциногенезе (98). Недостатак гвожђа, углавном због крварења из улцерација и као недостатак у исхрани, а касније суплементација гвожђа могу додатно изменити или побољшати оксидативни стрес (99, 100).

Слободни кисеонични радикали се везују за циљну DNA, RNA протеине или липиде (101, 102) индукују алтерацију гена, генетску нестабилност и ненормалне метилације. Као последица генетске нестабилности оштећује се DNA по типу: транслокације, делеције, амплификације и оштећења теломера (103-106). Скраћивање теломера код улцерозног колитиса је повезано са развојем дисплазија (107, 108). Слободни кисеонични и азотни радикали спречавају репарацију DNA и претпоставља се да су иницијатори микросателитске нестабилности (109).

Претходна истраживања су показала повишену експресију COX2 протеина у запаљенски измењеној слузници, код диспластичних лезија и у колоректалном карциному насталом на терену улцерозног колитиса (110). COX2 активира прокарциногенезу, промовишући ангиогенезу, а посредно повећава и производњу слободних радикала (111). Многе од молекуларних промена одговорне за спорадичне колоректалне карциноме, такође имају улогу код настанка колоректалног карцинома на терену инфламацијских болести црева.

За разлику од спорадичног колоректалног карцинома, губитак функције APC гена је много ређи и обично се јавља у каснијим фазама дисплазија-карцином секвенце (112-114). Постоји више доказа који имплицирају да је дисфункција гена p53 кључни фактор код IBD удружене колоректалне карциногенезе (115). Метилација CpG острва у неколико гена изгледа да претходи дисплазији и широко је распрострањена у слузници болесника са улцерозним колитисом (115, 116). Хромозомска нестабилност и микросателитска нестабилност су најчешћи облик геномске нестабилности код колоректалног карцинома насталог на терену улцерозног колитиса (117-119). Анеуплоидија, маркер геномске нестабилности, чешћа је код болесника оболелих од улцерозног колитиса са трајањем болести дужим од 10 година и често је повезана са диспластичним лезијама (117-122). Анеуплоидија је присутна и у не диспластичним, диспластичним лезијама и у епителу колоректалног карцинома код инфламацијских болести црева (123), али много чешће код диспластичних лезија вишег степена (124, 125). Хромозомска нестабилност је најчешћи облик геномске нестабилности код колоректалних карцинома насталих на терену инфламације и представља рани догађај у прогресији улцерозног колитиса у карцином (117). Учесталост MSI (енгл. Microsatellite instability, MSI) је у распону од 8-21% код карцинома насталих на бази

улцерозног колитиса и 13-19% у диспластичним лезијама (126-128). Микросателитна нестабилност такође је откривена и код инфламиране слузнице у фази регенерације (128-130). Brentnall и сарадници (129) су показали MSI код 50% хронично инфламиране слузнице без диспластичних лезија, а та фреквенција је била знатно нижа у студији Noffsingera и сарадника (128). Релативно висока фреквенција MSI у инфламираној слузници без диспластичних промена у поређењу са диспластично измењеном слузницом, сугерише да MSI може бити повезана са хроничним запаљењем, вероватно на терену да хронична инфламација изазива оскидатурни стрес (107). Улцерозни колитис и карциномска прогресија се карактеришу убрзаним скраћивањем теломера (107). Губитак интегритета теломера може да допринесе дегенерацији хромозомске стабилности као и промени у броју хромозома (107).

Тумор супресорски ген p53 је један од најважнијих супресорских гена укључених у IBD удружену карциногенезу и његова мутација представља најранији догађај карциногенезе (131). Мутације p53 настају као последица оштећења DNA под дејством унутрашњих и спољашњих фактора (132). Бројне студије су показале да током прогресије улцерозног колитиса у карцином, мутира ген p53 што се може дијагностиковати имунохистохемијски у диспластичној и карциномски измењеној слузници (133-135). Делеција гена p53 је описана код 6% нормалне, неизмењене слузнице, код 9% промена слузнице у категорији „неодређено за дисплазију”, код 33% слузнице са дисплазијом ниског степена, код 63% слузнице са високим степеном дисплазије и код 50-85% случајева колоректалног карцинома постоји делеција гена p53 (136, 137). Степен мутације гена p53 је у корелацији са степеном диспластичних промена инфламиране слузнице, што је и показано у неколико студија (131, 133, 135, 138, 139). Мутације гена p53 присутне су и у недиспластичном епителу слузнице колона, што указује на чињеницу да је хронична инфламација предиспозиција за геномске промене (56, 140).

Губитак функције гена APC се сматра покретачем колоректалне карциногенезе спорадичних колоректалних карцинома (141). Насупрот томе, APC алтерација је релативно ретка и представља крајњи догађај у низу генетских промена у колоректалној карциногенези на терену инфламације (117, 118, 138). Код болесника са IBD и дисплазијом или дијагностикованим карциномом, APC мутације су пронађене у мање од 14% узорака (112, 118, 142). За разлику од гена p53, APC алтерације нису детектоване у суседним инфламираним недиспластичним сегментима слузнице колона (143, 144). Мутација KRAS онкогена није чест догађај у IBD колоректалној карциногенези, у поређењу са спорадичним колоректалним карциномом. KRAS мутације су идентификоване у око 15% случајева инфламиране слузнице, у 23% диспластичне слузнице и у 24% колоректалних карцинома на терену инфламације (117, 133, 136, 138, 145, 146, 147). KRAS мутација је каснији догађај колоректалне карциногенезе.

Гени за поправку погрешно спарених база DNA - карциноми који настају овим путем имају оштећен механизам за поправку погрешно спарених база у DNA (енг. Mismatch Repair Mechanism, MMR). Ове промене су идентификоване у 8-50% дисплазија и карцинома који се јавља код болесника са улцерозним колитисом (126, 127, 129, 130). Насупрот томе, слузница нормалних контрола, оних са бенигним запаљенским процесом, као и слузнице болесника са Кроновом болешћу не показују промене у MMR генима (148). Генетске или епигенетске промене ових гена индукују микросателитску нестабилност код лезија придружених улцерозном колитису (15, 149). Микросателитска нестабилност деактивира неке супресорске гене. Код микросателитски нестабилних карцинома придружених улцерозном колитису, детектована је мутација TGFβRII гена,

иако у знатно нижим стопама, него код микросателитске нестабилности спорадичних карцинома (150).

У основи инфламацијских болести црева су субмукозна васкуларна пролиферација и повишене серумске концентracије цитокина који промовишу ангиогенезу (18). Један од главних ангиогених медијатора, који стимулише пролиферацију и миграцију ендотелних ћелија крвних судова је фактор раста васкуларног ендотела (енгл. Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF) (18). Карактеристична хипоксија, присутна како у колоректалном карциному, тако и у инфламацијским болестима црева, стимулише повећану синтезу VEGF помоћу транскрипционог фактора HIF-1 α (енгл. Hypoxia-inducible factor 1-alpha) (151). VEGF као мултифункционалан протеин, има важну улогу у патогенези малигну обoљeња делујући првенствено у неоангиогенези и лимфангиогенези, пенетрацији малигну ћелија у циркулацију и њиховој дисеминацији, у анергији антитуморског имунског одговора (152, 153). Сматра се да VEGF има двоструки ефекат у анергији антитуморског имунског одговора: 1) инхибицијом функционалног сазревања дендритских ћелија, за које се сматра да имају централну улогу у развоју антитуморског имунског одговора и представљају специјализоване и потентне антиген презентујуће ћелије које покрећу имунски одговор (154), фенотипским и функционалним променама у Т лимфоцитима (155); 2) кроз проинфламаторну активност модулацијом хематопоезе и активацијом гранулоцита и моноцита (154). Постоје бројна истраживања која доказују да већина тумора продукује висок ниво VEGF и да његова неутрализација значајно инхибира неоангиогенезу и раст тумора (156, 157). p53 и p16, по функцији тумор-супресорски гени имају специфичну улогу у регулацији ангиогенезе. Нормални облици p53 и p16 смањујући експресију VEGF инхибирају ангиогенезу, док мутирани облици повећавају његову синтезу и стимулишу ангиогенезу (158).

1.6.5. Онкогенеза спорадичног колоректалног карцинома

Карциногенеза колоректалног карцинома је дуготрајан и постепен процес током којег из доброћудног малог аденома као последица наслеђених и/или стечених мутација настаје злоћудни инвазивни тумор. Осим спољашњих карциногена који делују на епителну ћелију, она носи и наследне факторе, који могу изазвати генетску алтерацију способну за индуковање њене пролиферације и неконтролисани раст (18). Са друге стране, ћелија у стању појачане абнормалне пролиферације, много је осетљивија на утицај карциногена и даљу генетску аберацију (18). DNA синтеза у здравом колону доводи до дељења и пролиферације ћелија у доњем и средњем делу крипти. Будући да ћелије мигрирају према површини, пролиферација се смањује, а заузимајући горњи део крипти оне постају потпуно диферентоване и више се не деле. У неопластичним лезијама тај је редослед поремећен, тако да се појачана пролиферацијска активност види и у горњој трећини крипта. Те се промене могу видети и пре клиничке манифестације болести. Експериментално појачана пролиферација епителних ћелија дебелог црева може бити изазвана под утицајем карциногена, попут секундарних жучних киселина. Она се може доказати и код болесника са улцерозним колитисом када изостане репресија синтезе DNA у фази обнављања епителних ћелија. Абнормалности у деловању протоонкогена, тумор-супресорских гена и репарацији DNA, могу изазвати поремећај нормалног ћелијског циклуса са појачаном ћелијском пролиферацијом (18). Према овом моделу спорадични карцином дебелог црева настаје као последица низа генских промена, које условљавају напредовање процеса од

појачане пролиферације епителних ћелија до метастатског карцинома. Процес је континуиран, каскадан, траје од неколико година до неколико деценија. Током тог временског периода на слузници дебелог црева настају аденоми, као мали доброћудни тумори, који с временом расту у веће аденоме са повећаним малигним потенцијалом. Крајњи исход овог процеса зависи више од броја накупљених промена него од редоследа догађаја (18).

Геномска нестабилност представља важан догађај у колоректалној прогресији и на основу ње могу се разликовати два пута настанка CRC-а, супресорски (традиционални) и мутаторски пут (159). Последњих година предложен је и трећи молекуларни пут канцерогенезе колона, метилаторски пут (160).

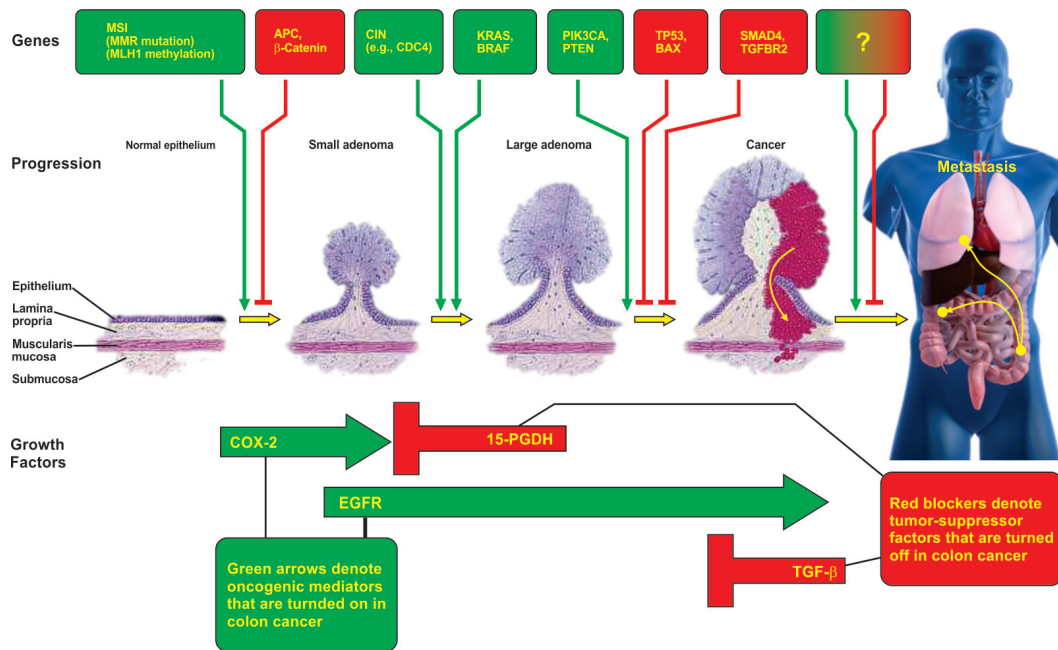
Дакле, са молекуларне тачке гледишта класификација CRC-а се базира на ћелијским догађајима који карактеришу ова три пута карциногенезе: хромозомској нестабилности (енг. Chromosome instability, CIN), микросателитској нестабилности (енг. Microsatellite instability, MSI) и метилаторском фенотипу CpG острваца (енгл. CpG island methylator phenotype, CIMP) (161).

Супресорски пут колоректалне карциногенезе: супресорски или традиционални пут колоректалне карциногенезе предложили су још 90-тих година прошлог века Fearon и Vogelstein (84).

Овај класични модел настанка тумора од аденома до микросателитски стабилних (енг. Microsatellite stability, MSS) карцинома се може уочити код 60-85% спорадичних CRC-а (162). Молекуларни профил ових тумора карактерише се хромозомском нестабилношћу која укључује губитак или амплификацију хромозома, анеуплоидију, транслокације, губитак хетерозиготности (енг. Loss of heterozygosity, LOH) и то најчешће за: 5q (APC ген), 8p, 17p (TP53 ген) и 18q (гени DCC, SMAD2 и SMAD4) (162). Иницијатором овог пута сматра се губитак или мутација у тумор-супресор APC (енг. Adenomatous Polyposis Coli, APC) гену, али карактеристичне су и мутације протоонкогена KRAS. Губитак гена DCC, SMAD2 и SMAD4 индукује даљу прогресију тумора и то онемогућавањем апоптозе. Мутације TP53 гена се дешавају касније, током преласка бенигне лезије у инвазивну болест (162).

Мутаторски пут колоректалне карциногенезе: карциноми који настају овим путем имају оштећен механизам за поправку погрешно спарених база у DNA (енг. Mismatch Repair Mechanism, MMR), чиме је омогућено накупљање мутација (159). MMR је под контролом неколико гена при чему су најчешћи MLH1, MLH2, MLH6, PMS2. Немогућност поправке (енгл. Mismatch-a) се може лако уочити јер резултује у варијабилности дужина кратких, поновљених нуклеотидних секвенци у DNA (микросателита) од ћелије до ћелије, тј. у микросателитској нестабилности (159). Метилаторски пут колоректалне карциногенезе: карактеризација епигенетских фактора, нарочито метилација промоторских секвенци гена, довела је до дефиниције CIMP (енгл. CpG island methylator phenotype, CIMP) карцинома (162). Око 40% генских промотора сисара садржи CpG острвца која су неметилована код експримираних гена (161).

Сматра се да механизам метилације промоторских региона има улогу у настанку око 35% CRC-а (163). За разлику од традиционалног „аденом-карцином“ пута настанка тумора, метилаторски пут започиње од прекурсорских лезија званих „сесилни рецкасти аденоми/полипи“ (енг. Sessil serrated adenoma/polyp), па се често и сам пут назива „serrated pathway“ (163).



Слика 4. Генетске промене током колоректалне карциногенезе (преузето из: Markowitz SD, Bertagnolli MM. N Engl J Med 2009; 361 : 2449-60)

1.6.6. Прогностички фактори

Прогноза код болесника са колоректалним карциномом је јасно повезана са степеном пенетрације тумора кроз зид црева, захваћеношћу лимфних чворова и присуством/одсуством удаљених метастаза (164). Ове карактеристике су заправо основа TNM система за одређивање стадијума тумора, што чини TNM стадијум главним прогностичким фактором ове болести.

Петогодишње преживљавање достиже 90% ако се карцином дијагностикује у раним, локализованим стадијумима (стадијум 0 и I) (164). Уколико се карцином прошири на околне лимфне чворове или органе преживљавање се смањује на 65% (стадијуми II и III) (164). Ширењем тумора у удаљене делове тела стопа преживљавања пада на само 10% (стадијум IV) (164). Ипак, код болесника који имају један или неколико тумора који су се раширили са колона на плућа или јетру, хируршка интервенција уклањања ових тумора може у знатној мери да побољша петогодишње преживљавање (78). Треба имати у виду да је прогноза на основу TNM класификације ограничена јер чак ни исход у оквиру сваке групе није хомоген (159).

СЕА (енг. Carcinoembryonic antigen, СЕА) је најчешће коришћени тумор маркер код болесника са CRC-ом (165). Повишен ниво СЕА у серуму пре ресекције примарног тумора може имати негативан прогностички значај, нарочито код болесника са захваћеним лимфним чворовима. Ипак, СЕА не треба мерити код болесника који примају неoadјувантну или адјувантну терапију (165). Вредности СЕА користе се као дијагностички показатељи одговора на терапију и рекурентности тумора након радикалне хирургије.

1.7. ИМУНСКИ ОДГОВОР НА ТУМОРЕ

Имунски систем је веома ефикасан у откривању и елиминисању страних инфективних агенаса, поштеђујући сопствене ћелије и ткива. На туморским ћелијама појављују се молекули које би имунски систем носиоца тумора могао да препозна као стране и да их елиминише својим ефекторским механизмима. Ова могућа улога имунског система назива се имунски надзор (1). Основни механизам имунског одговора на туморе је убијање туморских ћелија посредством ефекторних механизма ћелијске и хуморалне имуности, као и посредством ћелија неспецифичне имуности (макрофаги и НК ћелије). Туморска микросредина представља место где различите врсте ћелија укључујући туморске и ћелије имунског система константно интерреагују. Virchow је први открио леукоците у и на граници туморског ткива 1863. године. Данас се зна да тумор-асоцирани макрофаги (енгл. TAMs) чине већи део леукоцитног инфилтрата око многих тумора (и примарних и метастаза). Поларизација Th лимфоцита има вишеструки утицај на антитуморски одговор. Сматра се да централну улогу у поларизацији имунског одговора имају цитокини. Поред тога, цитокини својим дејством на друге ћелије имају важну улогу у регулацији антитуморске имуности.

Антитуморска имуност је посредована механизмима урођене и стечене имуности (166, 167-170). Значајна улога Т лимфоцита у антитуморском имунском одговору је добро позната (166, 167-170). CD4⁺ Th лимфоцити имају важну улогу у регулацији имунског надзора, посредованог CD8⁺ Т лимфоцитима (167, 170-173). Али, прецизна улога CD4⁺ Th лимфоцита у антитуморској имуности није сасвим разјашњена. Додатно је компликована чињеницом да се CD4⁺ Th лимфоцити могу поделити на више функционалних фенотипа: Т хелпер 1 (Th1), Т хелпер 2 (Th2) Т хелпер 17 (Th17), регулаторни Treg лимфоцити, на основу способности да секретују различите цитокине (13,174,175,176-178). Th1 лимфоцити секретују IFN- γ и TNF- α који имају значајну улогу у индукцији ћелијског имунског одговора, док Th2 лимфоцити супримирају ћелијску имуност појачавањем хуморалног имунског одговора продукцијом IL-4, IL-5, IL-10 и IL-13 (179, 180, 176, 155, 161). Th17 лимфоцити су важни за настанак запаљења, јер обезбеђују брзо „регрутовање“ неутрофилних леукоцита и макрофага (178, 181).

ЦИЉ РАДА

Основни циљ овог истраживања је да се испита значај експресије p16, p53 и VEGF за прогресију инфламацијске болести црева и колоректалног карцинома, као и евентуалног ефекта ових молекула на модулацију имунског одговора.

У складу са основним циљем анализирали смо:

1. Корелацију експресије p16, p53 и VEGF у циљаном ткиву са клиничко патолошким карактеристикама испитаника
2. Серумску концетрацију TNF- α , TGF- β , IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, IL-27 и IFN- γ , као и односа контрарегулаторних цитокина IFN- γ /IL4, IFN- γ /TGF- β , IFN- γ /IL-10, IL-17/IL-10, IL-6/TGF- β , IL-27/IL-17 и IL-17/TGF- β
3. Корелацију серумских вредности цитокина TNF- α , TGF- β , IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, IL-27 и IFN- γ и односа контрарегулаторних цитокина IFN- γ /IL4, IFN- γ /TGF- β , IFN- γ /IL-10, IL-17/IL-10, IL-6/TGF- β , IL-27/IL-17 и IL-17/TGF- β са клиничко-патолошким карактеристикама испитаника
4. Корелацију серумских вредности цитокина TNF- α , TGF- β , IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, IL-27 и IFN- γ и односа контрарегулаторних цитокина IFN- γ /IL4, IFN- γ /TGF- β , IFN- γ /IL-10, IL-17/IL-10, IL-6/TGF- β , IL-27/IL-17 и IL-17/TGF- β са експресијом p16, p53 и VEGF у циљаном ткиву испитаника.

МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

Истраживање је спроведено у Центру за гастроентерохепатологију, Клиничког центра Крагујевац и у Центру за молекулску медицину и истраживање матичних ћелија Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, у периоду од марта 2011. године до маја 2013. године.

Спровођење студије је одобрио Етички одбор Клиничког центра Крагујевац и Етички одбор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу. Студија је одобрена као непрофитна клиничка студија, која се спроводи искључиво у научноистраживачке сврхе. Пре започете студијске процедуре, болесници су потписали образац сагласности за учешће у студији. Протокол је спроведен у складу са важећом регулативом Добре клиничке праксе (GCP, енгл. Good Clinicall Practice).

3.1. ИСПИТИВАНИ УЗОРАК

Сви испитаници укључени у студију подељени су у три групе. Прву групу чинило је 29 испитаника којима је током колоноскопског прегледа дијагностикована инфламацијска болест црева, што је потврђено биопсијом *ex tempore* и који су хоспитализовани. Од 29 испитаника са инфламацијском болешћу црева, 24 су имала дијагностикован улцерозни колитис и 5 испитаника фистулизирајућу Кронову болест. Другу групу су чинила 75 испитаника са колоректалним карциномом. Њима је током колоноскопског прегледа дијагностикован колоректални карцином, што је и потврђено биопсијом *ex tempore* и они су такође хоспитализовани. Трећа контролна група је сачињена од 37 испитаника, добровољних даваоца крви Клиничког центра Крагујевац. Испитаници који су уврштени у прву или другу експерименталну групу су по процени специјалисте гастроентерохепатолога испунили све укључујуће и ниједан искључујући критеријум.

Општи укључујући критеријум за обе експерименталне групе испитаника су старосна доб изнад 18 година, добровољни пристанак за учешће у студији и индикација за извођење колоноскопског прегледа према симптоматологији болесника (поремећај цревног пражњења, крв у столицама, анемија, губитак апетита и тежине, позитиван тест на фекално окултно крварење).

Искључујући критеријуми за прву експерименталну групу испитаника су раније дијагностикована инфламацијска болест црева, претходна употреба терапије (антибиотици, аминосалицилати, кортикостероиди, имуносупресивни лекови и биолошка терапија).

Искључујући критеријуми за другу експерименталну групу испитаника су раније ресекције колоректалног карцинома, рецидивантни тумори колона и спроведена зрачна и/или хемиотерапија.

Искључујући критеријуми за обе експерименталне групе испитаника је коморбидитет са другим гастроентеролошким болестима (рефлуксна болест једњака, улкусна болест, хеликобактер пилори инфекција, малапсорптивни синдром, дивертикулозна болест црева), аутоимунским, запаљенским, малигним и инфективним болестима.

3.2. ИСТРАЖИВАЧКИ ПОСТУПАК

Свим испитаницима укљученим у истраживање урађен је колоноскопски преглед и биопсијом *ex tempore* дијагностикована је инфламацијска болест црева или колоректални карцином. Колоноскопски прегледи су обављани у Центру за гастроентерохепатологију, Клиничког центра Крагујевац, уз одговарајућу припрему испитаника. Ови прегледи су извођени на колоноскопу марке Olympus exera. Испитаницима на дан пријема је узета крв за рутинске лабораторијске анализе, одређивање концентрације туморских маркера и цитокина у серуму.

На основу клиничке активности болести, испитаници са улцерозним колитисом су сврстани у три групе: испитаници са благом активношћу болести (≤ 3 столице дневно, са незнатним крварењем и минималном анемијом, нормалном телесном температуром и нормалним пулсом, седиментацијом < 30 mm/сат и без системских манифестација), испитаници са умерено тешком активношћу болести (4-6 столице дневно, са знатнијим крварењем и анемијом, повишеном телесном температуром, тахикардични, седиментацијом еритроцита већом од 30 mm/сат, присутним екстраинтестиналним манифестацијама) и испитаници са тешком формом болести (≥ 7 течних столица дневно са ректалним крварењем, са знацима токсичности и системским манифестацијама: високом температуром, губитком телесне тежине $\geq 10\%$, дехидрирани, са ортостатском хипотензијом, анемијом и вредностима хемоглобина ≤ 10 g/dL, хипоалбуминемијом и потребом за хоспитализацијом) (29).

Сматра се да су инфламацијске болести црева аутоимунске природе и да могу бити праћене симптома и компликацијама ван дебелог црева. Процењује се да учесталост екстраинтестиналних манифестација износи 6-46% (61). У овој студији, на основу присуства екстраинтестиналних манифестација (анемије, коштано-зглобних и кожних промена) оболели од улцерозног колитиса су сврстани у групу са екстраинтестиналним манифестацијама и у групу без екстраинтестиналних манифестација (62).

У зависности од присуства локалних компликација (стриктуре, псевдополипи, диспластичне лезије слузнице) испитаници са улцерозним колитисом су даље сврстани у групу са локалним компликацијама и групу без локалних компликација (35, 56). Локалне компликације типа псевдополипа и диспластичних лезија су дијагностиковане колоноскопским прегледом и патохистолошки су верификоване. У циљу дефинисања стриктура свим испитаницима са улцерозним колитисом је урађен радиолошки преглед дебелог црева у Служби за радиолошку дијагностику, КЦ Крагујевац.

Колоноскопија је ендоскопска процедура којом се откривају патолошке промене и абнормалности у дебелом цреву. Колоноскопија се изводи уз помоћ колоноскопа и на врху овог апарата је камера која омогућава визуализацију унутрашњости црева. За колоноскопију је неопходна припрема испитаника у периоду од неколико дана и изводи се по стандардним протоколима припреме. Уколико постоји потреба, приликом колоноскопије се узима узорак ткива за даљу анализу.

У току ендоскопског прегледа испитаницима са улцерозним колитисом је одређена екстензивност болести и то према дужини захваћености дебелог црева. Тако код улцерозног проктитиса запаљенске промене су присутне у ректуму, код проктосигмоидитиса у ректуму и сигми, код левостраног колитиса у левом колону, а код панколитиса запаљенске лезије су локализоване дуж целог колона (31). Према модификованом Вагон-овом скору разликују се нормална слузница, слузница са губитком субмукозног васкуларног цртежа, гранулирана и невулнерабилна слузница, као и слузница коју карактеришу контактна вулнерабилност, спонтано крварење и

улцерације (32).

У току колоноскопије узимани су ткивни исечци на местима измењене слузнице колона (са хиперемичне, вулнерабилне, гранулиране слузнице), на местима улцерација, фибринских наслага, псеудополипа и сужења. Ови исечци ткива су коришћени за патохистолошку и имунохистохемијску анализу (од сваког испитаника узето је по 5 исечака ткива, величине 4-5 mm).

Ткивни исечци за патохистолошку анализу су анализирани у Служби за патологију. Исечци ткива су фиксирани у пуферисаном 4% формалину, 18-24 сата, дехидрисани у алкохолу и калупљени у парафин. Парафински блокови ткива су серијски сечени на пресеке дебљине 5–7 μm . Уследило је бојење ткивних пресека методом хематоксилин-еозин по Heidenhain-у (182) и сагласно препорукама Gurr-a (183): на почетку су плочице са ткивним пресецима излагане пуферу формалдехида 10 секунди, онда су опране у текућој води, а затим су потопљене два минута у Mayer-ов хематоксилин (Merck). На крају су плочице са ткивним пресецима испране један минут у текућој води и бојене алкохолним еозином (Merck) у трајању од једног минута. Након бојења исечци су дехидрирани тако што су потапани у серију растућих концентрација алкохола и то следећим редом: најпре један минут у 85%-тном алкохолу, затим два пута по 50 секунди у 96%-тном и на крају два пута по 50 секунди у апсолутном алкохолу. Након бојења и дехидратације, уследио је поступак просветљавања потапањем у мешавину ксилола и алкохола у односу 1:1, 50 секунди, а затим два пута по 50 секунди само у ксилолу. На крају је на ткивне исечке нанет Канада балзам (Canadabalsam, Centrohem, Србија) и препарати су прекривени покровним стаклима. Овако припремљени ткивни исечци су, након 24-часовног сушења, анализирани светлосном микроскопијом (увеличање 10 и 40 пута).

Патохистолошком анализом инфламиране слузнице колона је дефинисан степен хистолошких промена слузнице црева. Према степену хистолошких промена инфламиране слузнице колона, сви испитаници са улцерозним колитисом су разврстани у три категорије: испитаници са хистолошким променама првог степена (архитектонске промене, жаришта лимфоцита, без криптних апсцеса и без епителне деструкције), испитаници са хистолошким променама другог степена (благо запаљење, едем, повећана васкуларност, повећан број акутних и хроничних запаљенских ћелија) и испитаници са хистолошким променама трећег степена (инфилтрати акутних и хроничних запаљенских ћелија, криптни апсцеси, улцерације површинског епитела и пурулентни ексудат) (33).

Поред испитаника са улцерозним колитисом у ову студију су били укључени и оболели од Кронове болести а који су према степену хистолошких промена инфламиране слузнице колона разврстани у три категорије: испитаници са хистолошким променама првог степена (запаљење крипти, криптни апсцеси и присуство полиморфонуклеарних леукоцита), испитаници са хистолошким променама другог степена (присуство лимфоидних фоликула са еритемским прстеном), испитаници са хистолошким променама трећег степена (присуство гранулома без казеозне некрозе, са епителоидним и мултинуклеарним циновским ћелијама) (33).

У истраживање су били укључени и оболели од колоректалног карцинома којима су у току ендоскопског прегледа узимани узорци туморског ткива за патохистолошку и имунохистохемијску анализу. Свим испитаницима са колоректалним карциномом урађен је ултразвучни преглед стомака, радиографски преглед плућа и срца, компјутеризована томографија стомака и мале карлице код ректалне и дисталне локализације тумора. Ултразвучни прегледи стомака су рађени у Центру за

гастроентерохепатологију, уз одговарајућу припрему. Компјутеризована томографија стомака и мале карлице је рађена у Служби за радиолошку дијагностику по стандардним протоколима. Радиографски прегледи су обављени у Служби за радиолошку дијагностику по стандардним протоколима и испитаници су сврстани у групу са дијагностикованом метастатском болешћу јетре и плућа и групу испитаника без дијагностикованих метастаза у јетри и плућима. Свим испитаницима код којих је верификована слободна течност у стомаку, узет је пунктат који је послат у Службу за патологију где је анализарано присуство малигнух ћелија у пунктату. Карциноматоза перитонеума је верификована налазом малигнух ћелија у пунктату. Даље смо ове испитанике сврстали у две групе, односно у групу са карциноматозом перитонеума и у групу без карциноматозе перитонеума.

Патохистолошка анализа исечака туморског ткива и преглед пунктата на малигне ћелије, су обављени у Служби за патологију. Исечци ткива су фиксирани у пуферисаном 4% формалину, 18-24 сата, дехидрирани у алкохолу и калупљени у парафин. Из парафинских блокова ткиво је сечено на дебљину 5–7 μm бојено стандардном хематоксилин еозин методом (H&E). Хистопатолошке (микроскопске) особине су подразумевале одређивање хистолошког (HG) и нуклеарног градуса (NG) тумора. Хистолошки градус тумора означава степен диференцијације и број митоза туморских ћелија и у складу је са агресивношћу тумора. Хистолошки градус тумора је препознат као важан прогностички параметар код колоректалног карцинома. Препоручен је и двоструки систем градирања тумора: тумор ниског градуса (добро диферентовани и умерено диферентовани) и високог градуса (слабо диферентовани и недиферентовани) (80). Према светској здравственој организацији разликује се добро, умерено, слабо диферентовани и недиферентовани тумор (81). Оба система су засновани искључиво на проценту жлезданих формација.

Нуклеарни градус је такође параметар који указује на степен ћелијске малигности, а заснива се на одређивању морфолошке измењености једра малигне ћелије у односу на непромењену, здраву ћелију. Дефинише се као низак (NG1), средњи (NG2) и висок (NG3) (82).

У нашој студији испитаници са колоректалним карциномом у односу на хистолошки градус су сврстани у три групе: градус I, добро диферентован; градус II, умерено диферентован и градус III, лоше диферентован, а у односу на нуклеарни градус такође у три групе: низак (I), средњи (II) и висок (III). Ниједан од анализираних тумора није имао недиферентован хистолошки и нуклеарни градус.

3.3. ОДРЕЂИВАЊЕ КОНЦЕНТРАЦИЈЕ ЦИТОКИНА, CRP И ТУМОРСКИХ МАРКЕРА У СЕРУМУ

За одређивање концентрације цитокина у серуму, свим испитаницима венепункцијом узето је по 10 ml крви. Узорак је центрифугиран на 2000 обртаја 5 минута, а затим је издвојен серум аликвотиран и чуван на температури од -20°C .

Концентрације TNF- α , TGF- β , IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, IL-27 и IFN- γ у серуму су испитиване одговарајућим комерцијалним ELISA тестом (за анализу IL-6, IL-17 и IL-27 коришћен је DuoSet, R&D Systems, Minneapolis, Minn., USA, а за TNF- α , TGF- β , IL-4, IL-10 и IFN- γ коришћен је Opt EIA Set, BD Biosciences, San Diego, CA. USA).

Стандарди су пре употребе растворени у PBS-у (pH 7.2). Од оваквих штокова направљена су серијска растућа разблажења у 7 тачака у комерцијалном растварачу, према упутству произвођача. 100 μl радне концентрације везујућег антитела (енгл. Capture Antibody) сипано је у бунарчиће полистиренских микротитар плоча (MTP, енгл. Microtiter-plate) са 96 бунарчића са равним дном (SARSTED). Плоче су прелепљене адхезивном фолијом (енгл. ELISA Plate Sealers) и остављене преко ноћи на собној температури, након чега су бунарчићи испрани пуфером за испирање (енгл. Wash Buffer) у аутоматској машини за испирање MTP-а. Затим је у све бунарчиће додат блокирајући пуфер (Block Buffer, 1% BSA у PBS-у) финалног волумена 300 μl и MTP су остављене минимум један сат на собној температури, а потом испране пуфером за испирање. Сви узорци су претходно разблажени 10 пута у дејонизованој води. Разблажени узорци и припремљени стандарди насути су у MTP, прекривени адхезивном фолијом и остављени два сата на собној температури. Након инкубације и испирања MTP, у све бунарчиће је додато 100 μl радне концентрације детекционог антитела (енгл. Detection Antibody), плоче су обложене адхезивном фолијом и поново остављене два сата на собној температури. Плоче су потом испране, а у бунарчиће сипано 100 μl радне концентрације Streptavidin-HRP (енгл. Streptavidin horseradish peroxidase). Инкубација на собној температури и без директног излагања светлости прекинута је након 20 минута, испирањем MTP-а. У бунарчиће је сипано 100 μl раствора супстрата (енгл. Substrate Solution: Colorreagent A+Colorreagent B, 1:1). Двадесет минута касније, додато је 50 μl стоп раствора (енгл. Stop Solution: 2 NH_2SO_4) и апсорбанца је мерена одмах у сваком бунарчету, помоћу Micro platereader-а (Zenyth, Anthos, UK) подешеног на 450 nm. Све измерене вредности су умањене за вредности апсорбанце слепе пробе (дејонизована вода). На основу измерених вредности стандарда направљена је стандардна крива, а помоћу ње су израчунате вредности за сваки појединачан узорак. Сви узорци су мерени у трипликату.

Одређивање серумских концентрација CRP и туморских маркера

За одређивање концентрације CRP и туморских маркера AFP, CEA и CA 19-9 у серуму, свим испитаницима венепункцијом узето је по 5 ml крви. Узорак је центрифугиран на 3000 обртаја 20 минута.

Серумске концентрације CRP (енгл. C-reactive protein) су одређиване турбидиметријском методом, док серумске концентрације туморских маркера AFP (енгл. Alpha fetoprotein), CEA (енгл. Carcinoembryonic antigen) и CA 19-9 (енгл. Carbohydrate antigen) су одређиване методом хемилуминисценције, у централној лабораторији Клиничког центра Крагујевац.

3.4. АНАЛИЗА ЕКСПРЕСИЈЕ p16, p53 и VEGF У ЦИЉАНОМ ТКИВУ

У току ендоскопског прегледа узимани су ткивни исечци за имунохистохемијску анализу (од сваког испитаника узето је по 5 узорака дебљине 4-5 mm). Интензитет експресије p53, p16 и VEGF одређиван је имунохистохемијском техником на парафинским исечцима, стрептавидин-биотин методом (АВС систем, Avidin- Biotin peroxidase complex). Анализирани су узорци слузнице колона испитаника са улцерозним колитисом и Кроновом болешћу, као и узорци туморских промена испитаника са колоректалним карциномом који су узети биопсијом. Ткива су рутински фиксирана у 4% формалдехиду, дехидрирана у растућим концентрацијама алкохола, очишћена ксилолом и уграђена у парафин. За имунохистохемијску анализу парафински калупи су сечени на 4-5 микрона дебљине, а затим је урађена депарафинизација. Ткивне исечке смо потапали у ксилол и у опадајуће концентрације алкохола (100%, 96%, 70% и 50%). У циљу демаскирања антигена исечци су грејани 20 минута у цитратном пуферу (pH 6.0) у микроталасној пећници. Након хлађења, препарати су испрани раствором PBS-а а затим су инкубирани 8 минута у 3% раствору хидрогена у PBS-у у циљу блокирања активности ендogene пероксидазе. Након испирања, ткивни исечци су инкубирани са примарним антителима 1 сат на собној температури у влажној комори. Коришћена су одговарајућа мишија моноклонска антитела: антихумано-p53 (ab 17869-250, Abcam, Cambridge, UK, коришћено разблажење 1:200), антихумано-p16 (sc 81156, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA, у разблажењу 1:50) и антихумано-VEGF (ab 16883, Abcam, Cambridge, UK, у разблажењу 1:200). Сва примарна антитела су разблажена у 1% BSA/PBS. Као негативна контрола су коришћени они ткивни пресеци који су уместо примарног антитела инкубирани са 1% BSA/PBS. Као позитивна контрола су коришћени ткивни пресеци оних ткива код којих је потврђена експресија протеина од интереса. Након инкубације са примарним антителима, препарати су испрани, а затим инкубирани са секундарним антителима, 1 сат на собној температури у влажној комори. Након испирања препарати су инкубирани са стрептавидин пероксидазом, а затим испрани у раствору PBS-а. Након тога су препарати инкубирани у влажној комори са хромогеним супстратом односно са диаминобензидином и испрани су дестилованом водом. На крају су препарати обојени хематоксилином и испрани водом, а затим дехидрирани у растућим концентрацијама алкохола (50%, 70%, 96% и 100%) и просветљени у ксилолу, а затим смо на ткивне исечке наносили Канада балзам (Canadabalsam, Centrohem, Србија) и прекрили их покровним стаклом. Овако припремљени ткивни исечци су, након 24-часовног сушења, анализирани светлосном микроскопијом на увељичању 400x. Препарате су анализирала три независна истраживача.

Експресија p16, p53 и VEGF је детектована налазом браон обојених ћелија и одређивана је семиквантитативно. Скор експресије је оцењиван на основу процента обојених ћелија у односу на укупан број евалуираних ћелија. На основу претходних искустава, експресија маркера је дефинисана као позитивна уколико је >10% ћелија било обојено и негативна ако је у измењеним лезијама било обојено ≤10% ћелија (184, 185).

3.5. СТАТИСТИЧКА ОБРАДА ПОДАТАКА

Подаци су анализирани коришћењем софтверског пакета IBM SPSS Statistics 20. Добијени резултати су груписани и приказани, табеларно и графички. За утврђивање мера централне тенденције и варијабилитета коришћене су методе дескриптивне статистике. Резултати су приказани као средње вредности (енгл. mean), стандардне грешке (енгл. standard error), медијане (енгл. med), перцентили (енгл. percentiles), минимум, максимум и проценти.

Пре статистичке обраде података, прво смо испитали да ли добијене вредности имају нормалну расподелу. Нормалност расподеле унутар група анализирана је Kolmogorov-Smirnov-им и Shapiro-Wilk-овим тестовима. Уколико су вредности имале нормалну расподелу користили смо Student's-ов t тест, док у случају вредности које нису имале нормалну расподелу, користили смо непараметријски Mann-Whitney-ев и Wilcoxon-ов тест.

За поређење средњих вредности једног обележја више популација коришћен је тест за вишеструку компарацију или Kruskal-Wallis-ов тест за вредности које нису пратиле нормалну расподелу и One-Way ANOVA тест за вредности са нормалном расподелом. Интензитет и смер повезаности између варијабли су одређивани Pearson-овим и Spearman-овим коефицијентом корелације. За утврђивање зависности између варијабли коришћен је χ^2 тест. За оцену хомогености варијанси коришћен је Levin-ов тест једнакости варијанси [да ли је једнака варијанса (променљивост) резултата у две групе података].

За приказ односа сензитивности и специфичности и да ли неко обележје може да буде маркер за неку појаву коришћена је крива оперативне карактеристике примаоца (енгл. Receiver operating characteristic curve, ROC curve).

Све статистичке анализе у овом раду су урађене са интервалом поверења од 95%. Резултати статистичке анализе су прихваћени као статистички значајни, уколико је ниво вероватноће нулте хипотезе <5%, односно уколико је значајност теста $p < 0,05$.

РЕЗУЛТАТИ

Демографске карактеристике испитаника

У студију је укључено 75 испитанка са колоректалним карциномом, 29 испитаника са инфламацијским болестима црева (24 са улцерозним колитисом и 5 са Кроновом болешћу) и 37 здравих испитаника. Демографске карактеристике ових испитаника су приказане у табели 1. Није нађена статистички значајна разлика у полној дистрибуцији између група.

Средња вредност година старости у групи испитаника са колоректалним карциномом је била $64,89 \pm 10,51$, у групи испитаника са инфламацијским болестима црева $45,75 \pm 19,72$ ($48,38 \pm 17,94$ за улцерозни колитис, $20,75 \pm 1,71$ за Кронову болест). Регистрована је статистички значајна разлика у старости, између испитаника са колоректалним карциномом и испитаника са инфламацијском болешћу црева. Испитаници са колоректалним карциномом су значајно старије животне доби у односу на испитанике са инфламацијским болестима црева ($p > 0,05$).

Табела 1. Демографске карактеристике испитаника

Параметар	Инфламацијске болести црева	Колоректални карцином	Улцерозни колитис	Кронова болест
Пол				
Мушки	18 (29)	41 (75)	15 (24)	3 (5)
Женски	11 (29)	32 (75)	9 (24)	2 (5)
Године старости (године, средња вредност \pm стандардна девијација)	$45,75 \pm 19,37$	$64,89 \pm 10,44$	$48,38 \pm 17,94$	$20,75 \pm 1,71$

Анализа обухвата 75 испитаника са колоректалним карциномом и 29 испитаника са инфламацијском болешћу црева. Показана је статистички значајна разлика у животној доби између оболелих од колоректалног карцинома и инфламацијске болест црева, наиме испитаници са колоректалним карциномом су старије животне доби, у односу на испитанике са инфламацијским болестима црева ($p > 0,05$). Статистичка значајност је тестирана χ^2 тестом.

Серумски нивои цитокина и експресија p16, p53 и VEGF у инфламираној слузници колона испитаника са улцерозним колитисом и њихова корелација са клиничко патолошким карактеристикама болести

4.1.1. Серумске концентрације цитокина код испитаника са улцерозним колитисом

Анализиране су концентрације цитокина TNF- α , TGF- β , IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, IL-27 и IFN- γ у серуму испитаника са улцерозним колитисом и здравих испитаника. На табели 2 уочава се да су серумски нивои свих наведених цитокина значајно виши у групи испитаника са улцерозним колитисом у односу на здраве испитанике.

Табела 2. Концентрације TNF- α , TGF- β , IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, IL-27 и IFN- γ у серуму испитаника са улцерозним колитисом и здравих испитаника

Цитокини (pg/ml)	Улцерозни колитис (медијана, минимум-максимум)	Здрави (медијана, минимум-максимум)	p
TNF- α	33,0 (0,0-547,1)	0,0 (0,0-97,0)	p=0,001
TGF- β	92,2 (4,93-933,8)	17,7 (0,0-110,6)	p=0,02
IL-4	7,9 (0,0-77,0)	0,0 (0,0-9,1)	p=0,014
IL-6	0,0 (0-1470,0)	0,0 (0,0-138,1)	p=0,01
IL-10	5,7 (0-126,3)	0,0 (0-77,5)	p=0,0005
IL-17	32,2 (0-4021,3)	0,0 (0-316,5)	p=0,022
IL-27	6332,6 (914,0-71038,5)	1832,68 (0-26094,9)	p=0,001
IFN- γ	71,7 (7,3-1274,9)	0,0 (0-219,6)	p=0,001

Анализа обухвата 24 испитаника са улцерозним колитисом и 37 здравих испитаника. Анализиране су серумске концентрације испитиваних цитокина и упоређиване између оболелих од улцерозног колитиса и здравих испитаника. Статистичка значајност је тестирана Mann-Whitney-евим тестом.

Додатно, анализом односа серумских вредности контрарегулаторних цитокина показано је да су вредности односа IFN- γ /IL4, IFN- γ /TGF- β , IFN- γ /IL-10, IL-17/IL-10, IL-6/TGF- β , IL-27/IL-17 и IL-17/TGF- β статистички значајно већи код испитаника са улцерозним колитисом (Табела 3) него код здравих испитаника.

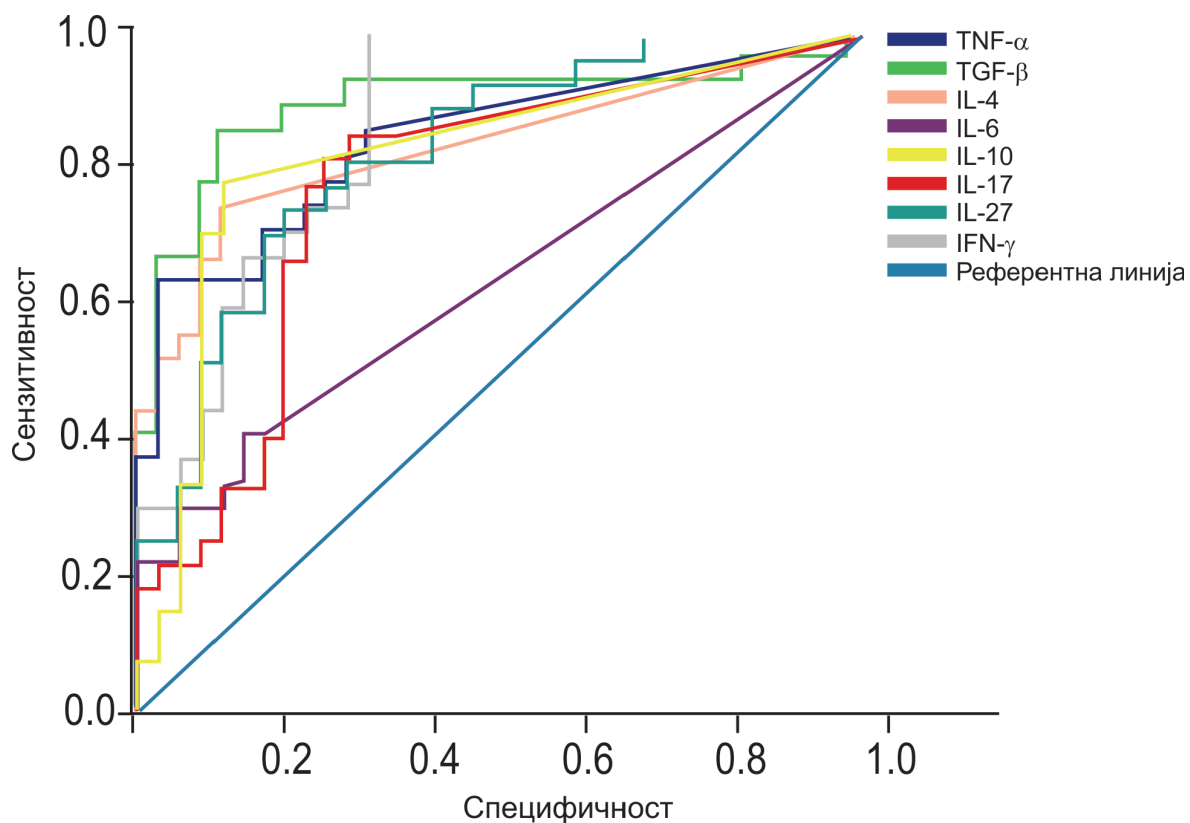
Табела 3. Однос вредности IFN- γ /IL4, IFN- γ /TGF- β , IFN- γ /IL-10, IL-17/IL-10, IL-6/TGF- β , IL-27/IL-17 и IL-17/TGF- β у серуму испитаника са улцерозним колитисом и здравих испитаника

Односи цитокина	Улцерозни колитис (медијана, минимум- максимум)	Здрави (медијана, минимум- максимум)	p
IFN- γ /IL-4	6,91 (0,72-108,08)	0,00 (0,00-29,98)	p=0,001
IFN- γ /TGF- β	0,82 (0,025-16,77)	0,00 (0,00-3,76)	p=0,02
IFN- γ /IL-10	4,09 (0,14-650,44)	0,00 (0,00-14,70)	p=0,002
IL-17/IL-10	3,12 (0,00-1198,31)	0,00 (0,00-316,50)	p=0,01
IL-6/TGF- β	0,00 (0,00-9,70)	0,00 (0,00-6,06)	p=0,04
IL-27/IL-17	116,67 (0,00-679,69)	0,00 (0,00-5895,44)	p=0,002
IL-17/TGF- β	0,47 (0,00-34,89)	0,00 (0,00-21,65)	p=0,03

Анализа обухвата 24 испитаника са улцерозним колитисом и 37 здравих испитаника. Анализирани су односи серумских концентрација контрарегулаторних цитокина и упоређивани између оболелих од улцерозног колитиса и здравих испитаника. Статистичка значајност је тестирана Mann-Whitney-евим тестом.

4.1.2. Анализа логистичке регресије серумских нивоа испитиваних цитокина код испитаника са улцерозним колитисом и здравих испитаника

Претходно је јасно показан значајан пораст концентрације испитиваних цитокина у серуму оболелих од улцерозног колитиса. Са циљем да се утврди који цитокин може да послужи за дискриминацију оболелих од здравих испитаника следећи корак у истраживању био је да се анализира ROC (енгл. Receiver operating characteristic) крива. Такође, она нам је послужила да одредимо оптималну граничну вредност (cut-off) за сваки испитивани цитокин. На фигури 1 ROC кривом је графички приказан однос специфичности и сензитивности серумских нивоа цитокина што указује на маркере разликовања испитаника са улцерозним колитисом од здравих испитаника. Бинарна логистичка регресија указује да повећани нивои свих анализираних цитокина корелирају са улцерозним колитисом. На основу добијених резултата може се констатовати да је од свих анализираних цитокина, TGF- β најсензитивнији и најспецифичнији маркер инфламације (area=0,890, p=0,001). Резултати јасно показују да оптимална гранична серумска концентрација TGF- β износи 20 pg/ml и да ова гранична вредност TGF- β омогућује дискриминацију испитаника са улцерозним колитисом од здравих испитаника (сензитивност 85,2%, специфичност 88,6%).



Фигура 1. ROC (енгл. Receiver operating characteristic curve) анализа биомаркера у дијагнози улцерозног колитиса и здравих испитаника. ROC крива показује сензитивност и специфичност серумских нивоа TNF- α , TGF- β , IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, IL-27 и IFN- γ .

AUC (TNF- α)=0,843, p=0,003, сензитивност 63,0%, специфичност 87,1%, cut off point 25 pg/ml;
AUC (TGF- β)=0,890, p=0,001, сензитивност 85,2%, специфичност 88,6%, cut off point 20 pg/ml;
AUC (IL-4)=0,833, p=0,004, сензитивност 74,1%, специфичност 88,6%, cut off point 30 pg/ml;
AUC (IL-6)=0,634, p=0,045, сензитивност 40,7%, специфичност 85,7%, cut off point 20 pg/ml;
AUC (IL-10)=0,823, p=0,005, сензитивност 77,8%, специфичност 88,6%, cut off point 24 pg/ml;
AUC (IL-17)=0,788, p=0,032, сензитивност 85,2%, специфичност 71,4%, cut off point 20 pg/ml;
AUC (IL-27)=0,830, p=0,006, сензитивност 74,1%, специфичност 80,0%, cut off point 1000 pg/ml;
AUC (IFN- γ)=0,866, p=0,002, сензитивност 100%, специфичност 68,6%, cut off point 53 pg/ml.
AUC (енгл. Area under the curve)

4.1.3. Клиничко патолошке карактеристике улцерозног колитиса и експресија p16, p53 и VEGF у инфламираној слузници колона

У даљем току истраживања испитана је експресија p16, p53 и VEGF у инфламираној слузници колона код оболелих од улцерозног колитиса. Испитаници са улцерозним колитисом су класификовани у две групе, на основу позитивне ($>10\%$ позитивних ћелија) или негативне ($\leq 10\%$ позитивних ћелија) експресије p16, p53 и VEGF (184, 185). У анализу експресије p16 и p53 у ћелијама, узета је у обзир само браон пребојеност једра. Експресија VEGF је анализирана само у цитоплазми ћелије. У табели 4, приказана је корелација клиничко патолошких карактеристика болести са позитивном експресијом маркера p16 (n=14), p53 (n=3) и VEGF (n=9). Затим су анализиране патохистолошке карактеристике циљаног ткива (хистолошки градус) као и клиничке карактеристике болести (активност болести, постојање екстраинтестиналних манифестација и компликација болести), у свакој од ново дефинисаних група. Није забележена значајна повезаност експресије p16, p53 и VEGF са клиничким параметрима болести. Показана је значајна повезаност експресије p16 и VEGF са хистолошким параметрима болести. Код испитаника са хистолошким градусом III уочена је позитивна експресија p16, као и позитивна експресија VEGF.

Табела 4. Клиничко патолошке карактеристике и експресија p16, p53 и VEGF код испитаника са улцерозним колитисом

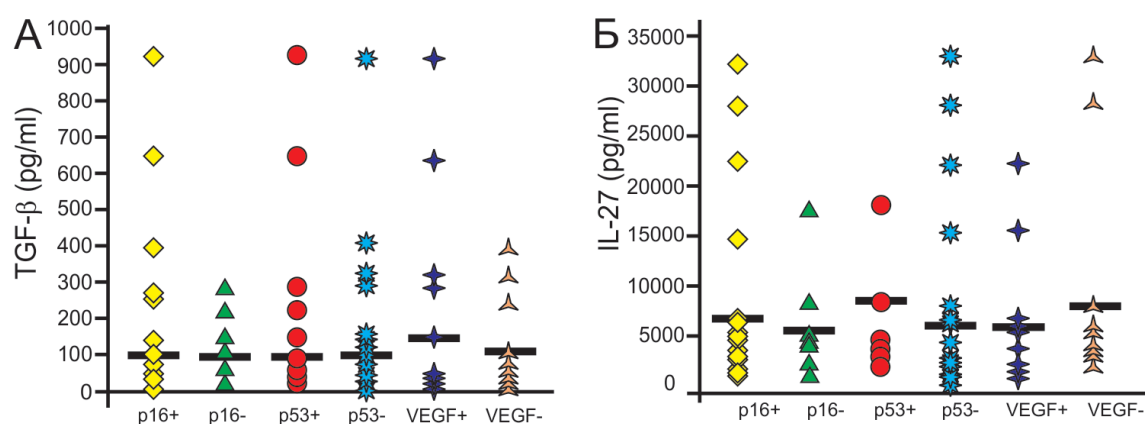
	p16 ⁺ n=14/24 (%)	p16 ⁻ n=10/24 (%)	p53 ⁺ n=3/24 (%)	p53 ⁻ n=21/24 (%)	VEGF ⁺ n=9/24 (%)	VEGF ⁻ n=15/24 (%)
Активност болести						
блага	12,50	20,83	8,33	25,00	8,33	25,00
умерена	37,50	20,83	4,16	54,16	25,00	33,33
тешка	8,33	0,00	0,00	8,33	4,17	4,17
р	0,49		0,306		0,29	
Хистолошки градус						
I	4,17	8,33	4,17	8,33	4,17	8,33
II	12,50	20,83	4,17	29,16	29,17	4,17
III	41,67	12,50	4,17	50,00	29,17	25,00
р	0,026*		0,543		0,034*	
Екстраинтестиналне манифестације						
+	12,50	0,00	0,00	12,50	8,33	4,17
-	45,83	41,67	12,50	75,00	29,17	58,33
р	0,34		0,79		0,543	
Компликације						
+	29,17	12,50	4,17	37,50	20,83	20,83
-	29,17	29,17	8,33	50,00	16,67	41,67
р	0,60		0,312		0,569	

Анализа обухвата 24 испитаника са улцерозним колитисом који су класификовани у две групе, на основу позитивне или негативне експресије за p16: p16⁺ (14) и p16⁻ (10), p53: p53⁺ (3) и p53⁻ (21) и VEGF: VEGF⁺ (9) и VEGF⁻ (15). Анализирана је активност болести (блага, умерено-тешка и тешка), хистолошки градус (I, II и III), постојање екстраинтестиналних манифестација и компликација болести (са "+" и без "-"), у односу са експресију p16, p53 и VEGF. Статистичка значајност је тестирана Kruskal-Vallis-овим тестом.

4.1.4. Нивои цитокина у серуму испитаника са улцерозним колитисом и експресија p16, p53 и VEGF у инфламираној слузници колона

У следећем кораку испитана је корелација серумских нивоа анализираних цитокина са експресијом p16, p53 и VEGF у циљаном ткиву. Код испитаника са улцерозним колитисом који су претходно класификовани у две групе, на основу позитивне и негативне експресије појединачних маркера p16, p53 и VEGF анализине су системске вредности цитокина (TNF- α , TGF- β , IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, IL-27 и IFN- γ).

Није нађена статистички значајна разлика у концентрацији TGF- β (Фигура 2А), IL-27 (Фигура 2Б), IL-17 (Фигура 3В) и IFN- γ (Фигура 3Г) у серуму испитаника са улцерозним колитисом, у односу на експресију p16, p53 и VEGF у инфламираној слузници колона.



Фигура 2. Концентрације TGF- β и IL-27 у серуму испитаника са улцерозним колитисом у односу на експресију p16, p53 и VEGF у инфламираној слузници колона.

Серумски нивои TGF- β и IL-27 испитаника са улцерозним колитисом одређивани су ELISA тестом. Експресија p16, p53 и VEGF инфламиране слузнице колона, одређивана је имунохистохемијском методом. Испитаници су разврстани у две групе за сваки маркер на основу позитивног или негативног имунохистохемијског бојења (позитивна и негативна експресија).

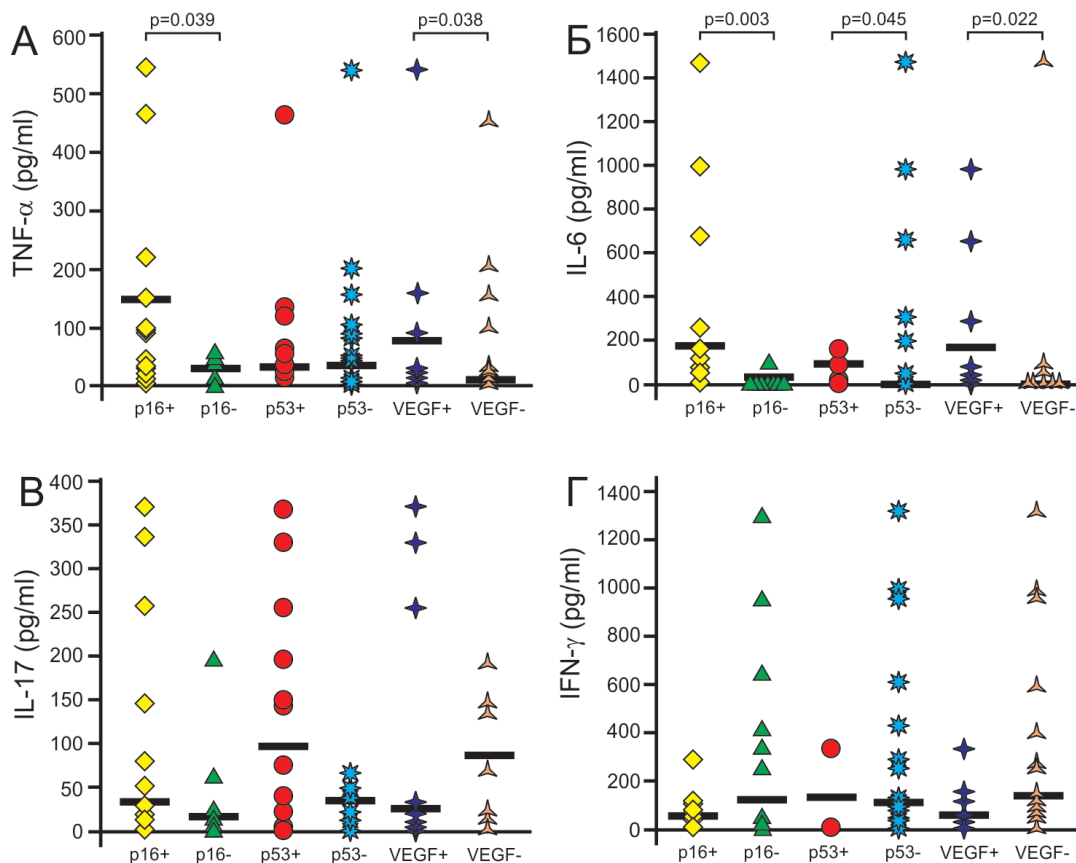
2А: Не постоји статистички значајна разлика серумских концентрација TGF- β у односу на експресију p16 (99,98 vs. 98,89 pg/ml), p53 (100,00 vs. 110,0 pg/ml) и VEGF (125,59 vs. 102,00 pg/ml).

2Б: Не постоји статистички значајна разлика серумских концентрација IL-27 у односу на експресију p16 (6225,00 vs. 5080,00 pg/ml), p53 (9075,00 vs. 5090,00 pg/ml) и VEGF (5079,00 vs. 8980,00 pg/ml).

Приказане вредности су медијане и представљене су *scatter* дијаграмом.

Статистичка значајност одређивана је Mann-Whitney-евим тестом.

У групи испитаника са позитивном експресијом p16 (178,73 vs. 28,32 pg/ml, $p=0,039$) и VEGF (89,56 vs. 18,34 pg/ml, $p=0,038$) у циљаном ткиву измерене су значајно више вредности TNF- α у серуму (Фигура 3А). Статистички значајно више вредности IL-6 су измерене у серуму испитаника са позитивном експресијом p16 (198,98 vs. 20,43 pg/ml, $p=0,003$), p53 (165,78 vs. 2,50 pg/ml, $p=0,045$) и VEGF (190,00 vs. 1,98 pg/ml, $p=0,022$) у инфламираној слузници колона (Фигура 3Б).



Фигура 3. Концентрације TNF- α , IL-6, IL-17 и IFN- γ у серуму испитаника са улцерозним колитисом у односу на експресију p16, p53 и VEGF у инфламираној слузници колона. Серумски нивои TNF- α , IL-6, IL-17 и IFN- γ испитаника са улцерозним колитисом одређивани су ELISA тестом. Експресија p16, p53 и VEGF у инфламираној слузници колона, одређивана је имунохистохемијском методом. Испитаници су сврстани у две групе за сваки маркер на основу позитивног или негативног имунохистохемијског бојења (позитивна и негативна експресија).

3А: Серумске концентрације TNF- α су значајно више у групи испитаника са позитивном експресијом p16 (178,73 vs. 28,32 pg/ml, $p=0,039$) и VEGF (89,56 vs. 18,34 pg/ml, $p=0,038$). Не постоји статистички значајна разлика серумске концентрације TNF- α у односу на експресију p53 (29,80 vs. 30,20 pg/ml).

3Б: У серуму испитаника са позитивном експресијом p16 (198,98 vs. 20,43 pg/ml, $p=0,003$), p53 (165,78 vs. 2,50 pg/ml, $p=0,045$) и VEGF (190,00 vs. 1,98 pg/ml, $p=0,022$), измерене су статистички значајно више вредности IL-6.

3В: Не постоји статистички значајна разлика серумских концентрација IL-17 у односу на експресију p16 (38,98 vs. 28,89 pg/ml), p53 (98,00 vs. 46,00 pg/ml) и VEGF (37,59 vs. 89,00 pg/ml).

3Г: Не постоји статистички значајна разлика серумских концентрација IFN- γ у односу на експресију p16 (50,98 vs. 99,89 pg/ml), p53 (103,00 vs. 96,00 pg/ml) и VEGF (54,59 vs. 106,00 pg/ml).

Приказане вредности су медијане и представљене су scatter дијаграмом.

Статистичка значајност одређивана је Mann-Whitney-евим тестом.

4.1.5. Концентрације цитокина у серуму и њихова корелација са екстраинтестиналним манифестацијама улцерозног колитиса

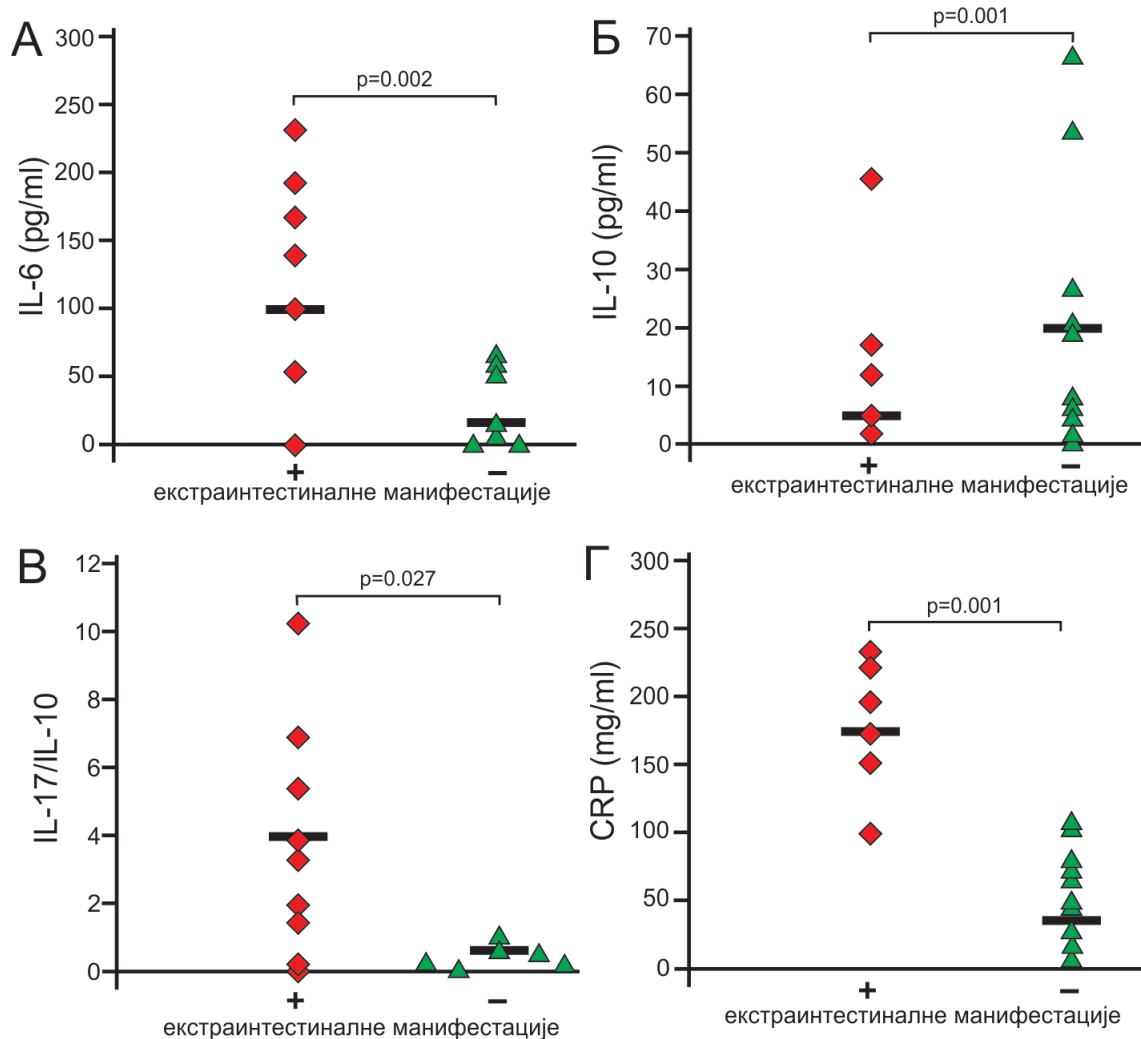
Испитаници са улцерозним колитисом затим су даље сврстани у групу са дијагностикованим екстраинтестиналним манифестацијама (анемијом, коштанозглобним и кожним променама) која је означена са "+" и у групу без наведених екстраинтестиналних манифестација означену са "-" (62). Анализиране су серумске вредности проинфламаторних (TNF- α , IL-4, IL-6, IL-17, IL-27 и IFN- γ) и антиинфламаторних цитокина (TGF- β и IL-10), односи контррегулаторних цитокина (IFN- γ /IL4, IFN- γ /TGF- β , IFN- γ /IL-10, IL-17/IL-10, IL-6/TGF- β , IL-27/IL-17 и IL-17/TGF- β), као и вредности туморских маркера CEA и CA 19-9 у обе групе. Поређењем серумских нивоа TNF- α , TGF- β , IL-4, IL-17 и IL-27 није детектована статистички значајна разлика између група испитаника у односу на постојање екстраинтестиналних манифестација (Табела 5).

Табела 5. Концентрације испитиваних цитокина у серуму испитаника са улцерозним колитисом у односу на постојање екстраинтестиналних манифестација

Концентрације цитокина (pg/ml)	Екстраинтестиналне манифестације (медијана, минимум-максимум)		p
	+	-	
TNF- α	78,12 (0,00-216,48)	33,16 (0,07-547,17)	p>0,05
TGF- β	113,66 (4,39-157,81)	78,08 (11,62-323,41)	p >0,05
IL-4	4,08 (0,08-18,54)	14,36 (0,00-77,00)	p >0,05
IL-6	67,63 (0,0-1470,03)	0,00 (0,00-1003,64)	p=0,002
IL-10	4,8 (2,05-44,28)	14,87 (0,22-61,67)	p=0,001
IL-17	23,41 (0,00-53,22)	28,26 (0,00-88,49)	p >0,05
IL-27	3520,40 (914,63-6531,35)	4886,73 (2001,77-8587,57)	p >0,05

Анализа обухвата 24 испитаника са улцерозним колитисом, који су сврстани у две групе: са екстраинтестиналним манифестацијама ("+") (n=8) и без екстраинтестиналних манифестација ("-") (n=16) болести. Анализиране су серумске концентрације испитиваних цитокина и упоређиване између наведених група испитаника. Статистичка значајност је тестирана Mann-Whitney-евим тестом.

Забележена је статистички значајна позитивна корелација између серумских нивоа IL-6 (Фигура 4А) као и CRP-а (Фигура 4Г) и постојања екстраинтестиналних манифестација. Другим речима забележен је значајан пораст концентрације проинфламаторних медијатора IL-6 и CRP-а у серуму оболелих са екстраинтестиналним манифестацијама. Уз то, регистрована је статистички значајна позитивна корелација односа IL-17/IL-10 (Фигура 4В) и присуства екстраинтестиналних манифестација. Концентрација антиинфламаторног IL-10 је статистички значајно виша у серуму оболелих који немају екстраинтестиналне манифестације (Фигура 4Б).



Фигура 4. Серумски нивои IL-6, IL-10, CRP-а и однос контррегулаторних цитокина IL-17/IL-10 у односу на постојање екстраинтестиналних манифестација. Серумски нивои цитокина одређивани су ELISA тестом. Серумске концентрације CRP-а одређиване се турбодиметријском методом. Анализиран је и однос серумских вредности контррегулаторних цитокина.

4А: Статистички значајно више вредности IL-6 су измерене у серуму испитаника са дијагностикованим екстраинтестиналним манифестацијама, у односу на испитанике без екстраинтестиналних манифестација (98,00 vs. 18,45 pg/ml, $p=0,002$).

4Б: Забележене су значајно ниже концентрације IL-10 у серуму испитаника без екстраинтестиналних манифестација, у поређењу са испитаницима са екстраинтестиналним манифестацијама (4,80 vs. 20,00 pg/ml, $p=0,001$).

4В: Статистички значајно веће вредности количника IL-17/IL-10 су измерене у групи испитаника са екстраинтестиналним манифестацијама, у односу на испитанике без екстраинтестиналних манифестација (3,78 vs. 0,72, $p=0,027$).

4Г: Серумске концентрације CRP су значајно више код испитаника са екстраинтестиналним манифестацијама (176,7 vs. 36,95 mg/ml, $p=0,001$).

Приказане вредности су медијане и представљене су scatter дијаграмом.

Статистичка значајност одређивана је Mann-Whitney-евим тестом.

Као што се види на табели 6, у нашој студији није забележена статистички значајна разлика односа серумских вредности контрарегулаторних цитокина IFN- γ /TGF- β , IFN- γ /IL-10, IL-6/TGF- β и IL-17/TGF- β између дефинисаних група. Поређењем серумских вредности туморских маркера СЕА и СА 19-9 између група испитаника, нису утврђене значајне разлике (Табела 7).

Табела 6. Однос контрарегулаторних цитокина у серуму испитаника са улцерозним колитисом у односу на екстраинтестиналне манифестације

Односи цитокина	Екстраинтестиналне манифестације (медијана, минимум-максимум)		p
	+	-	
IFN- γ /TGF- β	0,73 (0,10-1,71)	0,63 (0,025-3,79)	p>0,05
IFN- γ /IL-10	1,87 (0,62-21,35)	2,36 (0,14-55,30)	p>0,05
IL-17/IL-10	3,78 (0,00-1,17)	0,72 (0,0-10,15)	p=0,027
IL-6/TGF- β	2,46 (0,0-8,51)	1,22 (0,09-9,70)	p>0,05
IL-17/TGF- β	0,15 (0,0-0,53)	0,41 (0,0-0,98)	p>0,05

Анализа обухвата 24 испитаника са улцерозним колитисом, који су сврстани у две групе: са екстраинтестиналним манифестацијама ("+") (n=8) и без екстраинтестиналних манифестација ("-") (n=16) болести. Анализирани су односи серумских концентрација контрарегулаторних цитокина и упоређивани између наведених група испитаника. Статистичка значајност је тестирана Mann-Whitney-евим тестом.

Табела 7. Концентрације туморских маркера у серуму испитаника са улцерозним колитисом у односу на екстраинтестиналне манифестације.

Туморски маркери (U/ml)	Екстраинтестиналне манифестације (медијана, минимум-максимум)		p
	+	-	
СЕА	1,39 (0,23-4,61)	2,60 (0,23-6,20)	p>0,05
СА 19-9	3,76 (0,94-4,13)	4,30 (0,96-137,34)	p>0,05

Анализа обухвата 24 испитаника са улцерозним колитисом, који су сврстани у две групе: са екстраинтестиналним манифестацијама ("+") (n=8) и без екстраинтестиналних манифестација ("-") (n=16) болести. Анализиране су системске вредности туморских маркера и упоређиване између наведених група испитаника. Статистичка значајност је тестирана Mann-Whitney-евим тестом.

4.1.6. Концентрације цитокина у серуму и односи серумских вредности контрарегулаторних цитокина у односу на постојање компликација улцерозног колитиса

Испитаници са улцерозним колитисом су даље категорисани у групу са компликацијама као што су стриктуре, псеудополипи и диспластичне лезије слузнице (ова група је означена са "+") и у групу без наведених компликација (са ознаком "-") (35, 56). Анализиране су системске вредности нивоа цитокина (TNF- α , TGF- β , IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, IL-27 и IFN- γ), односи серумских вредности контрарегулаторних цитокина (IFN- γ /IL4, IFN- γ /TGF- β , IFN- γ /IL-10, IL-17/IL-10, IL-6/TGF- β , IL-27/IL-17 и IL-17/TGF- β), вредности маркера инфламације CRP-а и туморских маркера СЕА и СА 19-9 у те две групе.

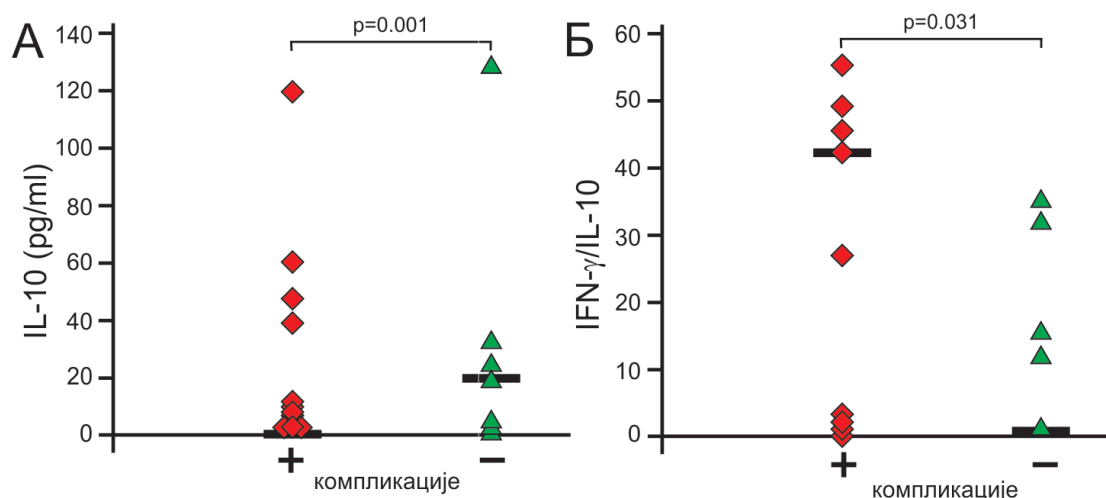
Нису забележене статистички значајне разлике у серумским нивоима TNF- α , TGF- β , IL-4, IL-6, IL-17, IL-27 и IFN- γ између група (Табела 8).

Табела 8. Концентрације TNF- α , TGF- β , IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, IL-27 и IFN- γ у серуму испитаника са улцерозним колитисом у односу на компликације болести

Концентрације цитокина (pg/ml)	Компликације (медијана, минимум-максимум)		p
	+	-	
TNF- α	31,10 (0,00-459,78)	35,67 (0,00-547,17)	p>0,05
TGF- β	103,89 (4,39-406,66)	78,08 (11,62-323,41)	p>0,05
IL-4	7,52 (0,00-24,34)	10,19 (0,00-77,00)	p>0,05
IL-6	62,05 (0,00-1470,03)	54,43 (0,00-1003,64)	p>0,05
IL-10	1,15 (0,00-119,55)	15,12 (0,00-126,35)	p=0,001
IL-17	22,40 (0,0-377,84)	33,36 (0,00-340,74)	p>0,05
IL-27	6497,90 (914,63-22160,39)	4798,82 (1318,00-8587,57)	p>0,05
IFN- γ	99,34 (7,55-1274,95)	66,15 (7,34-948,81)	p>0,05

Анализа обухвата 24 испитаника са улцерозним колитисом, који су сврстани у две групе: са компликацијама ("+") (n=6) и без компликација ("-") (n=18) болести. Анализиране су системске вредности цитокина и упоређиване између испитаника са и без екстраинтестиналних манифестација. Статистичка значајност је тестирана Mann-Whitney-евим тестом.

У групи испитаника са компликацијама болести системска вредност IL-10 је значајно нижа, док је количник IFN- γ /IL-10 значајно већи у односу на групу испитаника без компликација (Фигура 5А и 5Б).



Фигура 5. Концентрација IL-10 у серуму и однос IFN- γ /IL-10 код испитаника са улцерозним колитисом у односу на постојање компликација. Серумски нивои цитокина код испитаника, одређивани су ELISA тестом. Анализирани су и односи серумских вредности контрарегулаторних цитокина.

5А: Статистички значајно ниже системске вредности IL-10 су измерене код испитаника са постојањем компликација болести (1,15 vs. 20,12 pg/ml, $p=0,001$).

5Б: Показана је статистички значајна позитивна корелација односа IFN- γ /IL-10 и постојања компликација болести (20,75 vs. 1,63, $p=0,031$).

Приказане вредности су медијане и представљене су *scatter* дијаграмом.

Статистичка значајност одређивана је Mann-Whitney-евим тестом.

Нису утврђене статистички значајне разлике у односима серумских вредности контрарегулаторних цитокина IFN- γ /IL4, IFN- γ /TGF- β , IL-17/IL-10, IL-6/TGF- β , IL-27/IL-17 и IL-17/TGF- β у односу на постојање компликација (Табела 9).

Не постоји значајна разлика у серумским вредностима CRP-а, нити СЕА и СА19-9 између болесника са улцерозним колитисом са компликацијама и без компликација болести (Табела 10).

Табела 9. Односи контрарегулаторних цитокина у серуму испитаника са улцерозним колитисом у односу на постојање компликација

Односи цитокина	Компликације (медијана, минимум-максимум)		p
	+	-	
IFN-γ/IL-4	11,37 (1,04-42,80)	4,9 (0,72-17,64)	p>0,05
IFN-γ/TGF-β	0,95 (0,10-3,13)	0,39 (0,025-5,47)	p>0,05
IFN-γ/IL-10	20,75 (0,62-40,90)	1,63 (0,14-176,52)	p=0,031
IL-17/IL-10	1,22 (0,00-24,19)	3,77 (0,00-14,14)	p>0,05
IL-6/TGF-β	1,16 (0,00-4,82)	0,54 (0,00-9,70)	p>0,05
IL-27/IL-17	51,46 (0,00-679,69)	97,83 (0,00-341,93)	p>0,05
IL-17/TGF-β	0,40 (0,00-0,88)	0,53 (0,00-6,02)	p>0,05

Анализа обухвата 24 испитаника са улцерозним колитисом, који су сврстани у две групе: са компликацијама ("+") (n=6) и без компликација ("-") (n=18) болести. Анализирани су односи серумских концентрација контрарегулаторних цитокина и упоређивани између наведених група испитаника. Статистичка значајност је тестирана Mann-Whitney-евим тестом.

Табела 10. Концентрације туморских маркер у серуму испитаника са улцерозним колитисом у односу на постојање компликација

Туморски маркер (U/ml)	Компликације (медијана, минимум-максимум)		p
	+	-	
СЕА	2,20 (0,5-4,7)	2,80 (0,23-62,00)	p>0,05
СА 19-9	3,87 (81,22-16,2)	4,89 (0,94-137,34)	p>0,05

Анализа обухвата 24 испитаника са улцерозним колитисом, који су сврстани у две групе: са компликацијама ("+") (n=6) и без компликација ("-") (n=18) улцерозног колитиса. Анализиране су системске вредности туморских маркера и упоређиване између наведених група испитаника. Статистичка значајност је тестирана Mann-Whitney-евим тестом.

4.1.7. Концентрације цитокина у серуму и односи контрарегулаторних цитокина у односу на клиничку активност улцерозног колитиса

Са циљем да се испита евентуална повезаност концентрације испитиваних цитокина и односа контрарегулаторних цитокина у серуму са клиничком активношћу болести дефинисане су три нове групе испитаника. Тако према клиничкој активности болести, испитаници са улцерозним колитисом су категорисани у групу: 1) са благом формом; 2) умерено тешком и 3) тешком формом болести (29). Анализиране су системске вредности нивоа цитокина, односи серумских вредности контрарегулаторних цитокина, туморских маркера СЕА и СА 19-9 и маркера инфламације СРР-а у ове три групе испитаника.

Поређењем вредности TNF- α , TGF- β , IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, IL-27 и IFN- γ у серуму испитаника са улцерозним колитисом у односу на степен активности болести, нису регистроване статистички значајне разлике између група (табела 11).

Табела 11. Концентрације TNF- α , TGF- β , IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, IL-27 и IFN- γ у серуму испитаника са улцерозним колитисом у односу на активност болести

Концентрација citoкина (pg/ml)	Активност болести (медијана, минимум-максимум)			p
	блага	умерена	тешка	
TNF-α	34,74 (0,00-216,48)	30,00 (0,00-155,24)	33,08 (0,00-158,89)	p>0,05
TGF-β	78,80 (11,62-238,86)	135,12 (20,72-406,66)	55,62 (4,93-140,06)	p>0,05
IL-4	5,5 (0,00-77,00)	12,5 (0,00-71,97)	0,08 (0,08-20,34)	p>0,05
IL-6	0,00 (0,00-135,26)	0,00 (0,00-1470,03)	16,73 (0,00-243,16)	p>0,05
IL-10	8,50 (0,00-51,44)	5,17 (2,19-119,55)	13,01 (0,00-126,35)	p>0,05
IL-17	35,00 (21,24-198,20)	14,58 (0,00-340,74)	17,76 (0,00-53,02)	p>0,05
IL-27	4554,01 (1318,00-15226,51)	5571,13 (2001,77-7215,34)	6497,91 (914,00-22160,59)	p>0,05
IFN-γ	71,72 (11,88-440,46)	99,68 (7,34-1274,95)	9,43 (7,55-626,36)	p>0,05

Анализа обухвата 24 испитаника са улцерозним колитисом, који су према клиничкој активности болести сврстани у три групе: са благом формом (n=5), умерено тешком (n=14) и тешком формом болести (n=5). Анализиране су серумске концентрације испитиваних citoкина и упоређиване између три групе испитаника. Статистичка значајност је тестирана Wilcoxon-овим тестом.

Анализом односа контрарегулаторних цитокина IFN- γ /IL4, IFN- γ /TGF- β , IFN- γ /IL-10, IL-17/IL-10, IL-6/TGF- β , IL-27/IL-17 и IL-17/TGF- β у односу на степен клиничке активности болести, није регистрована статистички значајна корелација односа серумских вредности контрарегулаторних цитокина и активности болести (Табела 12).

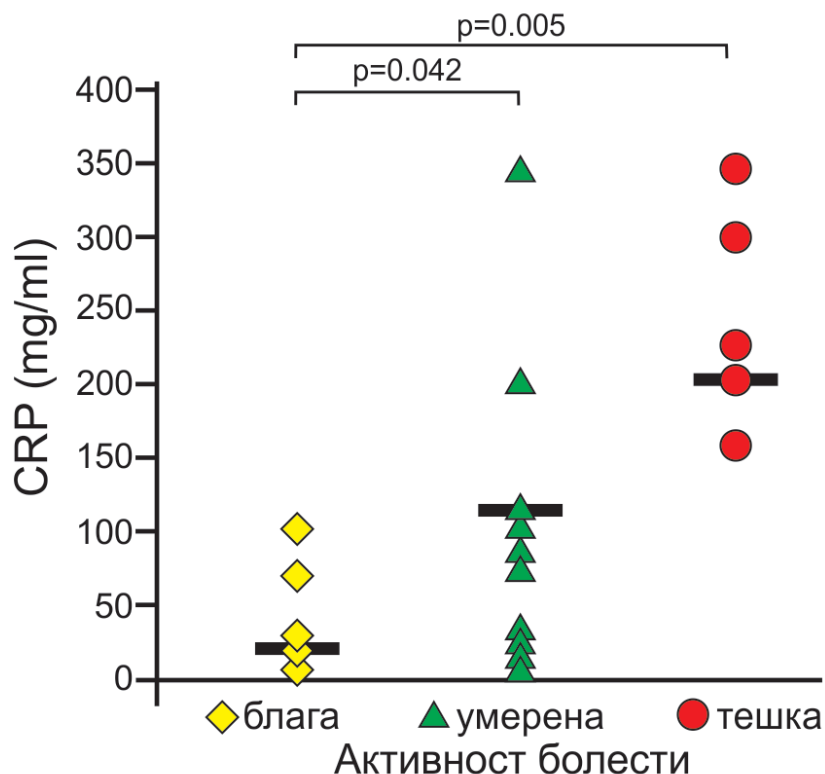
Анализом вредности СЕА и СА 19-9 у серуму испитаника са улцерозним колитисом са различитим степеном активности болести, нису забележене статистички значајне разлике (резултати нису приказани).

Табела 12. Односи контрарегулаторних цитокина у серуму испитаника са улцерозним колитисом у односу на активност болести

Односи цитокина	Активност болести (медијана, минимум-максимум)			p
	блага	умерена	тешка	
IFN- γ /IL-4	7,98 (3,98-25,76)	1,53 (5,64-130,00)	108,08 (0,72-102,40)	p>0,05
IFN- γ /TGF- β	1,52 (0,12-5,46)	0,76 (0,02-16,77)	0,98 (0,91-11,26)	p>0,05
IFN- γ /IL-10	14,80 (0,90-15,80)	5,00 (0,14-55,30)	2,30 (0,62-4,5)	p>0,05
IL-17/IL-10	3,90 (1,27-14,14)	0,19 (0,00-10,15)	1,20 (0,00-24,19)	p>0,05
IL-6/TGF- β	0,09 (0,00-4,68)	0,04 (0,00-9,70)	0,30 (0,00-1,73)	p>0,05
IL-27/IL-17	110,108 (17,59-679,69)	75,34 (0,00-529,29)	192,22 (0,00-417,93)	p>0,05
IL-17/TGF- β	0,82 (0,11-2,43)	1,20 (0,00-74,25)	0,20 (0,00-202,00)	p>0,05

Анализа обухвата 24 испитаника са улцерозним колитисом, који су према клиничкој активности болести сврстани у три групе: са благом формом (n=5), умерено-тешком (n=14) и тешком формом болести (n=5). Анализирани су односи системских вредности контрарегулаторних цитокина и упоређивани између наведене три групе испитаника. Статистичка значајност је тестирана Wilcoxon-овим тестом.

Поред СЕА и СА 19-9, анализирана је вредност CRP, протеина акутне фазе запаљења у серуму оболелих са различитим степеном активности улцерозног колитиса. Показана је статистички значајна позитивна корелација серумских вредности CRP-а и клиничке активности болести. Концентрација CRP је значајно виша у серуму испитаника са тешком формом болести у односу на благу. Ако се пак пореди концентрација CRP у серуму испитаника са умереном и благом формом болести, региструје се значајан пораст концентрације CRP код испитаника са умереном формом болести. Не постоји статистички значајна разлика у концентрацији овог протеина акутног запаљења у серуму испитаника са тешком и умереном формом болести (Фигура 6А).



Фигура 6. Серумски нивои CRP код испитаника са улцерозним колитисом у односу на активност болести. Серумски ниво CRP одређиван је турбидиметријском методом. Серумске концентрације CRP су статистички значајно више код испитаника са тешком формом болести у односу на благу (210,00 vs. 32,00 mg/ml, $p=0,005$) и код испитаника са умереном болешћу у односу на благу (108,00 vs. 32,00 mg/ml, $p=0,042$). Не постоји статистички значајна разлика серумских концентрација CRP испитаника са тешком и умереном болешћу (210,00 vs. 108,00 mg/ml). Приказане вредности су медијане и представљене су *scatter* дијаграмом. Статистичка значајност одређивана је Mann-Whitney-евим тестом.

4.1.8. Концентрације цитокина у серуму и односи контрарегулаторних цитокина код испитаника са улцерозним колитисом у односу на степен хистолошких промена слузнице колона

У наредном кораку анализирани су концентрације испитиваних цитокина, туморских маркера СЕА и СА 19-9 и маркера инфламације, СРР у серуму испитаника са различитим степеном хистолошких промена у запаљенским лезијама слузнице колона. Тако испитаници са улцерозним колитисом су сврстани у три групе према степену хистолошких промена инфламиране слузнице колона: 1) хистолошки градус I (присуство архитектонских промена, жаришта лимфоцита, без криптних апсцеса и епителне деструкције), 2) хистолошки градус II (са запаљењем, едемом, повећаном васкуларношћу и повећаним бројем запаљенских ћелија у акутним и хроничним лезијама) и 3) хистолошки градус III (присуство инфилтрата запаљенских ћелија у акутним и хроничним лезијама, криптних апсцеса, улцерација површинског епитела и пурулентног ексудата) (32). Вредности TGF- β , IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, IL-27 и IFN- γ у серуму испитаника са улцерозним колитисом се значајно не разликују између група са различитим хистолошким градусом (табела 13).

Табела 13. Концентрације TNF- α , TGF- β , IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, IL-27 и IFN- γ у серуму испитаника са улцерозним колитисом у односу на степен хистолошких промена слузнице колона

Концентрације цитокина (pg/ml)	Степен хистолошких промена (медијана, минимум-максимум)			p
	I	II	III	
TNF-α	1,00 (0,00-71,26)	38,00 (0,07-55,70)	49,00 (0,00-216,48)	p=0,003
TGF-β	91,56 (75,27-283,86)	119,35 (11,62-933,87)	97,79 (4,39-932,51)	p>0,05
IL-4	1,08 (0,00-14,35)	14,37 (0,00-77,00)	2,78 (0,00-71,97)	p>0,05
IL-6	0,00 (0,00-60,00)	5,76 (0,00-93,36)	0,00 (0,00-243,16)	p>0,05
IL-10	0,12 (0,06-36,90)	16,17 (0,00-126,35)	5,28 (0,00-119,55)	p>0,05
IL-17	37,68 (32,24-139,45)	28,26 (0,00-377,84)	29,93 (0,00-935,17)	p>0,05
IL-27	4148,5 (3670,36-8587,57)	4968,04 (1318,00-8586,59)	6414,82 (914,63-22160,59)	p>0,05
IFN-γ	71,37 (11,88-77,24)	120,87 (18,40-929,79)	71,72 (7,34-1274,95)	p>0,05

Анализа обухвата 24 испитаника са улцерозним колитисом који су сврстани у три групе према степену хистолошких промена инфламиране слузнице колона: 1) хистолошки градус I (n=7), 2) хистолошки градус II (n=14) и 3) хистолошки градус III (n=3). Анализирани су серумске концентрације испитиваних цитокина и упоређиване између наведене три групе испитаника. Статистичка значајност је тестирана Wilcoxon-овим тестом.

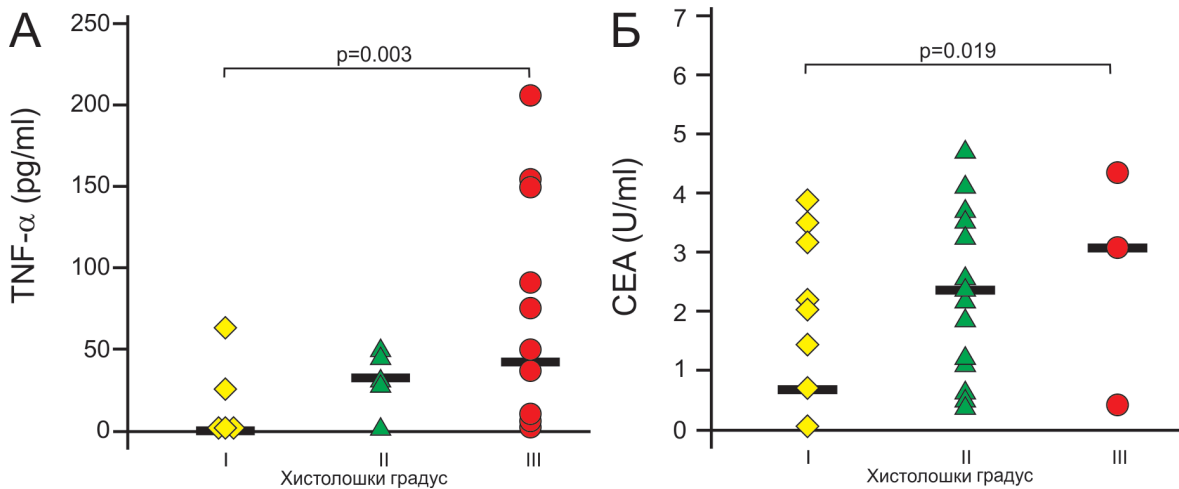
Анализом односа контрарегулаторних цитокина IFN- γ /IL4, IFN- γ /TGF- β , IFN- γ /IL-10, IL-17/IL-10, IL-6/TGF- β , IL-27/IL-17 и IL-17/TGF- β у односу на степен хистолошких промена инфламиране слузнице колона, није нађена статистички значајна разлика између претходно дефинисаних група испитаника (Табела 14). Ни системске вредности CRP-а и СА 19-9 се значајно не разликују између група са различитим хистолошким градусом циљаног ткива колона (резултати нису приказани).

Табела 14. Односи контрарегулаторних цитокина у серуму испитаника са улцерозним колитисом у односу на степен хистолошких промена

Односи цитокина	Степен хистолошких промена (медијана, минимум-максимум)			p
	I	II	III	
IFN- γ /IL-4	6,46 (4,97-7,98)	6,27 (1,28-17,64)	5,86 (0,72-72,27)	p>0,05
IFN- γ /TGF- β	0,27 (0,12-0,98)	1,36 (0,11-5,46)	0,77 (0,02-3,13)	p>0,05
IFN- γ /IL-10	170,98 (1,93-176,52)	2,80 (1,47-50,00)	18,70 (0,62-55,30)	p>0,05
IL-17/IL-10	285,77 (59,00-300,00)	2,43 (0,11-83,04)	1,72 (0,00-24,19)	p>0,05
IL-6/TGF- β	1,50 (0,00-2,00)	0,09 (0,00-0,70)	0,00 (0,00-9,70)	p>0,05
IL-27/IL-17	110,11 (26,31-266,30)	103,59 (0,00-303,78)	104,40 (0,00-679,69)	p>0,05
IL-17/TGF- β	0,41 (0,11-1,85)	0,68 (0,00-2,43)	0,33 (0,00-7,17)	p>0,05

Анализа обухвата 24 испитаника са улцерозним колитисом који су су сврстани у три групе према степену хистолошких промена инфламиране слузнице колона: 1) хистолошки градус I (n=7), 2) хистолошки градус II (n=14) и 3) хистолошки градус III (n=3). Анализирани су односи системских вредности контрарегулаторних цитокина и упоређивани између наведене три групе испитаника. Статистичка значајност је тестирана Wilcoxon-овим тестом.

На фигури 7А и 7Б, уочава се да су концентрације TNF- α и CEA статистички значајно више у серуму испитаника са хистолошким градусом III у односу на испитанике са хистолошким градусом I.



Фигура 7. Серумски нивои TNF- α и CEA код испитаника са улцерозним колитисом у односу на степен хистолошких промена инфламиране слузнице колона. Серумски нивои цитокина одређивани су ELISA тестом. Серумске концентрације CEA одређиване су методом хемилуминисценције.

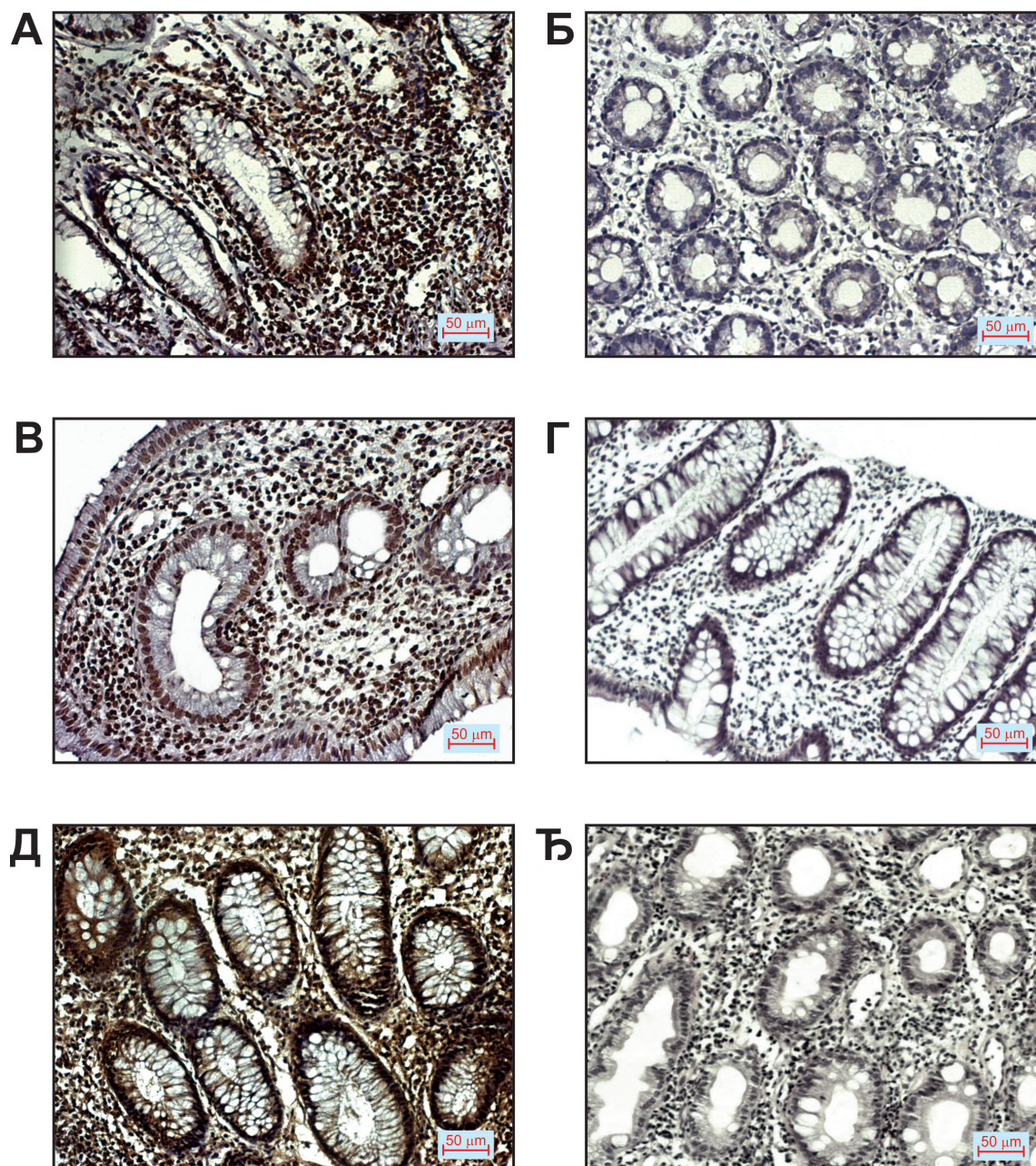
7А: Серумска концентрација TNF- α је статистички значајно виша код испитаника са хистолошким градусом III инфламиране слузнице колона у односу на испитанике са хистолошким градусом I (49,00 vs. 1,00 pg/ml, $p=0,003$). Не постоји статистички значајна разлика концентрација TNF- α у серуму испитаника са хистолошким градусом I у односу на II (1,00 vs. 38,00 pg/ml) и са хистолошким градусом II у односу на III (38,00 vs. 49,00 pg/ml).

7Б: Серумске концентрације CEA су значајно више у групи испитаника са хистолошким градусом III у односу на испитанике са хистолошким градусом I (3,23 vs. 0,50 U/ml, $p=0,019$). Не постоји статистички значајна разлика концентрација CEA у серуму испитаника са хистолошким градусом I у односу на II (0,50 vs. 2,49 U/ml) и са хистолошким градусом II у односу на III (2,49 vs. 3,23 U/ml).

Приказане вредности су медијане и представљене су *scatter* дијаграмом.

Статистичка значајност одређивана је Wilcoxon-овим тестом.

Позитивна и негативна експресија p16, p53 и VEGF у инфламираној слузници колона код испитаника са улцерозним колитисом је приказана на фигури 8.



Фигура 8. p16, p53 и VEGF експресија код испитаника са улцерозним колитисом.
Позитивна експресија p16, p53 и VEGF (Панели -А, -В и -Д);
Негативна експресија p16, p53 и VEGF (Панели -Б, -Г и -Љ) (увеличање 200х).

Серумски нивои цитокина и експресија p16, p53 и VEGF код испитаника са улцерозним колитисом и Кроновом болешћу

4.2.1. Концентрације цитокина у серуму и односи контрарегулаторних цитокина код испитаника са улцерозним колитисом и Кроновом болешћу

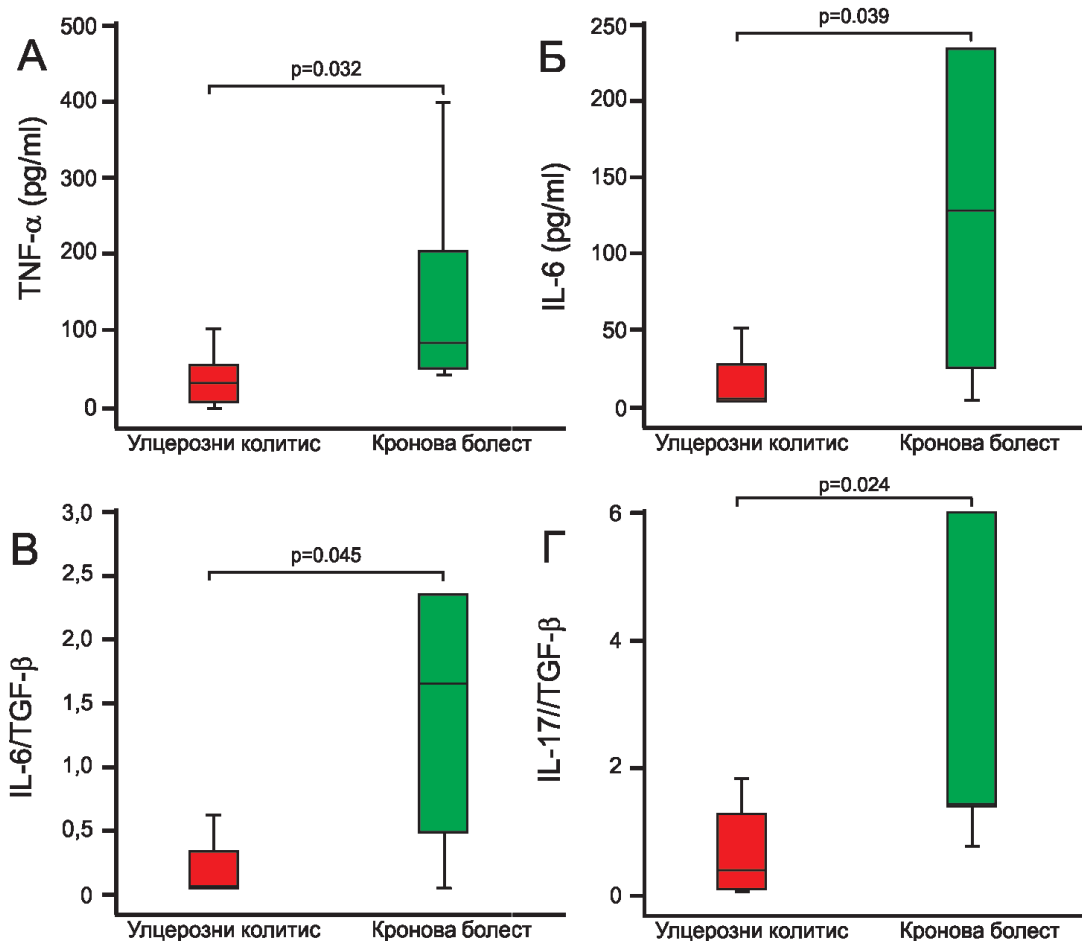
У наредном кораку истраживања упоређиване су серумске концентрације цитокина између испитаника са улцерозним колитисом (n=25) и Кроновом болешћу (n=5). На табели 15 уочава се да није забележена значајна разлика у серумским нивоима TGF- β , IL-4, IL-10, IL-17, IL-27 и IFN- γ између обе испитиване групе.

Табела 15. Концентрације анализираних цитокина у серуму испитаника са улцерозним колитисом и Кроновом болешћу

Концентрације цитокина (pg/ml)	Улцерозни колитис (медијана, минимум-максимум)	Кронова болест (медијана, минимум-максимум)	p
TNF-α	33,00 (0,00-547,12)	158,91 (31,12-459,73)	p=0,032
TGF-β	92,20 (4,93-933,81)	89,65 (54,83-140,01)	p>0,05
IL-4	7,90 (0,00-77,00)	5,98 (0,00-24,32)	p>0,05
IL-6	0,00 (0,00-1470,32)	135,26 (0,00-1003,61)	p=0,039
IL-10	5,70 (0,00-126,31)	2,19 (0,00-119,54)	p>0,05
IL-17	32,20 (0,00-4021,33)	88,5 (29,01-3608,11)	p>0,05
IL-27	6332,6 (914,63-71038,55)	17546,39 (2486,88-58204,43)	p>0,05
IFN-γ	71,70 (7,34-1274,92)	46,31 (13,11-626,33)	p>0,05

Анализа обухвата испитанике са улцерозним колитисом (n=24) и Кроновом болешћу (n=5). Анализиране су системске концентрације испитиваних цитокина и упоређиване између оболелих од улцерозног колитиса и Кронове болести. Статистичка значајност је тестирана Mann-Whitney-евим тестом.

На фигури 9 резултати јасно показују да су концентрације TNF- α (158,91 vs. 31,22 pg/ml, $p=0,032$) (Панел А) и IL-6 (135,26 vs. 0,00 pg/ml, $p=0,039$) (Панел Б) значајно више у серуму испитаника са Кроновом болешћу у односу на испитанике са улцерозним колитисом. Даљом анализом, забележене су и значајно веће вредности количника серумских нивоа котрарегулаторних цитокина IL-6/TGF- β (Фигура 9В) и IL-17/TGF- β (Фигура 9Г) код испитаника са Кроновом болешћу, у односу на испитанике са улцерозним колитисом.



Фигура 9. Серумске концентрације TNF- α и IL-6 и односи котрарегулаторних цитокина IL-6/TGF- β и IL-17/TGF- β код испитаника са улцерозним колитисом и Кроновом болешћу. Серумски нивои цитокина код испитаника са улцерозним колитисом (n=24) и Кроновом болешћу (n=5) одређивани су ELISA тестом. Анализирани су и односи серумских вредности котрарегулаторних цитокина.

9А: Нађене су значајно више концентрације TNF- α у серуму испитаника са Кроновом болешћу (158,91 vs. 31,22 pg/ml, $p=0,032$).

9Б: Значајно више концентрације IL-6 су измерене у серуму испитаника са Кроновом болешћу (135,26 vs. 0,00 pg/ml, $p=0,039$).

9В: Статистички значајно веће вредности односа серумских концентрација IL-6/TGF- β су измерене код испитаника са Кроновом болешћу (1,73 vs. 0,00, $p=0,045$).

9Г: Односи серумских вредности IL-17/TGF- β су статистички значајно већи код испитаника са Кроновом болешћу (0,98 vs. 0,31, $p=0,024$).

Резултати су представљени као медијане и перцентили [median (percentiles 25th-75th)]. Статистичка значајност је тестирана Mann-Whitney-евим тестом.

Када су пак упоређени односи серумских вредности других контрарегулаторних цитокина IFN- γ /IL4, IFN- γ /TGF- β , IFN- γ /IL-10, IL-17/IL-10 и IL-27/IL-17 нису забележене статистички значајне разлике између испитаника са улцерозним колитисом и Кроновом болешћу (Табела 16). У нашој студији нема ни значајне разлике у системским вредности CRP, CEA и СА 19-9 између обе испитиване групе (Табела 17).

Табела 16. Односи контрарегулаторних цитокина у серуму испитаника са улцерозним колитисом и Кроновом болешћу

Односи цитокина	Улцерозни колитис (медијана, минимум- максимум)	Кронова болест (медијана, минимум- максимум)	p
IFN- γ /IL-4	6,74 (0,72-108,08)	6,91 (5,64-42,80)	p>0,05
IFN- γ /TGF- β	0,08 (0,02-16,77)	0,50 (0,98-11,26)	p>0,05
IFN- γ /IL-10	4,09 (0,14-650,41)	3,80 (0,90-285,75)	p>0,05
IL-17/IL-10	1,74 (0,00-1198,31)	10,98 (1,72-24,19)	p>0,05
IL-6/TGF- β	0,00 (0,00-4,82)	1,73 (0,00-9,70)	p=0,045
IL-27/IL-17	161,52 (0,00-679,61)	51,46 (16,13-417,93)	p>0,05
IL-17/TGF- β	0,31 (0,00-9,88)	0,98 (0,53-34,89)	p=0,024

Анализа обухвата испитанике са улцерозним колитисом (n=24) и Кроновом болешћу (n=5). Анализирани су односи системских вредности цитокина и упоређивани између оболелих од улцерозног колитиса и Кронове болести. Статистичка значајност је тестирана Mann-Whitney-евим тестом.

Табела 17. Концентрације туморских маркера у серуму испитаника са улцерозним колитисом и Кроновом болешћу

Туморски маркери	Улцерозни колитис (медијана, минимум- максимум)	Кронова болест (медијана, минимум- максимум)	p
CRP (mg/ml)	60,15 (5,00-362,00)	36,10 (4,80-60,30)	p>0,05
CEA (U/ml)	2,50 (0,50-6,20)	2,20 (0,23-4,70)	p>0,05
СА 19-9 (U/ml)	4,20 (0,96-137,34)	2,34 (0,94-16,20)	p>0,05

Анализа обухвата испитанике са улцерозним колитисом (n=24) и Кроновом болешћу (n=5). Анализирани су односи системских вредности цитокина и упоређивани између оболелих од улцерозног колитиса и Кронове болести. Статистичка значајност је тестирана Mann-Whitney-евим тестом.

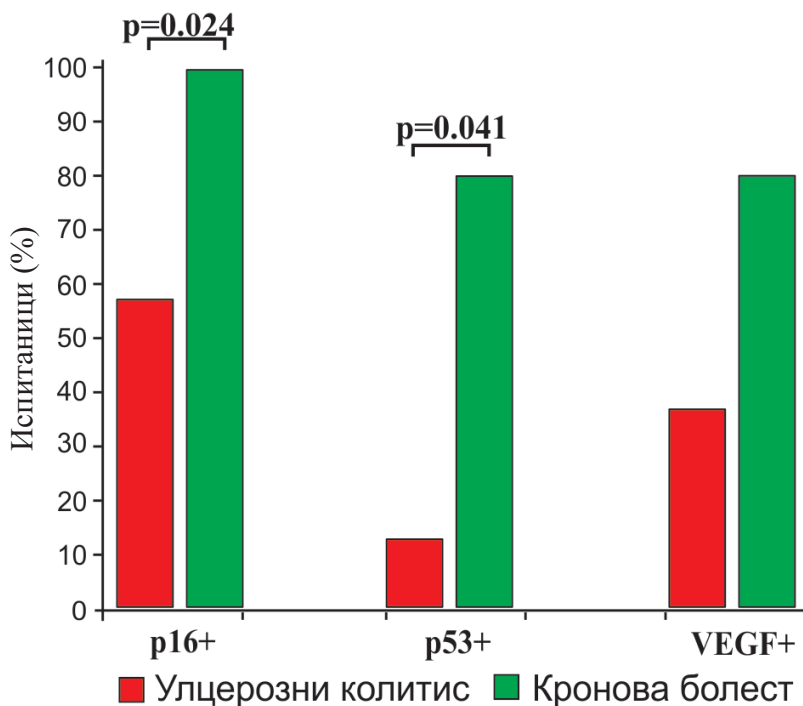
4.2.2. Експресија p16, p53 и VEGF у инфламираној слузници колона код испитаника са улцерозним колитисом и Кроновом болешћу

Претходно је показано да су концентрације TNF- α и IL-6, као и вредности количника серумских нивоа котррегулаторних цитокина IL-6/TGF- β и IL-17/TGF- β значајно веће у серуму испитаника са Кроновом болешћу у поређењу са оболелим од улцерозног колитиса. У наредном кораку анализирана је и експресија p16, p53 и VEGF у циљаном ткиву између обе испитиване групе.

На фигури 10 јасно се уочава разлика у експресији p16 и p53 у инфламираној слузници колона између испитаника са улцерозним колитисом и Кроновом болешћу. Другим речима, позитивна експресија p16 је забележена код свих испитаника са Кроновом болешћу (100%), а знатно мањи проценат (58,6%) испитаника са улцерозним колитисом је имао позитивну експресију овог протеина.

Позитивна експресија p53 је детектована код 83% испитаника са Кроновом болешћу, што је значајно више у односу на оболеле од улцерозног колитиса код којих је позитивна експресија p53 забележена у само 15,6% оболелих.

Када је анализирана експресија VEGF није нађена значајна разлика у експресији овог фактора раста у инфламираној слузници колона између испитаника са улцерозним колитисом и Кроновом болешћу (Фигура 10).



Фигура 10. Експресија p16, p53 и VEGF у инфламираној слузници колона код испитаника са улцерозним колитисом и Кроновом болешћу. Учесталост испитаника са позитивном експресијом p16 је статистички значајно већа код испитаника са Кроновом болешћу у односу на испитанике са улцерозним колитисом (100 vs. 60%, p=0,024). Учесталост испитаника са позитивном експресијом p53 је статистички значајно већа код испитаника са Кроновом болешћу у односу на испитанике са улцерозним колитисом (80 vs. 12%, p=0,041). Не постоји статистички значајна разлика у учесталости испитаника са улцерозним колитисом и Кроновом болешћу у односу на експресију VEGF. Приказане вредности су изражене процентима. Статистичка значајност је тестирана Mann-Whitney тестом.

Серумски нивои цитокина и експресија p16, p53 и VEGF у туморском ткиву испитаника са колоректалним карциномом

4.3.1. Концентрације цитокина у серуму и односи контрарегулаторних цитокина код испитаника са колоректалним карциномом

На крају анализиране су серумске концентрације цитокина и код испитаника са колоректалним карциномом. Серумски нивои TNF- α , TGF- β , IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, IL-27 и IFN- γ су значајно виши у групи испитаника са колоректалним карциномом у односу на здраве испитанике (Табела 18).

Табела 18. Концентрације испитиваних цитокина у серуму испитаника са колоректалним карциномом и здравих испитаника

Концентрације цитокина (pg/ml)	CRC (медијана, минимум-максимум)	Здрави (медијана, минимум-максимум)	p
TNF	53,64 (0,00-1324,7)	0,00 (0,00-97,00)	p=0,00
TGF- β	140,88 (8,50-2726,9)	17,70 (0,00-110,60)	p=0,0009
IL-4	1,29 (0,00-165,1)	0,00 (0,00-9,10)	p=0,002
IL-6	4,09 (0,00-1685,7)	0,00 (0,00-138,10)	p=0,0009
IL-10	6,91 (0,00-313,0)	0,00 (0,00-77,50)	p=0,00
IL-17	92,34 (0,00-1825,)	0,00 (0,00-316,50)	p=0,00
IL-27	7683,69 (1276,00-70110,52)	1832,60 (0,00-26094,90)	p=0,00
IFN- γ	106,09 (0,30-1620,9)	0,00 (0,00-219,60)	p=0,046

Анализа обухвата 75 испитаника са колоректалним карциномом и 37 здравих испитаника. Анализиране су системске концентрације испитиваних цитокина и упоређиване између оболелих од колоректалног карцинома и улцерозног колитиса. Статистичка значајност је тестирана Mann-Whitney-евим тестом.

Упореджени су и односи серумских вредности контрарегулаторних цитокина, између испитаника са колоректалним карциномом и здравих испитаника. Показано је да су серумске вредности односа контрарегулаторних цитокина IFN- γ /IL4, IFN- γ /TGF- β , IFN- γ /IL-10, IL-17/IL-10, IL-6/TGF- β , IL-27/IL-17 и IL-17/TGF- β статистички значајно веће код испитаника са колоректалним карциномом у односу на контролну групу (Табела 19).

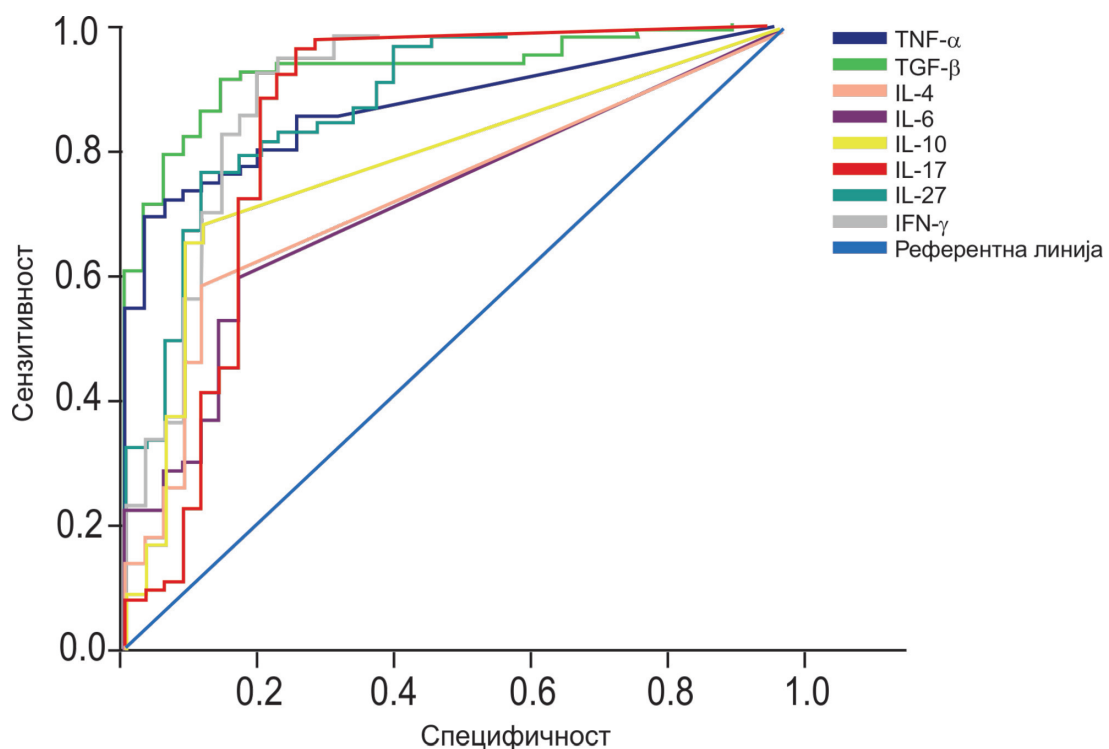
Табела 19. Односи контрарегулаторних цитокина у серуму испитаника са колоректалним карциномом и здравих испитаника

Односи цитокина	CRC (медијана, минимум-максимум)	Здрави (медијана, минимум-максимум)	p
IFN- γ /IL-4	23,84 (1,76-5161,74)	0,00 (0,00-29,98)	p=0,001
IFN- γ /TGF- β	0,73 (0,00-27,75)	0,00 (0,00-3,76)	p=0,04
IFN- γ /IL-10	5,90 (0,16-2423,27)	0,00 (0,00-14,70)	p=0,002
IL-17/IL-10	4,70 (0,00-3099,67)	0,00 (0,00-316,50)	p=0,003
IL-6/TGF- β	0,024 (0,00-7,99)	0,00 (0,00-6,06)	p=0,045
IL-27/IL-17	77,00 (0,00-1202,00)	0,00 (0,00-5895,44)	p=0,002
IL-17/TGF- β	0,74 (0,00-37,87)	0,00 (0,00-21,65)	p=0,038

Анализа обухвата 75 испитаника са колоректалним карциномом и 37 здравих испитаника. Анализирани су односи системских концентрација контрарегулаторних цитокина и упоређивани између оболелих од колоректалног карцинома и улцерозног колитиса. Статистичка значајност је тестирана Mann-Whitney-евим тестом.

4.3.2. Анализа логистичке регресије серумских нивоа TNF- α , TGF- β , IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, IL-27 и IFN- γ , код испитаника са колоректалним карциномом

На фигури 11 приказана је ROC крива која показује однос специфичности и сензитивности серумских нивоа цитокина и сугерише на потенцијалне маркере за разликовање испитаника са колоректалним карциномом од здравих испитаника. Бинарна логистичка регресија указује на то да повећани нивои свих анализираних цитокина корелирају са колоректалним карциномом. Уочава се да је TGF- β најсензитивнији и најспецифичнији маркер карцинома (area=0,925, p=0,001). Резултати ове студије сугеришу на то да оптимална гранична серумска концентрација овог цитокина износи 28 pg/ml и да ова гранична вредност TGF- β може да послужи за дискриминацију болесника са колоректалним карциномом од здравих испитаника (сензитивност 90,7%, специфичност 85,7%).



Фигура 11. ROC (енгл. Receiver operating characteristic curve) анализа биомаркера у дијагнози колоректалног карцинома и здравих испитаника. ROC крива показује сензитивност и специфичност серумских нивоа TNF- α , TGF- β , IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, IL-27 и IFN- γ .

AUC (TNF- α)=0,872, p=0,003, сензитивност 72,0%, специфичност 94,3%, cut off point 80 pg/ml;

AUC (TGF- β)=0,925, p=0,001, сензитивност 90,7%, специфичност 85,7%, cut off point 28 pg/ml;

AUC (IL-4)=0,733, p=0,004, сензитивност 58,7%, специфичност 88,6%, cut off point 5pg/ml;

AUC (IL-6)=0,719, p=0,045, сензитивност 60,0%, специфичност 82,9%, cut off point 20 pg/ml;

AUC (IL-10)=0,781, p=0,005, сензитивност 68,0%, специфичност 88,6%, cut off point 32 pg/ml;

AUC (IL-17)=0,8438, p=0,032, сензитивност 96,0%, специфичност 74,3%, cut off point 30 pg/ml;

AUC (IL-27)=0,881, p=0,006, сензитивност 76,0%, специфичност 88,6%, cut off point 1300 pg/ml;

AUC (IFN- γ)=0,903, p=0,002, сензитивност 93,3%, специфичност 80,0%, cut off point 48 pg/ml.

AUC (енгл. Area under the curve)

4.3.3. Клиничке и патохистолошке карактеристике болести и експресија p16, p53 и VEGF у туморском ткиву испитаника са колоректалним карциномом

У табели 20, приказана је корелација клиничких и патохистолошких карактеристика болести са позитивном експресијом p16 (n=28), p53 (n=36) и VEGF (n=50). На основу позитивне (>10% браон обојених туморских ћелија) или негативне експресије (≤10% браон обојених туморских ћелија) p16, p53 и VEGF (184, 185), испитаници са колоректалним карциномом су класификовани у две групе. У анализу експресије p16 и p53 у ћелијама узета је у обзир само браон пребојеност једра. Експресија VEGF је анализирана само у цитоплазми ћелије. Анализирани су патохистолошки параметри (патохистолошки тип, нуклеарни и хистолошки градус тумора) и клиничке карактеристике болести (локализација тумора и карциноматоза перитонеума) у свакој од дефинисаних група. Није уочена статистички значајна корелација експресије p16, p53 и VEGF са клиничким и патохистолошким параметрима болести.

Табела 20. Клиничке и патохистолошке карактеристике болести и експресија p16, p53 и VEGF у ткиву испитаника са колоректалним карциномом

	p16 ⁺ (%)	p16 ⁻ (%)	p53 ⁺ (%)	p53 ⁻ (%)	VEGF ⁺ (%)	VEGF ⁻ (%)
РН						
инвазивни	43,90	17,07	33,33	33,33	45,33	21,33
интрамукозални	19,51	14,63	10,66	16,00	14,66	12,00
муцинозни	4,87	0,00	4,00	2,66	6,66	0,00
р	0,806		0,102		0,904	
Нуклеарни градус						
I	4,87	2,43	4,00	8,00	6,66	5,33
II	63,41	21,95	37,33	41,33	54,66	24,00
III	4,87	2,43	6,66	2,66	5,33	4,00
р	0,181		0,453		0,179	
Хистолошки градус						
I	34,10	17,07	18,66	30,66	34,66	14,66
II	31,70	7,31	26,66	18,66	30,66	14,66
III	2,43	7,31	2,66	2,66	4,00	1,33
р	0,321		0,899		0,193	
Локализација тумора						
ректум	36,50	12,19	33,33	20,00	37,33	16,0
дистални колон	17,07	17,07	8,00	24,00	17,33	14,66
прокс.колон	14,63	2,43	6,66	8,00	13,33	1,33
р	0,943		0,543		0,612	
Карциноматоза перитонеума						
+	0,00	2,44	3,99	3,99	3,99	4,00
-	68,30	29,27	50,66	41,33	62,66	29,33
р	0,121		0,843		0,654	

Анализа обухвата 75 испитаника са колоректалним карциномом који су класификовани у две групе, на основу позитивне или негативне експресије за p16: p16⁺ (28) и p16⁻ (47), p53: p53⁺ (36) и p53⁻ (39) и VEGF: VEGF⁺ (50) и VEGF⁻ (25). Анализиран је патохистолошки (РН) тип тумора (инвазивни, интрамукозални и муцинозни), нуклеарни и хистолошки градус тумора (I, II и III), локализација тумора (ректум, дистални колон и проксимални колон) и постојање карциноматозе перитонеума [(са ("+") и без ("-")), у односу са експресију p16, p53 и VEGF. Статистичка значајност је тестирана Kruskal-Vallis-овим тестом.

4.3.4. Нивои цитокина у серуму и експресија p16, p53 и VEGF у туморском ткиву испитаника са колоректалним карциномом

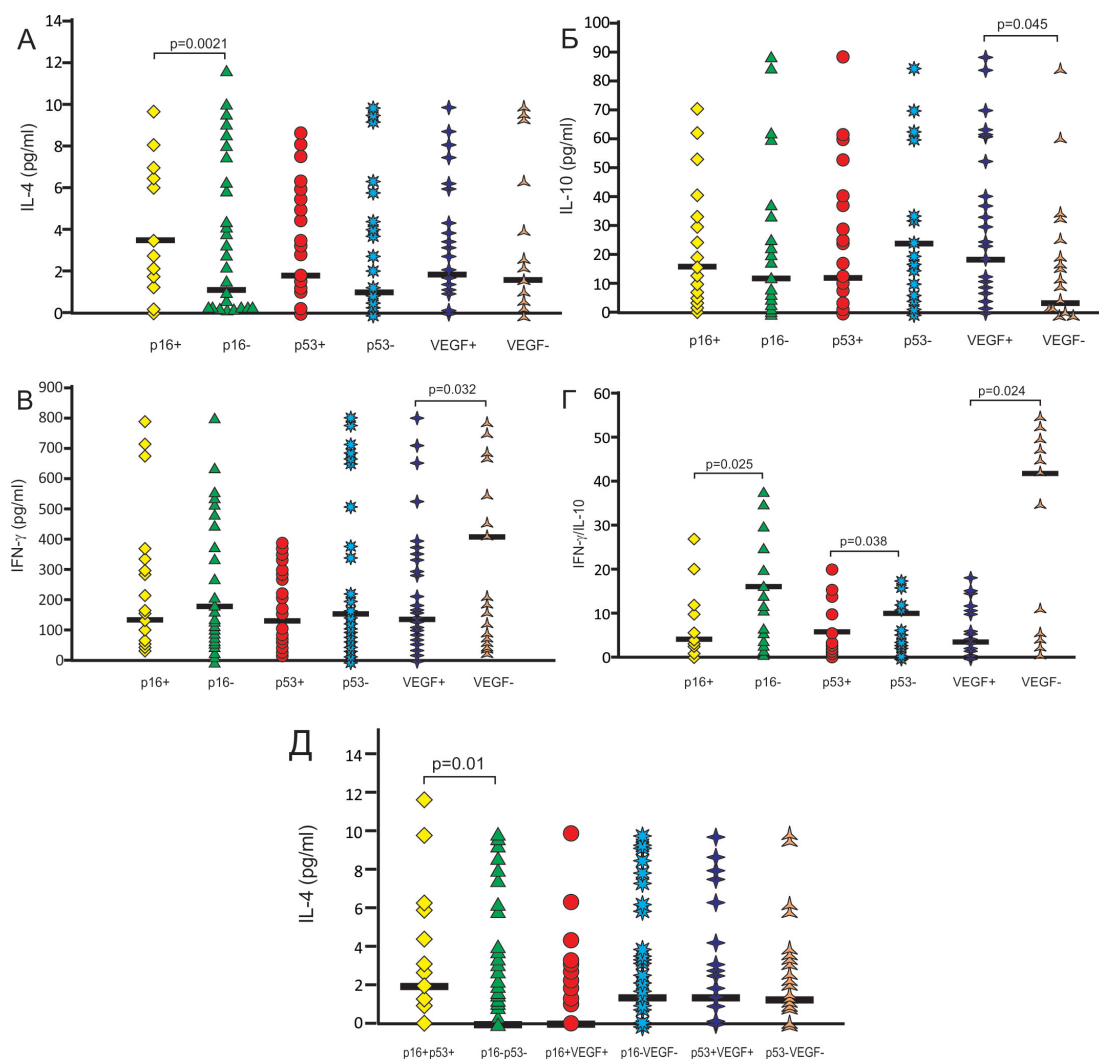
На основу позитивне и негативне експресије појединачних маркера p16, p53 и VEGF испитаници са колоректалним карциномом су сврстани у две групе. Такође, на основу истовремене позитивне или негативне експресије појединачних маркера исти испитаници су сврстани у групе: p16⁺p53⁺ и p16⁻p53⁻; p16⁺VEGF⁺ и p16⁻VEGF⁻; p53⁺VEGF⁺ и p53⁻VEGF⁻. Затим су анализирани серумске концентрације цитокина у овако дефинисаним групама.

Није забележена статистички значајна корелација концентрације TNF- α , TGF- β , IL-6, IL-17 у серуму са експресијом p16, p53 и VEGF у туморском ткиву оболелих од колоректалног карцинома (Табела 21). Утврђена је статистички значајна позитивна корелација серумских концентрација IL-4 код оболелих са позитивном експресијом p16 (3,92 vs. 0,92 pg/ml, p=0,021) (Фигура 12А), а и код оних испитаника са истовремено позитивном експресијом и p16 и p53 (2,00 vs. 0,00 pg/ml, p=0,01) (Фигура 12Д). Код испитаника са позитивном експресијом VEGF постоји статистички значајно виша серумска концентрација IL-10 (19,78 vs. 3,2 pg/ml, p=0,045) (Фигура 12Б) и значајно нижа концентрација INF- γ (152,00 vs. 432,00 pg/ml p=0,032) (Фигура 12В) у односу на испитанике са негативном експресијом овог маркера. Однос серумских вредности контрарегулаторних цитокина IFN- γ /IL-10 је значајно мањи код испитаника са позитивном експресијом p16 (4,50 vs. 18,12, p=0,025), p53 (6,80 vs. 12,80, p=0,038) и VEGF (4,12 vs. 44,50, p=0,024) (Фигура 12Г), у односу на испитанике на негативном експресијом ових маркера.

Табела 21. Концентрација TNF- α , TGF- β , IL-6 и IL-17 у серуму испитаника са колоректалним карциномом у односу на експресију p16, p53 и VEGF

	TNF- α (pg/ml) (медијана, минимум- максимум)	p	TGF- β (pg/ml) (медијана, минимум- максимум)	p	IL-6 (pg/ml) (медијана, минимум- максимум)	p	IL-17 (pg/ml) (медијана, минимум- максимум)	p
p16⁺	50,4 (1,38-364,12)	p>0,05	65,2 (8,54-10078,00)	p>0,05	0 (0,00-3,90)	p>0,05	58,32 (0,00-1825,22)	p>0,05
p16⁻	14,3 (2,80-400,48)		59,12 (14,30-1041,74)		4 (0,00-375,14)		69,67 (8,87-121,33)	
p53⁺	40,3 (1,30-364,12)	p>0,05	60,28 (8,54-1078,31)	p>0,05	0 (0,00-880,93)	p>0,05	58,32 (0,00-1384,57)	p>0,05
p53⁻	68,5 (13,20-400,45)		101,85 (14,30-723,78)		0,4 (0,00-1685,73)		81,58 (23,63-1825,22)	
VEGF⁺	39,88 (8,50-250,32)	p>0,05	59,14 (8,54-200,27)	p>0,05	0 (0,00-880,93)	p>0,05	69,75 (0,00-1010,40)	p>0,05
VEGF⁻	45,17 (5,00-450,48)		145,43 (12,90-193,68)		0,4 (0,00-1685,73)		52,49 (0,00-341,21)	

Анализа обухвата 75 испитаника са колоректалним карциномом и испитаници су сврстани на основу позитивне и негативне експресије појединачних маркера у две групе за p16: p16⁺ (28) и p16⁻ (47), p53: p53⁺ (36) и p53⁻ (39) и VEGF: VEGF⁺ (50) и VEGF⁻ (25). Анализиране су системске вредности испитиваних цитокина и упоређиване у дефинисаним групама. Статистичка значајност је тестирана Mann-Whitney-евим тестом.



Фигура 12. Серумски нивои IL-4, IL-10, IFN- γ и односи контррегулаторних цитокина IFN- γ /IL-10 испитаника са колоректалним карциномом у односу на експресију p16, p53 и VEGF.

Серумски нивои IL-4, IL-10 и IFN- γ испитаника са колоректалним карциномом одређивани су ELISA тестом. Експресија p16, p53 и VEGF одређивана је имунохистохемијском методом. Испитаници су сврстани у две групе на основу позитивне и негативне експресије маркера у ткиву.

12А: Утврђене су значајно више концентрације IL-4 у серуму испитаника са позитивном експресијом p16 (3,92 vs. 0,92 pg/ml, $p=0,0021$). Не постоји статистички значајна разлика серумских концентрација IL-4 у односу на експресију p53 (1,98 vs. 0,90 pg/ml) и VEGF (2,00 vs. 1,95 pg/ml).

12Б: Статистички значајно више вредности IL-10 су у серуму болесника са позитивном експресијом VEGF (19,80 vs. 3,20 pg/ml, $p=0,045$). Не постоји статистички значајна разлика концентрације IL-10 у односу на експресију p16 (18,50 vs. 15,10 pg/ml) и p53 (16,20 vs. 25,00 pg/ml).

12В: Статистички значајно ниже концентрације IFN- γ су утврђене у серуму испитаника са позитивном експресијом VEGF (152,00 vs. 432,00 pg/ml, $p=0,032$). Не постоји статистички значајна разлика концентрације IFN- γ у односу на експресију p16 (150,00 vs. 169,00 pg/ml) и p53 (149,00 vs. 163,00 pg/ml).

12Г: Утврђени су значајно мањи односи серумских вредности IFN- γ /IL-10 у серуму испитаника са позитивном експресијом p16 (4,50 vs. 18,12, $p=0,025$), p53 (6,80 vs. 12,80, $p=0,038$) и VEGF (4,00 vs. 44,50, $p=0,024$).

12Д: Испитаници су сврстани у две групе на основу истовремене експресије маркера p16 и p53: p16⁺p53⁺ и p16⁺p53⁻; p16 и VEGF: p16⁺VEGF⁺ и p16⁺VEGF⁻; p53 и VEGF: p53⁺VEGF⁺ и p53⁺VEGF⁻. Статистички више вредности IL-4 су регистроване у серуму испитаника са истовременом позитивном експресијом p16 и p53 (2,00 vs. 0,00, $p=0,01$).

Приказане вредности су медијане и представљене су scatter дијаграмом.

Статистичка значајност одређивана је Mann-Whitney-евим тестом.

Када су упоређени односи серумских вредности осталих контрарегулаторних цитокина са експресијом p16, p53 и VEGF у туморском ткиву није регистрована статистички значајна корелација (Табела 22).

Табела 22. Односи IFN- γ /TGF- β , IL-17/IL-10, IL-6/TGF- β , IL-27/IL-17 и IL-17/TGF- β у серуму испитаника са колоректалним карциномом у односу на експресију маркера

	IFN- γ /TGF- β (медијана, минимум- максимум)	p	IL-17/IL-10 (медијана, минимум- максимум)	p	IL-6/TGF- β (медијана, минимум- максимум)	p	IL-27/IL-17 (медијана, минимум- максимум)	p	IL-17/TGF- β (медијана, минимум- максимум)	p
p16 ⁺	4,5 (0,06-18,58)	p>0,05	3,4 (0,00-101,48)	p>0,05	0 (0,00-6,15)	p>0,05	137,77 (0,00-849,00)	p>0,05	1 (0,00-37,87)	p>0,05
p16 ⁻	2,14 (1,08-27,75)		4 (0,00-14,61)		0,02 (0,00-4,00)		124,06 (65,00-850,00)		0,71 (0,26-3,24)	
p53 ⁺	2,03 (0,04-18,58)	p>0,05	4,68 (0,00-950,64)	p>0,05	0 (0,00-7,99)	p>0,05	140,71 (0,00-849,00)	p>0,05	0,94 (0,00-6,75)	p>0,05
p53 ⁻	4,48 (0,01-27,15)		2,76 (0,11-3099,67)		0,01 (0,00-7,78)		89,16 (9,00-429,00)		0,94 (0,00-37,87)	
VEGF ⁺	2,43 (0,00-27,75)	p>0,05	2,62 (0,00-950,64)	p>0,05	0 (0,00-7,99)	p>0,05	131,21 (0,00-1202,00)	p>0,05	2,43 (0,00-37,87)	p>0,05
VEGF ⁻	4,18 (0,07-10,34)		8,48 (0,38-3099,67)		0 (0,00-6,36)		150,21 (0,00-429,00)		4,18 (0,00-3,64)	

Анализа обухвата 75 испитаника са колоректалним карциномом и испитаници су сврстани на основу позитивне и негативне експресије појединачних маркера у две групе за p16: p16⁺ (28) и p16⁻ (47), p53: p53⁺ (36) и p53⁻ (39) и VEGF: VEGF⁺ (50) и VEGF⁻ (25). Анализирани су односи системских вредности контрарегулаторних цитокина и упоређивани у дефинисаним групама. Статистичка значајност је тестирана Mann-Whitney-евим тестом.

4.3.5. Концентрације цитокина и AFP, СЕА и СА 19-9 у серуму испитаника са метастазама у јетри и плућима

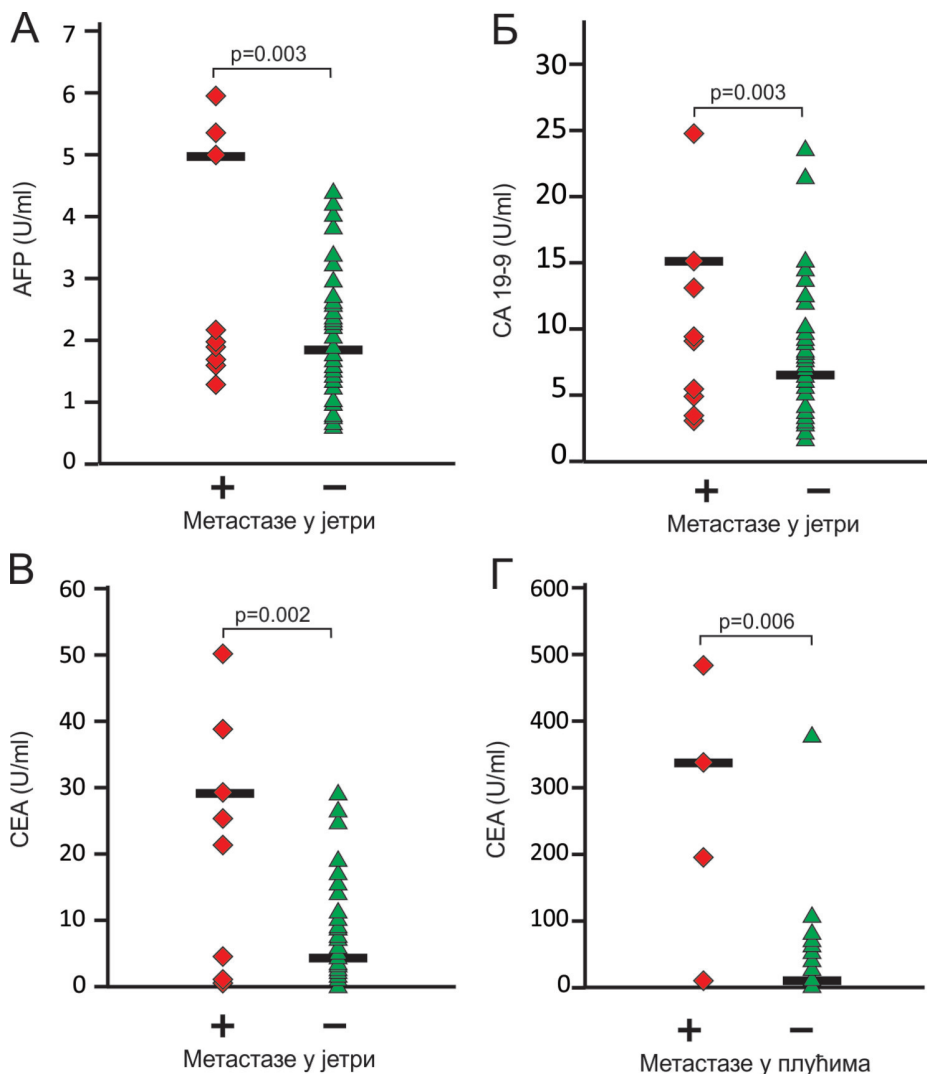
У наредном кораку истраживања у зависности од присуства метастаза у јетри и плућима сви испитаници са колоректалним карциномом су сврстани у две групе: 1) са дијагностикованим метастазама (група означена са "+") и 2) без дијагностикованих метастаза (група означена са "-"). Затим су анализирани концентрације цитокина и туморских маркера AFP, СЕА и СА 19-9 у серуму овако дефинисаних група испитаника. Није утврђена статистички значајна разлика у серумским концентрацијама TNF- α , TGF- β , IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, IL-27 и IFN- γ између испитаника са и без метастаза у јетри (Табела 23).

Табела 23. Анализа концентрације испитиваних цитокина у серуму испитаника са колоректалним карциномом у односу на метастазе у јетри

Концентрације цитокина (pg/ml)	Метастазе у јетри (медијана, минимум-максимум)		p
	+	-	
TNF- α	39,25 (0,00-172,77)	54,72 (0,00-404,48)	p>0,05
TGF- β	124,78 (30,61-443,84)	140,88 (8,54-1078,31)	p>0,05
IL-4	0,53 (0,00-17,58)	1,36 (0,00-26,85)	p>0,05
IL-6	16,8 (0,00-43,52)	4,09 (0,00-125,47)	p>0,05
IL-10	12,48 (0,18-61,55)	5,23 (0,00-313,96)	p>0,05
IL-17	97,67 (48,58-178,04)	92,33 (0,00-486,65)	p>0,05
IL-27	10282,85 (3142,04-31644,27)	7367,81 (1276,68-28327,61)	p>0,05
IFN- γ	87,62 (33,99-135,99)	107,83 (0,39-368,86)	p>0,05

Анализа обухвата 75 испитаника са колоректалним карциномом који су у зависности од присуства метастаза у јетри сврстани у две групе: са дијагностикованим метастазама ("+") (n=10) и без дијагностикованих метастаза ("-") (n=65). Анализиране су системске вредности испитиваних цитокина и упоређиване између испитаника са и без дијагностикованих метастаза. Статистичка значајност је тестирана Манн-Витнеи-евим тестом.

Ако се пак пореде серумске концентрације туморских маркера јасно се уочава да су серумске вредности AFP (5,00 vs. 1,98 U/ml, $p=0,003$) (Фигура 13А), СА 19-9 (15,24 vs. 6,35 U/ml, $p=0,003$) (Фигура 13Б) и СЕА (29,89 vs. 4,58, $p=0,002$) (Фигура 13В), значајно више код испитаника који имају метастазе у јетри, у односу на оне испитанике код којих нису детектоване метастазе.



Фигура 13. Анализа серумских нивоа AFP, СЕА и СА 19-9 код испитаника са колоректалним карциномом у односу на присуство метастаза у јетри. Серумски нивои маркера одређивани су методом хемилуминисценције.

13А: Статистички значајно више вредности AFP су измерене у серуму испитаника са метастазама у јетри (5,00 vs. 1,98 U/ml, $p=0,003$).

13Б: Статистички значајно више вредности СА 19-9 су измерене у серуму испитаника са метастазама у јетри (15,24 vs. 6,35 U/ml, $p=0,003$).

13В: Статистички значајно више вредности СЕА су измерене у серуму испитаника са метастазама у јетри (29,89 vs. 4,58, $p=0,002$).

13Г: Утврђене су значајно више серумске концентрације СЕА код испитаника са метастазама у плућима (348,32 vs. 5,50 U/ml, $p=0,006$).

Приказане вредности су медијане и представљене су *scatter* дијаграмом.

Статистичка значајност одређивана је Mann-Whitney-евим тестом.

Када су анализиране серумске концентрације цитокина код испитаника са и без метастаза у плућима, није утврђена статистички значајна разлика серумских концентрација TNF- α , TGF- β , IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, IL-27 и IFN- γ између ове групе испитаника (Табела 24). Испитивањем туморских маркера, забележен је значајан пораст концентрације СЕА код испитаника са метастазама у плућима (348,32 vs. 5,50 U/ml, $p=0,006$) (Фигура 13Г) у односу на испитанике који немају метастазе. Не постоји статистички значајна разлика у серумским вредностима АФР и СА 19-9 између ових група испитаника (Табела 25).

Табела 24. Анализа концентрације испитиваних цитокина у серуму испитаника са колоректалним карциномом у односу на присуство метастаза у плућима

Концентрације цитокина (pg/ml)	Метастазе у плућима (медијана, минимум-максимум)		p
	+	-	
TNF- α	90,50 (40,00-103,75)	50,60 (0,00-400,48)	$p>0,05$
TGF- β	263,81 (138,00-450,46)	138,58 (8,54-637,20)	$p>0,05$
IL-4	4,66 (0,00-15,00)	1,28 (0,00-17,58)	$p>0,05$
IL-6	10,56 (0,00-15,00)	4,09 (0,00-60,12)	$p>0,05$
IL-10	70,51 (3,13-150,00)	7,58 (0,00-313,96)	$p>0,05$
IL-17	101,13 (23,00-185,80)	92,34 (0,00-486,65)	$p>0,05$
IL-27	5890,05 (3213,86-11307,88)	7683,69 (1574,78-31644,77)	$p>0,05$
IFN- γ	161,78 (30,15-203,31)	101,75 (0,39-632,84)	$p>0,05$

Анализа обухвата 75 испитаника са колоректалним карциномом који су у зависности од присуства метастаза у плућима сврстани у две групе: са дијагностикованим метастазама ("+") (n=5) и без дијагностикованих метастаза ("-") (n=70). Анализиране су серумске концентрације испитиваних цитокина и упоређиване између наведених група испитаника. Статистичка значајност је тестирана Mann-Whitney-евим тестом.

Табела 25. Концентрације туморских маркера у серуму испитаника са и без метастаза у плућима

Туморски маркери (U/ml)	Метастазе у плућима (медијана, минимум-максимум)		p
	+	-	
AFP	2,03 (0,80-3,40)	1,70 (0,61-5,35)	$p>0,05$
СА 19-9	24,86 (2,61-6,72)	5,48 (1,78-57,78)	$p>0,05$

Анализа обухвата 75 испитаника са колоректалним карциномом који су у зависности од присуства метастаза у плућима сврстани у две групе: са дијагностикованим метастазама ("+") (n=5) и без дијагностикованих метастаза ("-") (n=70). Анализиране су системске вредности туморских маркера и упоређиване између наведених група испитаника. Статистичка значајност је тестирана Mann-Whitney-евим тестом.

4.3.6. Концентрације цитокина и туморских маркера у серуму испитаника са карциноматозом перитонеума

Свим испитаницима са колоректалним карциномом код којих је регистрована слободна течност у стомаку, узет је пунктат у коме је анализирано присуство малигну хелија у пунктату. Карциноматоза перитонеума је верификована налазом малигну хелија у пунктату. На основу тога испитаници су категорисани у две групе: 1) са дијагностикованом карциноматозом перитонеума (група са ознаком "+") и 2) без дијагностиковане карциноматозе перитонеума (са ознаком "-"). Затим су анализирани концентрације цитокина и туморских маркера у серуму овако дефинисаних група испитаника. Није утврђена статистички значајна разлика у серумским концентрацијама TNF- α , TGF- β , IL-4, IL-6, IL-17, IL-27 и IFN- γ (Табела 26), као ни туморских маркера AFP и СА 19-9 (Табела 27) између испитаника са и без карциноматозе перитонеума.

Табела 26. Анализа концентрације испитиваних цитокина у серуму испитаника са и без карциноматозе перитонеума

Концентрације цитокина (pg/ml)	Карциноматоза перитонеума (медијана, минимум-максимум)		p
	+	-	
TNF- α	387,58 (77,25-588,78)	50,04 (0,00-400,48)	p>0,05
TGF- β	227,33 (227,00-450,46)	124,65 (8,54-1061,74)	p>0,05
IL-4	6,77 (0,00-9,33)	1,06 (0,00-26,85)	p>0,05
IL-6	200,41 (25,00-250,00)	3,43 (0,00-261,27)	p>0,05
IL-10	138,34 (0,00-216,67)	10,98 (0,00-313,96)	p=0,039
IL-17	731,35 (240,00-850,00)	92,34 (0,00-308,58)	p>0,05
IL-27	56509,20 (1276,68-36509,00)	7683,69 (1574,78-48117,15)	p>0,05
IFN- γ	131,29 (30,15-209,48)	101,75 (0,39-797,71)	p>0,05

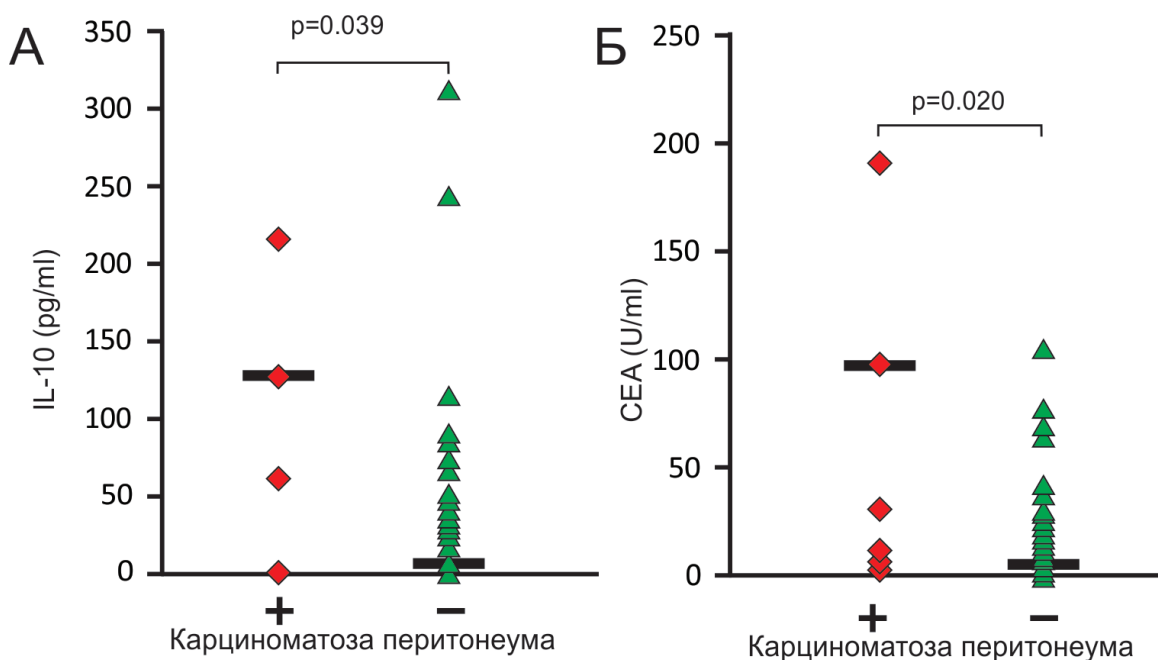
Анализа обухвата 75 испитаника са колоректалним карциномом који су у зависности од постојања карциноматозе перитонеума сврстани у две групе: са дијагностикованом карциноматозом ("+") (n=5) и без дијагностиковане карциноматозе ("-") (n=70). Анализиране су системске вредности испитиваних цитокина и упоређиване између наведених група испитаника. Статистичка значајност је тестирана Mann-Whitney-евим тестом.

Табела 27. Анализа концентрације туморских маркера у серуму испитаника са и без карциноматозе перитонеума

Туморски маркери (U/ml)	Карциноматоза перитонеума (медијана, минимум-максимум)		p
	+	-	
AFP	2,45 (0,80-3,40)	1,80 (0,61-13,60)	p>0,05
СА 19-9	6,51 (2,60-46,72)	5,46 (1,78-106,21)	p>0,05

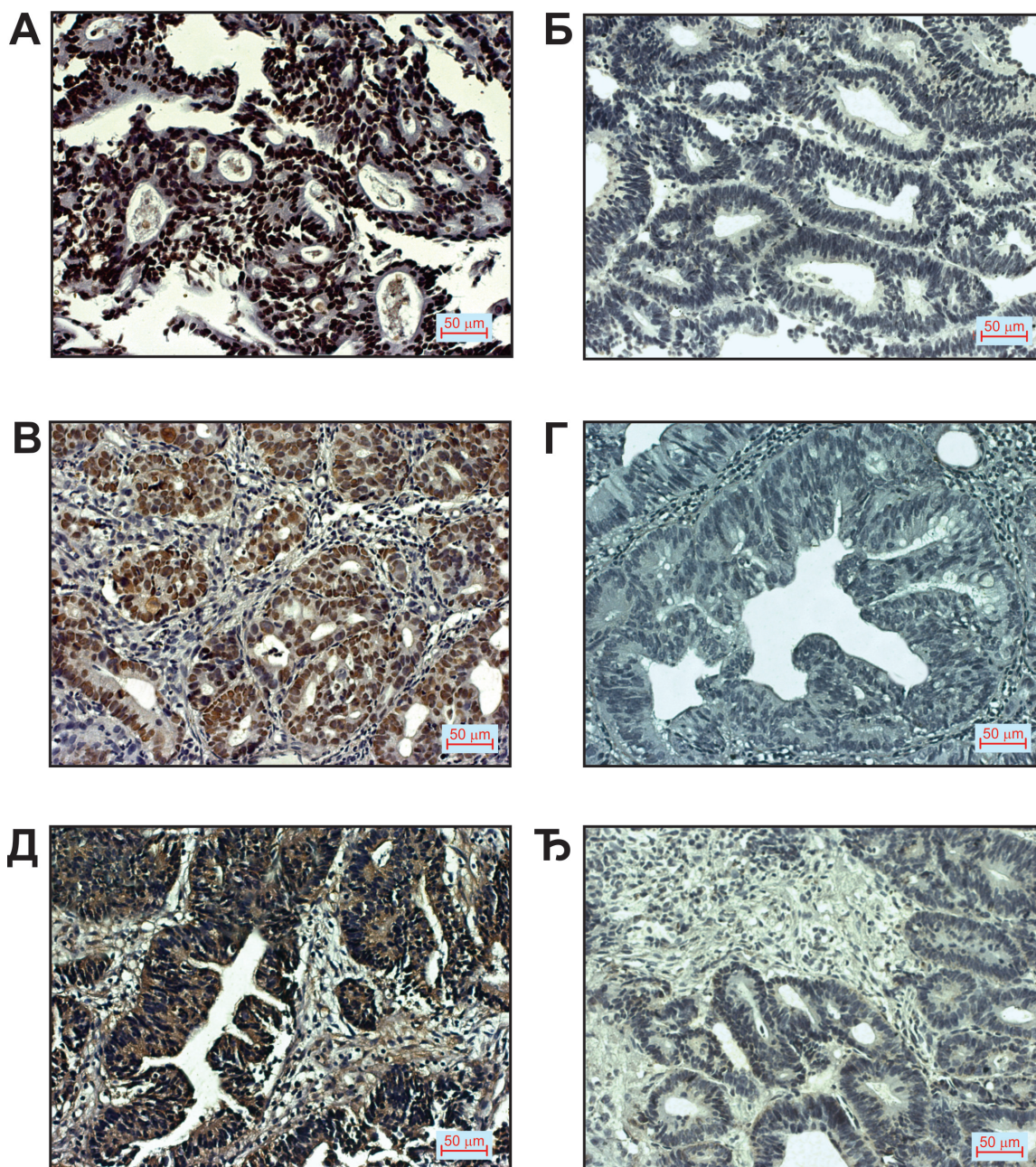
Анализа обухвата 75 болесника са колоректалним карциномом који су у зависности од постојања карциноматозе перитонеума сврстани у две групе: са дијагностикованом карциноматозом ("+") (n=5) и без дијагностиковане карциноматозе ("-") (n=70). Анализиране су системске концентрације анализираних цитокина и упоређиване у наведеним групама. Статистичка значајност је тестирана Mann-Whitney-евим тестом.

Концентрација имunosупресивног цитокина IL-10 у серуму је статистички значајно виша у групи испитаника са дијагностикованом карциноматозом перитонеума (138,34 vs. 10,98 pg/ml, $p=0,039$) (Фигура 14А) у односу на испитанике код којих није дијагностикована карциноматоза перитонеума. Као што се види на фигури 14Б забележен је и статистички значајан пораст концентрације туморског маркера СЕА у серуму испитаника са дијагностикованом карциноматозом перитонеума (99,89 vs. 4,58 U/ml, $p=0,020$).



Фигура 14. Серумски нивои IL-10 и СЕА у испитаника са колоректалним карциномом у односу на карциноматозу перитонеума. Серумски нивои цитокина одређивани су ELISA тестом. Серумске концентрације СЕА су одређиване методом хемилуминисценције.
14А: Статистички значајно више вредности IL-10 су измерене у серуму испитаника са дијагностикованом карциноматозом перитонеума (138,34 vs. 10,98 pg/ml, $p=0,039$).
14Б: Вредности СЕА су статистички значајно више у серуму испитаника са дијагностикованом карциноматозом перитонеума (99,89 vs. 4,58 U/ml, $p=0,020$).
 Приказане вредности су медијане и представљене су *scatter* дијаграмом. Статистичка значајност одређивана је Mann-Whitney-евим тестом.

На фигури 15 приказани су репрезентативни исечци колоректалног карцинома обојени имунохистохемијском методом на којима се уочава позитивна и негативна експресија p16, p53 и VEGF.



Фигура 15. Експресија p16, p53 и VEGF код испитаника са колоректалним карциномом. Панел -А, -В и -Д: Позитивна експресија p16, p53 и VEGF; Панел -Б, -Г и -Т: Негативна експресија p16, p53 и VEGF (200x увељичање).

Серумски нивои цитокина и експресија ткивних маркера p16, p53 и VEGF код испитаника са колоректалним карциномом и улцерозним колитисом

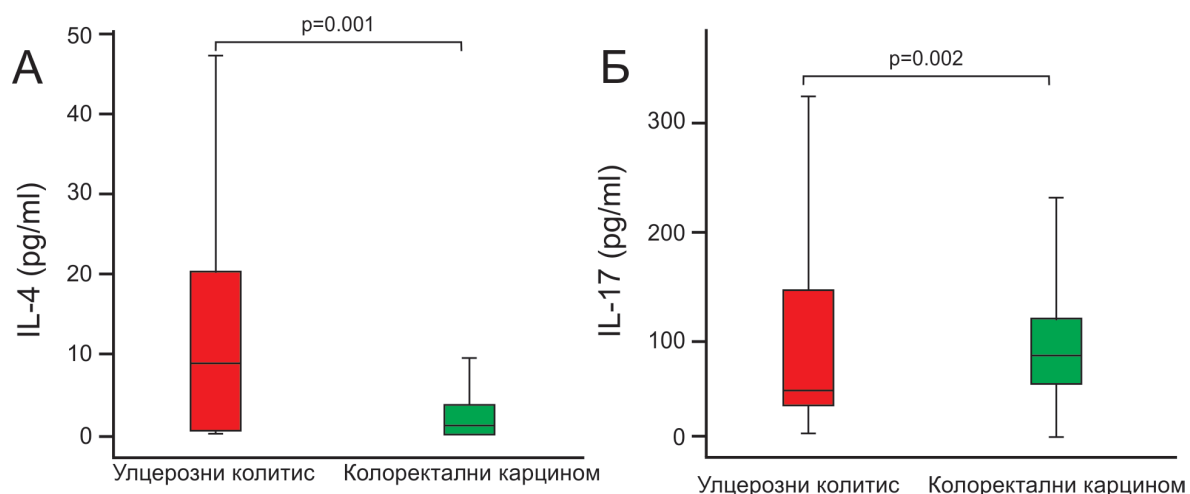
4.4.1. Концентрације цитокина у серуму испитаника са улцерозним колитисом и колоректалним карциномом

На крају су упоређене концентрације цитокина у серуму испитаника са улцерозним колитисом и колоректалним карциномом. Није регистрована статистички значајна разлика у серумској концентрацији TNF- α , TGF- β , IL-6, IL-10, IL-27 и IFN- γ између испитаника са улцерозним колитисом и колоректалним карциномом (Табела 28).

Табела 28. Концентрације испитиваних цитокина у серуму код испитаника са улцерозним колитисом и колоректалним карциномом

Концентрације цитокина (pg/ml)	CRC (медијана, минимум-максимум)	Улцерозни колитис (медијана, минимум-максимум)	p
TNF- α	53,64 (0,00-547,10)	33,09 (0,00-547,10)	p>0,05
TGF- β	140,88 (4,93-933,80)	92,21 (4,93-933,80)	p>0,05
IL-4	1,29 (0,00-77,00)	7,99 (0,00-77,00)	p=0,001
IL-6	4,09 (0,00-1470,00)	0,00 (0,00-1470,00)	p>0,05
IL-10	6,91 (0,00-126,30)	7,72 (0,00-126,30)	p>0,05
IL-17	92,34 (0,00-4021,30)	32,25 (0,00-4021,30)	p=0,002
IL-27	7683,69 (914,00-71038,50)	6332,62 (914,0-71038,50)	p>0,05

Анализа обухвата 75 испитаника са колоректалним карциномом и 24 болесника са улцерозним колитисом. Анализиране су системске концентрације испитиваних цитокина и упоређиване између оболелих од колоректалног карцинома и улцерозног колитиса. Статистичка значајност је тестирана Mann-Whitney-евим тестом.



Фигура 16. Серумске концентрације ИЛ-4 и ИЛ-17 код испитаника са улцерозним колитисом и колоректалним карциномом. Серумски нивои цитокина код испитаника са улцерозним колитисом (n=29) и колоректалним карциномом (n=75) одређивани су ELISA тестом.

16А: Серумски нивои ИЛ-4 су значајно виши код испитаника са улцерозним колитисом у односу на испитанике са колоректалним карциномом (7,99 vs. 1,29 pg/ml, p=0,001).

16Б: Показане су статистички значајно више серумске концентрације ИЛ-17 код испитаника са колоректалним карциномом у односу на испитанике са улцерозним колитисом (92,34 vs. 32,25 pg/ml, p=0,002).

Резултати су представљени као медијане и перцентили [(median (percentiles 25th-75th)]. Статистичка значајност је тестирана Mann-Whitney-евим тестом.

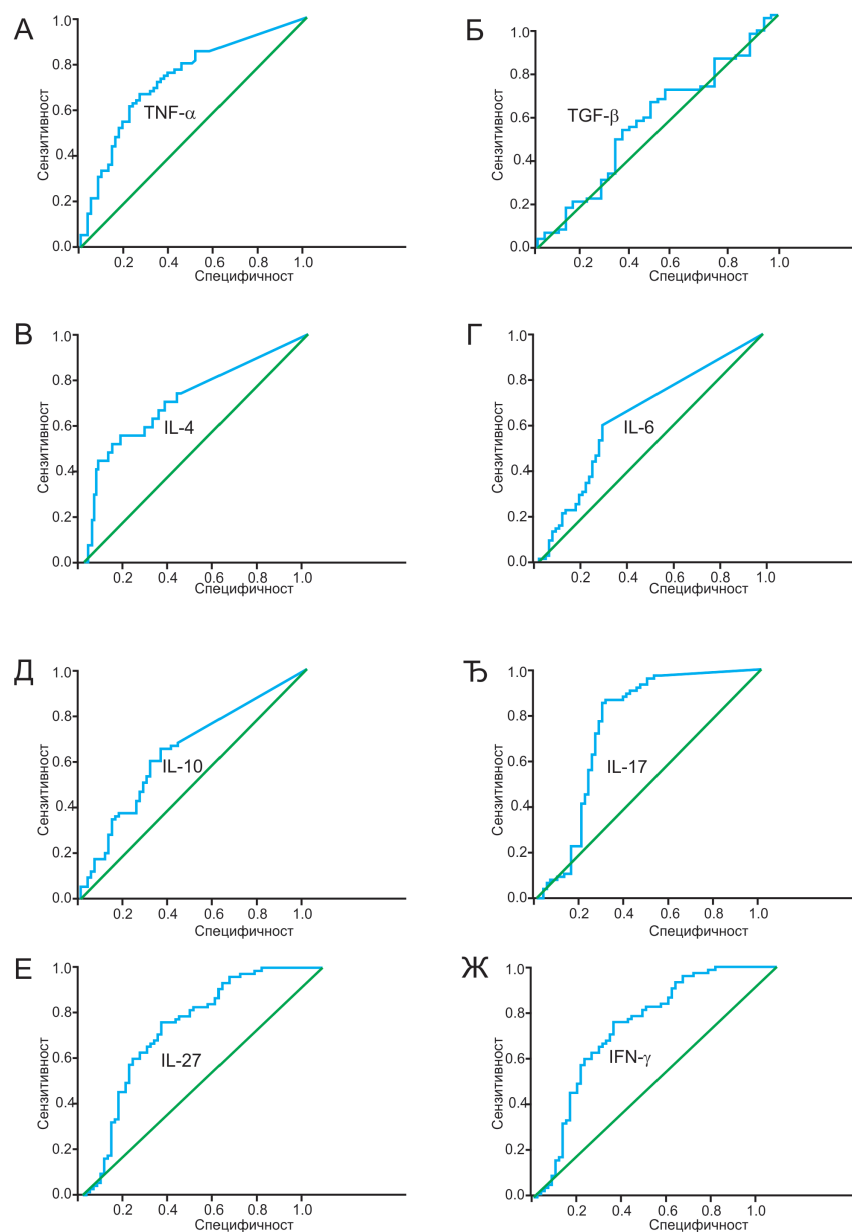
Додатно, анализирани су и односи серумских вредности контрарегулаторних цитокина при чему није забележена значајна разлика између група испитаника са колоректалним карциномом и улцерозним колитисом (Табела 29).

Табела 29. Односи контрарегулаторних цитокина у серуму код испитаника са улцерозним колитисом и колоректалним карциномом

Односи цитокина	CRC (медијана, минимум- максимум)	Улцерозни колитис (медијана, минимум- максимум)	p
IFN-α/IL-4	23,84 (1,76-5161,74)	6,91 (0,72-108,08)	p>0,05
IFN-γ/TGF-β	0,73 (0,00-27,75)	0,82 (0,025-16,77)	p>0,05
IFN-γ/IL-10	5,90 (0,16-2423,27)	4,09 (0,14-650,44)	p>0,05
IL-17/IL-10	4,70 (0,00-3099,67)	3,12 (0,00-1198,31)	p>0,05
IL-6/TGF-β	0,024 (0,00-7,99)	0,00 (0,00-9,70)	p>0,05
IL-27/IL-17	77,00 (0,00-1202,00)	116,67 (0,00-679,69)	p>0,05
IL-17/TGF-β	0,74 (0,00-37,87)	0,47 (0,00-34,89)	p>0,05

Анализа обухвата 75 испитаника са колоректалним карциномом и 24 болесника са улцерозним колитисом. Анализирани су односи системских вредности контрарегулаторних цитокина и упоређивани између оболелих од колоректалног карцинома и улцерозног колитиса. Статистичка значајност је тестирана Mann-Whitney-евим тестом.

4.4.2. Анализа логистичке регресије серумских нивоа TNF- α , TGF- β , IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, IL-27 и IFN- γ , код испитаника са улцерозним колитисом и колоректалним карциномом



Фигура 17. ROC (енгл. Receiver operating characteristic curve) анализа биомаркера у дијагнози колоректалног карцинома и улцерозног колитиса. ROC крива показује сензитивност и специфичност серумских нивоа TNF- α , TGF- β , IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, IL-27 и IFN- γ .

20А: AUC (TNF- α)=0,733, p=0,003, сензитивност 66,7%, специфичност 73,8%, cut off point 30 pg/ml;

20Б: AUC (TGF- β)=0,543, p=0,023, сензитивност 62,7%, специфичност 52,9%, cut off point 80 pg/ml;

20В: AUC (IL-4)=0,819, p=0,004, сензитивност 88,7%, специфичност 83,8%, cut off point 20 pg/ml;

20Г: AUC (IL-6)=0,640, p=0,045, сензитивност 60,0%, специфичност 71,6%, cut off point 30 pg/ml;

20Д: AUC (IL-10)=0,646, p=0,047, сензитивност 65,3%, специфичност 64,6%, cut off point 38 pg/ml;

20Ђ: AUC (IL-17)=0,753, p=0,002, сензитивност 85,3%, специфичност 70,8%, cut off point 40 pg/ml;

20Е: AUC (IL-27)=0,742, p=0,036, сензитивност 66,0%, специфичност 67,2%, cut off point 2858 pg/ml;

20Ж: AUC (IFN- γ)=0,753, p=0,002, сензитивност 83,3%, специфичност 55,2%, cut off point 62 pg/ml.

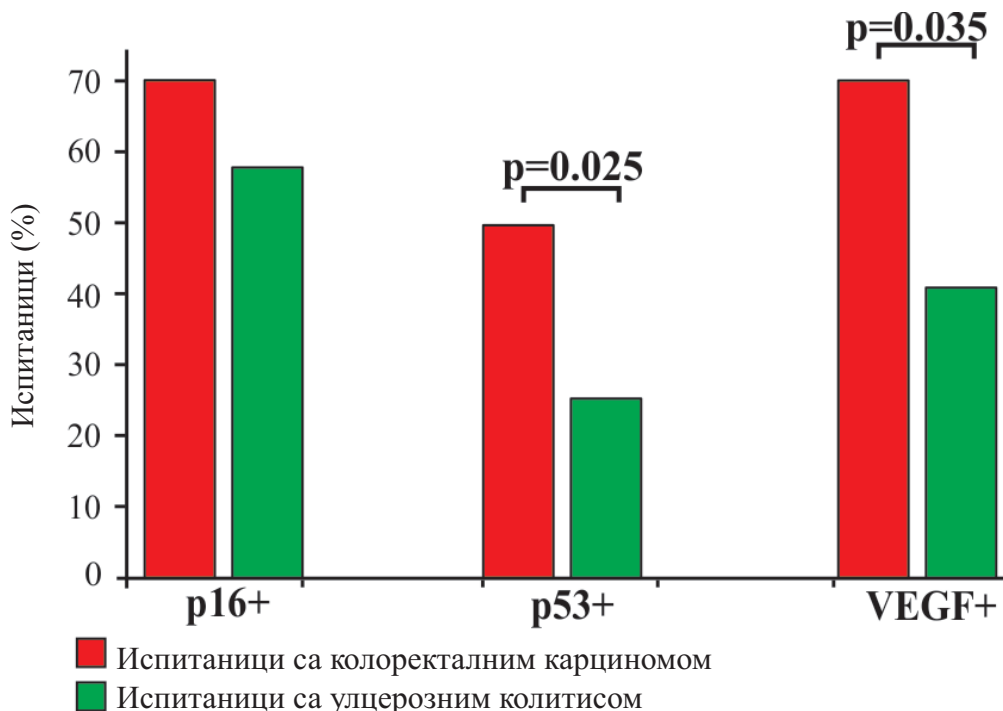
AUC (енгл. Area under the curve)

На фигури 17 приказана је ROC крива која илуструје однос специфичности и сензитивности цитокина и указује на цитокине који могу послужити као потенцијални маркери за дискриминацију испитаника са колоректалним карциномом од испитаника са улцерозним колитисом.

Бинарна логистичка регресија сугерише на то да пораст концентрације IL-4 корелира са улцерозним колитисом и да може да послужи као користан маркер улцерозног колитиса (area=0,819, p=0,001). Оптимална гранична концентрација IL-4 у серуму је 20 pg/ml и може да послужи за дискриминацију испитаника са улцерозним колитисом од испитаника са колоректалним карциномом (сензитивност 88,7%, специфичност 83,8%). Показано је и да IL-17 може бити користан маркер колоректалног карцинома (area=0,753, p=0,002). У овом случају оптимална гранична концентрација износи 40 pg/ml и ова концентрација IL-17 такође може да послужи за дискриминацију испитаника са колоректалним карциномом од улцерозног колитиса (сензитивност 85,3%, специфичност 70,8%).

4.4.3. Експресија ткивних маркера p16, p53 и VEGF код испитаника са колоректалним карциномом и улцерозним колитисом

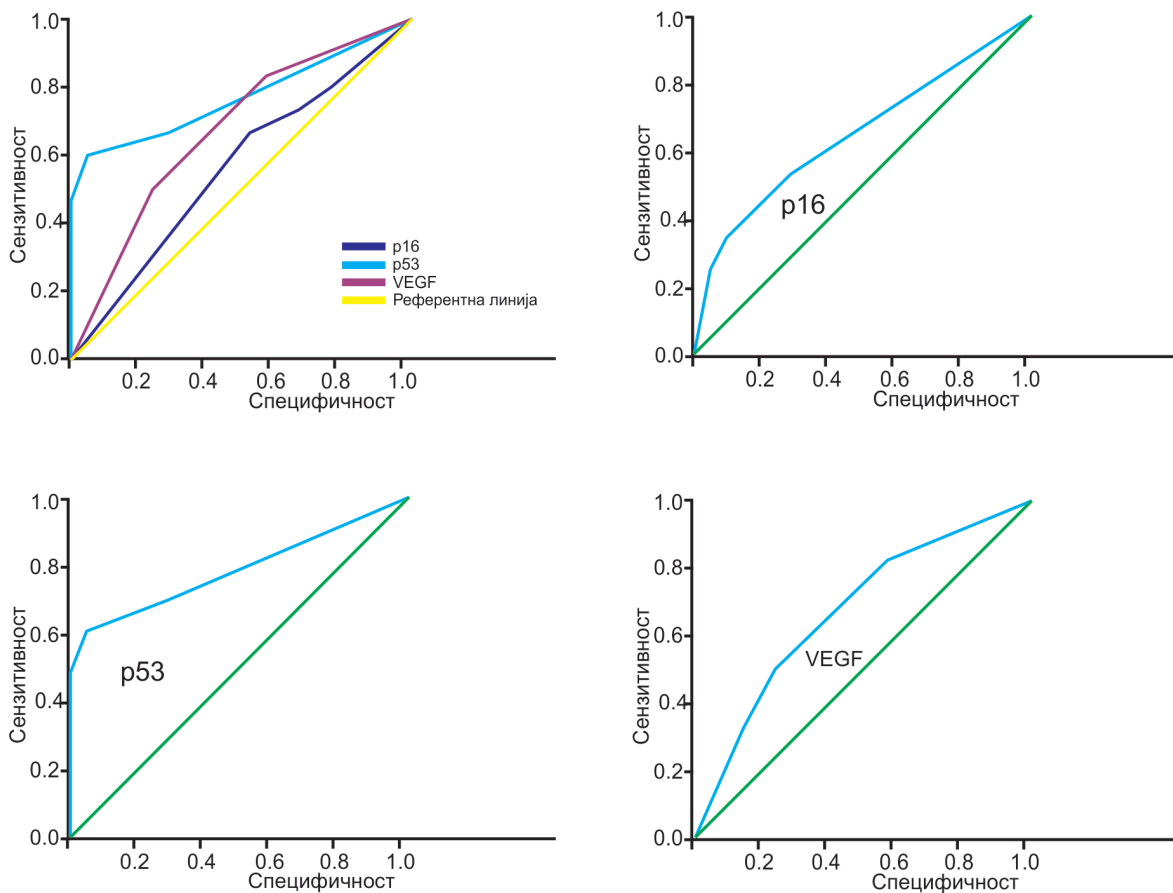
Уочава се значајна разлика у експресији p16, p53 и VEGF у циљаном ткиву између испитаника са улцерозним колитисом и испитаника са колоректалним карциномом. Другим речима, учесталост оболелих од колоректалног карцинома са позитивном експресијом p53 и VEGF у ткиву је статистички значајно већа у односу на оболеле од улцерозног колитиса са позитивном експресијом ових маркера ($p=0,025$, $p=0,035$) (Фигура 18).



Фигура 18. Експресија p16, p53 и VEGF код испитаника са колоректалним карциномом и улцерозним колитисом. Учесталост испитаника са позитивном експресијом p53 је статистички значајно већа код испитаника са колоректалним карциномом у односу на испитанике са улцерозним колитисом (50 vs. 25%, $p=0,025$). Учесталост испитаника са експресијом VEGF је статистички значајно већа код испитаника са колоректалним карциномом у односу на испитанике са улцерозним колитисом (68 vs. 40%, $p=0,035$). Не постоји статистички значајна разлика у учесталости испитаника са колоректалним карциномом и улцерозним колитисом у односу на експресију p16. Вредности су приказане процентима болесника. Статистичка значајност је тестирана Mann-Whitney-евим тестом.

4.4.4. Анализа логистичке регресије експресије ткивних маркера p16, p53 и VEGF код испитаника са улцерозним колитисом и колоректалним карциномом

Као што се види на фигури 19, бинарна логистичка регресија указује на то да повећана експресија p53 може бити користан маркер колоректалног карцинома (area=0,787, p=0,001, сензитивност 60,6%, специфичност 95,2%).



Фигура 19. ROC (енгл. Receiver operating characteristic curve) анализа биомаркера у дијагнози болесника са колоректалним карциномом од болесника са улцерозним колитисом. ROC крива показује сензитивност и специфичност ткивних маркера p16, p53 и VEGF.
 AUC (p16)=0,650, p=0,030, сензитивност 53,1%, специфичност 71,4%;
AUC (p53)=0,787, p=0,001, сензитивност 60,6%, специфичност 95,2%;
 AUC (VEGF)=0,674, p=0,020, сензитивност 50,0%, специфичност 76,2%.
 AUC (енгл. Area under the curve)

ДИСКУСИЈА

У првом делу истраживања анализирани су серумске концентрације цитокина и експресија ткивних маркера (p16, p53 и VEGF) код испитаника са инфламацијским болестима црева. Код испитаника са улцерозним колитисом са дијагностикованим екстраинтестиналним манифестацијама и компликацијама болести, забележена је преминација проинфламаторних, уз снижену серумску концентрацију антиинфламаторних цитокина. Такође су регистроване више системске вредности TNF- α код оболелих од улцерозног колитиса са позитивном експресијом p16 и VEGF у инфламираној слузници колона, као и повишене системске вредности IL-6 код ових испитаника са позитивном експресијом p16, p53 и VEGF. Највећи проценат оболелих од улцерозног колитиса са хистолошким градусом III је имао позитивну експресију p16, p53 и VEGF.

Резултати ове студије указују на пораст концентрације TNF- α и IL-6, као и односа IL-6/TGF- β и IL-17/TGF- β у серуму оболелих од Кронове болести у односу на испитанике са улцерозним колитисом. Позитивна експресија p16 и p53 у инфламираној слузници колона је детектована код већег процента испитаника са Кроновом болешћу, у односу на испитанике са улцерозним колитисом.

Други део нашег истраживања базиран је на анализи системских вредности цитокина и експресије ткивних маркера p16, p53 и VEGF код испитаника са колоректалним карциномом. Детектоване су снижене системске вредности проинфламаторних, уз повишене вредности имуносупресивних цитокина код оболелих од колоректалног карцинома са позитивном експресијом VEGF у туморском ткиву. Вредности односа IFN- γ /IL-10 су значајно мање код оболелих од колоректалног карцинома са позитивном експресијом p16, p53 и VEGF у туморском ткиву, у односу на испитанике са негативном експресијом ових маркера. Такође смо показали више системске вредности IL-4 код испитаника са колоректалним карциномом и позитивном експресијом p16 у туморском ткиву, као и код оних испитаника са истовременом експресијом и p16 и p53.

На крају су упоређене измерене вредности цитокина у серуму и експресија маркера p16, p53 и VEGF код испитаника са улцерозним колитисом и колоректалним карциномом. Наши налази указују на већи проценат оболелих од колоректалног карцинома са позитивном експресијом p16, p53 и VEGF у туморском ткиву, у односу на оболеле од улцерозног колитиса. Више вредности IL-4 су измерене у серуму испитаника са улцерозним колитисом, док су серумске вредности IL-17 значајно више код испитаника са колоректалним карциномом.

5.1. Анализа системских вредности цитокина код испитаника са улцерозним колитисом

Запаљенска болест црева (енгл. Inflammatory bowel disease, IBD) представља идиопатску хроничну запаљенску болест гастроинтестиналног тракта. Главне запаљенске болести црева су улцерозни колитис и Кронава болест. У нашем истраживању анализирано је 26 испитаника са улцерозним колитисом. Улцерозни колитис је инфламацијска болест дебелог црева која се карактерише запаљењем слузнице и у мањој мери субмукозе, а нису захваћени дубљи мишићни слојеви и сероза. У питању је континуирана лезија која најчешће почиње у ректуму и шири се проксимално (14). Изгледа да је неадекватан имунски одговор главни механизам у патогенези и прогресији улцерозног колитиса (186). За одбрану домаћина задужени су механизми урођене и стечене имуности. Одбрану у урођеној имуности обезбеђују моноцити/макрофаги, неутрофили, NK ћелије и NKT ћелије (енгл. Natural Killer T cells, NKT cells), док су главне компоненте стечене имуности В лимфоцити (у хуморалној имуности) и Т лимфоцити (у целуларној имуности). Лимфоцити су ћелије са јединственим специфичним рецепторима за антигене. Ефекторски CD8⁺ Т лимфоцити се називају цитотоксички Т лимфоцити који убијају ћелије инфициране интрацелуларним микроорганизмима, док су CD4⁺ Т лимфоцити помагачки Т лимфоцити (helper-Th), који помажу В лимфоцитима да продукују антитела и фагоцитима да униште ингестиране микроорганизме. Th лимфоцити усмеравају имунски одговор и профилишу функцију других ћелија имунског система секрецијом цитокина (1). CD4⁺ помагачки Т лимфоцити (енгл. T helper, Th0) могу се диференцирати у ефекторске ћелије Th1, Th2 и Th17 лимфоците које продукују различит сет цитокина којима обављају различите ефекторске функције. Најважнији цитокини Th1 лимфоцита су IFN- γ и IL-2, а Th2 лимфоцита су IL-4, IL-5, IL-10 и IL-13.

Th17 лимфоцити су нова класа CD4⁺ лимфоцита, која је име добила по главном цитокину који продукују, а то је IL-17. Th1 лимфоцити покрећу ћелијски имунски одговор у борби против вируса и других интрацелуларних микроба, учествују у елиминацији туморских ћелија и индукују касни тип преосетљивости. Th2 лимфоцити имају широк опсег активности као што су инхибиција макрофага; стимулација В лимфоцита да секретују IgE, који су важни у одбрани од паразитарних инфекција; индукција алергијских реакција тако што активирају мастоците, базофилне и еозинофилне леукоците (187). Th17 лимфоцити продукују IL-17 којим стимулишу фибробласте, ендотелне ћелије, макрофаге и епителне ћелије да продукују бројне проинфламаторне медијаторе укључујући IL-1, IL-6, TNF- α , NOS-2, металопротеиназе и хемокине (188). Th17 лимфоцити су важни у имунском одговору на опсежне повреде тако што обезбеђују брзо „регрутовање“ неутрофилних леукоцита и спречавају некрозу ткива и и развој сепсе (189). Овим се „купује време“ до развоја снажног антимикробног Th1- одговора.

У серуму испитаника са улцерозним колитисом су измерене знатно више вредности TNF- α , TGF- β , IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, IL-27 и IFN- γ , у односу на контролну групу испитаника (Табела 2). Сматрамо да је овакав цитокински профил последица неадекватног имунског одговора код болесника са улцерозним колитисом.

Обзиром да резултати друге студије указују на то да анализа Th1 и Th2 имунског одговора може бити показатељ индивидуалног тока болести (190), у овом истраживању су разматрани и односи контрарегулаторних цитокина. Тако су

измерени и значајно већи односи серумских вредности контрарегулаторних цитокина (IFN- γ /IL4, IFN- γ /TGF- β , IFN- γ /IL-10, IL-17/IL-10, IL-6/TGF- β , IL-27/IL-17 и IL-17/TGF- β) код испитаника са улцерозним колитисом, у односу на контролну групу здравих испитаника (Табела 3). Резултати ове студије сугеришу на доминацију проинфламаторних у односу на антиинфламаторне цитокине код испитаника са улцерозним колитисом.

5.1.1. Код испитаника са улцерозним колитисом и израженим екстраинтестиналним манифестацијама значајно су повећане серумске вредности проинфламаторних цитокина

У зависности од постојања екстраинтестиналних манифестација (анемија, коштанозглобне промене, кожне промене) (61, 62) у овом истраживању сви испитаници са улцерозним колитисом су сврстани у групу испитаника са и без екстраинтестиналних манифестација.

У серуму испитаника са улцерозним колитисом и дијагностикованим екстраинтестиналним манифестацијама, измерена је знатно виша вредност IL-6 (Фигура 4А), више вредности CRP (Фигура 4Г), веће вредности односа IL-17/IL-10 (Фигура 5Б), а ниже вредности IL-10 (Фигура 4Б), у односу на испитанике без екстраинтестиналних манифестација.

Улцерозни колитис је инфламацијска болест црева, коју карактеришу хронична инфламација и последична деструкција интестиналног епитела. Примећено је да су индукција и прогресија улцерозног колитиса у корелацији са проинфламаторним имунским одговором (191). Повећана експресија проинфламаторних цитокина, укључујући TNF- α , IL-1 β , IL-6 и IL-8 (194, 195) уз одсуство имуносупресивног цитокина IL-10 су обележја интестиналне инфламације у улцерозном колитису (186, 191, 192).

Резултати спроведеног истраживања указују на значајан пораст концентрације IL-6 у серуму оболелих од улцерозног колитиса који корелира са присуством екстраинтестиналних манифестација. Ћелијски извор IL-6 могу бити макрофаги, ендотелне ћелије и Т лимфоцити, а његове главне биолошке функције су синтеза протеина акутне фазе у јетри и пролиферација В лимфоцита, као и продукција антитела (1).

Код болесника са улцерозним колитисом, IL-6 као проинфламаторни цитокин, игра кључну улогу у индукцији и одржавању интестиналне инфламације, односно у IL-6 зависној инфламаторној каскади (193, 194). Значајан је медијатор локалног имунског одговора (195-197) и серумске концентрације овог цитокина корелирају са тежином болести (198). Интестинални макрофаги и CD4⁺ Т лимфоцити у запаљенском ткиву секретују IL-6 и његов солубилни рецептор (sIL-6R). Формирани комплекси IL-6-sIL-6R интер-реагују са gp130 на мембрани CD4⁺ Т лимфоцита и на тај начин индукују повећану експресију и нуклеарну транслокацију молекула STAT3, који затим стимулише повећану експресију антиапоптоличких протеина као што је Bcl-x1. На тај начин се повећава резистенција Т лимфоцита у ламини проприи на апоптозу (199). Значајна улога му се приписује и у настанку колоректалног карцинома на терену инфламације (194).

Ниво CRP-а расте у реакцији акутне фазе на инфекцију (1). CRP је маркер инфламације и протеин акутне фазе који настаје пре свега у јетри у одговору на стимулацију интерлеукина IL-6 (70, 200). У спроведеној студији испитаници са

екстраинтестиналним манифестацијама су имали значајно више серумске вредности и IL-6 и CRP-а, што се сматра ефектом IL-6. Забележен је и значајан пораст односа серумских вредности IL-17/IL-10 код испитаника са улцерозним колитисом код којих су дијагностиковане екстраинтестиналне манифестације.

IL-6 као проинфламаторни цитокин, кога продукују моноцити/макрофаги и Th17 лимфоцити промовише развој Th17 имунског одговора (1). Основни механизам Th17 поларизације је добро познат. IL-6, у синергији са TGF- β индукује развој Th17 лимфоцита (1). Такође регулише опстанак других проинфламаторних Т лимфоцита, као што су Th1 лимфоцити, а инхибира функцију Treg лимфоцита (201). Резултати спроведене студије указују на пораст IL-6 у серуму испитаника са улцерозним колитисом код којих су дијагностиковане екстраинтестиналне манифестације, а непромењене вредности TGF- β могу да сугеришу да је IL-6 кључни посредник у развоју Th17 имунског одговора.

Проинфламаторни цитокин IL-17 претежно продукују активирани CD4⁺T лимфоцити (202), али и CD8⁺ Т лимфоцити такође могу да продукују IL-17 (203, 204). IL-17 игра значајну улогу и у патогенези бројних обољења као што су реуматоидни артритис, мултипла склероза, системска склероза, системски еритемски лупус, псоријаза и бронхијална астма (205-213). Повећана експресија IL-17 у слузници црева и његова повишена концентрација у серуму болесника са улцерозним колитисом, указују на важну улогу IL-17 у патогенези улцерозног колитиса (214). У овом истраживању регистрован је пораст концентрације IL-17 код испитаника са улцерозним колитисом што је сагласно са налазом других студија (215). Као ефекторски цитокин IL-17, делује углавном у заршним фазама запаљења (216, 217).

У серуму оболелих од улцерозног колитиса са дијагностикованим екстраинтестиналним манифестацијама измерена је знатно нижа концентрација антиинфламаторног IL-10.

Цитокин IL-10 продукују макрофаги, дендритске ћелије (218), Th2 и Treg лимфоцити (219). Главне ћелијске мете IL-10 су макрофаги и дендритске ћелије, а најзначајнији биолошки ефекти овог цитокина су инхибиција продукције IL-12, смањена експресија костимулатора и МНС молекула II класе (1). IL-10 инхибира ослобађање проинфламаторних цитокина из Т лимфоцита и макрофага (220) и слаби инфламаторни одговор у слузници црева. Снижена експресија IL-10 је детектована у инфламираној слузници колона код болесника са улцерозним колитисом (221). Резултати ове студије сугеришу на то да је релативно низак ниво IL-10 код испитаника са улцерозним колитисом, недовољан да супримира продукцију IL-6 и следствено TNF- α , IFN- γ и IL-17. Уз то, налаз овог истраживања указују на то да однос контррегулаторних цитокина (IL-17/IL-10) може представљати значајан маркер прогресије болести због корелације са екстраинтестиналним манифестацијама.

5.1.2. Постојање компликација код испитаника са улцерозним колитисом је у позитивној корелацији са вишим серумским нивоима проинфламаторних цитокина

У зависности од постојања компликација као што су стриктуре, псеудополипи и диспластичне лезије слузнице (35,56) у овом истраживању испитаници са улцерозним колитисом су категорисане у групе са и без компликација.

У серуму оболелих од улцерозног колитиса са дијагностикованим компликацијама измерена је знатно нижа концентрација IL-10 (Фигура 5А) и веће вредности односа IFN- γ /IL-10 (Фигура 5Б), у односу на болеснике без компликација.

IFN- γ је цитокин урођене и стечене имуности. Ћелијски извор IFN- γ су NK ћелије и CD4⁺ и CD8⁺ лимфоцити (6,7,8). Главни је цитокин Th1-типа и који делује на макрофаге тако што повећава њихову убилачку способност и презентацију антигена, повећава активност NK ћелија, а инхибира развој Th2 лимфоцита и фаворизује развој Th1 лимфоцита (13).

У анималним моделима је показано да IL-10 инхибира секрецију IFN- γ у активираним Th1 лимфоцитима и NK ћелијама и спречава ефекте IFN- γ на макрофаге (222-225, 227). Резултати других истраживања указују на повишене серумске вредности IFN- γ код болесника са улцерозним колитисом (226), у односу на здраве испитанике.

Налаз ове студије сугерише на доминацију типа 1 одговора, са знатно нижим серумским концентрацијама IL-10 и значајно већим односом IFN- γ /IL-10 код оболелих од улцерозног колитиса код којих су дијагностиковане компликације. Ова снижена концентрација IL-10 код испитаника са улцерозним колитисом је вероватно недовољна да инхибира продукцију IFN- γ . Претпостављамо да у условима повећане продукције IFN- γ и доминације типа 1 одговора, интензивнија је инфламација и последично оштећење ткива.

5.1.3. Степен клиничке активности болести код испитаника са улцерозним колитисом је у позитивној корелацији са вишим системским вредностима CRP-а

У односу на степен клиничке активности улцерозног колитиса испитаници су сврстани у три групе: испитаници са благом, умерено-тешком и тешком формом болести. Испитаници са благом активношћу болести имају ≤ 3 столице дневно, са незнатним крварењем и минималном анемијом, нормалну телесну температуру и нормалан пулс, седиментацију < 30 mm/сат и немају системске манифестације. Испитаници са умерено тешком активношћу болести имају 4-6 столице дневно, изражено крварење и анемију, повишену телесну температуру, тахикардију, седиментацију еритроцита > 30 mm/сат и код њих се дијагностикују екстраинтестиналне манифестације. Испитаници са тешком формом болести имају ≥ 7 течних столица дневно уз крварење из ректума, знаке токсичности и системске манифестације као што су висока телесна температура, губитак телесне тежине $\geq 10\%$, дехидратација, ортостатска хипотензија, тешка анемија и вредности хемоглобина ≤ 10 g/dL, хипоалбуминемија и потребом за хоспитализацијом (29).

Више концентрације CRP у серуму су измерене код испитаника са тешком у односу на благу болест, као и код испитаника са умереном у односу на благу болест (Фигура 6А).

CRP је маркер запаљења и важан молекул урођеног имунског система домаћина. Познато је да представља протеин акутне фазе који се синтетише у јетри у одговору на стимулацију IL-6. Бројне студије су испитале везу серумских вредности CRP-а са клиничком активношћу болести код болесника са улцерозним колитисом (228-231).

Craig и сарадници су регистровали позитивну корелацију CRP-а са клиничком активношћу болести (232) што је сагласно са налазом ове студије. У другој студији (229) такође је забележена значајна корелација серумских вредности CRP-а са активношћу болести, док нека друга истраживања нису потврдила ову корелацију (228). Неки аутори сугеришу на дијагностички значај CRP и корелацију овог маркера запаљења са повећаним задебљањем зида црева, које је у основи најтежег степена активности болести (230). Анализом вредности CRP у зависности од проксималне или дисталне локализације лезија у цреву, утврђено је да је CRP специфичан маркер инфламације проксималних делова црева (233).

Претходне студије које су испитивале маркере инфламације, укључујући и CRP, указују на то да инфламација представља повећан ризик за настанак карцинома (70, 235, 236). Сматра се да IL-6 промовише колоректалну карциногенезу на терену инфламације (237). У овој студији је забележен пораст серумске концентрације IL-6 и CRP код испитаника код којих су дијагностиковане екстраинтестиналне манифестације. На основу овог налаза може се закључити да пораст концентрације циркулишућих маркера инфламације, посебно CRP могу да представљају претходне факторе прогресије болести.

5.1.4. Степен хистолошких промена слузнице колона оболелих од улцерозног колитиса је у позитивној корелацији са вишим серумским вредностима TNF- α и CEA

На основу степена хистолошких промена слузнице колона (детално описан у поглављу материјал и методе) испитаници са улцерозним колитисом су категорисани у три групе: испитаници са хистолошким градусом I, испитаници са хистолошким градусом II и испитаници са хистолошким градусом III.

У спроведеној студији документовано је да су концентрације TNF- α и CEA значајно више у серуму испитаника са најтежим степеном хистолошких промена инфламиране слузнице (са хистолошким градусом III).

TNF- α је кључни медијатор у патогенези инфламацијских болести црева (238). Ћелијски извор овог цитокина су активирани моноцити, макрофаги, T лимфоцити и фибробласти (239). Интензивно се продукује у раној фази инфламације. Свој проинфламаторни ефекат, TNF- α остварује, тако што регрутује леукоците и повећава пермеабилност ендотела и експресију адхезивних молекула на ендотелу. Уз то, стимулише продукцију IL-8, функционалну активацију неутрофила и еозинофила, пролиферацију и повећану синтезу металопроотеиназа у фибробластима и индукује повећану синтезу протеина акутне фазе у јетри. Неутрализација TNF- α резултира смањењем миграције запаљенских ћелија и зацељењем слузнице колона (240, 241). Резултати истраживања Migati-ја и сарадника указују на значајан пораст серумске вредности TNF- α код болесника са улцерозним колитисом који корелира са степеном инфламације и степеном хистолошких промена инфламиране слузнице колона (198), што је сагласно са налазом ове студије. На основу резултата ове и других студија може се закључити да повишене вредности TNF- α индукују интензиван запаљенски одговор праћен повећаном миграцијом леукоцита и следствено већим оштећењем локалног ткива, што је у директној корелацији са степеном хистолошких промена инфламиране слузнице колона.

У спроведеној студији у групи испитаника са хистолошким градусом III, поред повећане концентрације TNF- α (Фигура 7A), забележен је и значајан пораст

серумских вредности СЕА (Фигура 7Б). Повећане концентрације СЕА су детектоване код оболелих од колоректалног карцинома, али и других карцинома (плућа, дојка, желуца, панкреаса). Уз то, пораст концентрације СЕА је документован и код болесника са цирозом јетре и панкреатитисом, као и код запаљенских болести црева и да пораст овог маркера корелира са тежином болести (242). На основу свега наведеног може се претпоставити да у овој студији пораст концентрације СЕА код оболелих од улцерозног колитиса са најтежим степеном хистолошких промена може да послужи као показатељ прогресије болести.

Новије студије показују повећану продукцију IL-17 код болесника са улцерозним колитисом (243) и корелацију између тежине болести и IL-17, кога секретују мононуклеарне ћелије периферне крви болесника са улцерозним колитисом, стимулираних липополисахаридом (22).

Налаз овог истраживања сугерише на то да релативно ниска серумска концентрација IL-10 код испитаника са тешком формом улцерозног колитиса, не може да компензује секрецију IL-6 и следствено TNF- α , IFN- γ , IL-17 и појачан имунски одговор типа-1 и типа-17.

5.1.5. Експресија p16 и VEGF у инфламираној слузници колона код испитаника са улцерозним колитисом је детектована у знатно већем проценту болесника са хистолошким градусом III

Свим испитаницима са улцерозним колитисом узимане су биопсије инфламиране слузнице колона и на њима одређивана експресија ткивних маркера p16, p53 и VEGF. Фактор раста васкуларног ендотела (VEGF, енгл. Vascular Endothelial Growth Factor), игра важну улогу у физиолошкој ангиогенези, укључујући процесе ембриогенезе, раста скелета и зарастања рана. С друге стране, овај фактор раста је важан и у патолошкој ангиогенези, која је карактеристична за малигне туморе, реуматоидни артритис и дијабетичну ретинопатију (244). VEGF је укључен у ангиогенезу тако што стимулише миграцију и пролиферацију ендотелних ћелија крвних судова (245). Експресију VEGF продукују активирани макрофаги, неутрофили, фибробласти и епителне ћелије. Повећана експресија VEGF се индукује у условима хипоксије и под утицајем различитих фактора као и IL-1 и IL-6 (245, 246). Карактеристична хипоксија, присутна како у колоректалном карциному тако и у инфламацијским болестима црева, стимулише повећану синтезу VEGF под утицајем транскрипционог фактора HIF-1 α (151).

Ангиогенеза, формирање нових из већ постојећих крвних судова, игра кључну улогу у расту и метастазирању тумора, као и у акутном и хроничном запаљењу (247, 248, 249). Прогресивна исхемија и пролиферација ендотелних ћелија крвних судова у субмукози, као и повећане серумске концентрације цитокина који промовишу ангиогенезу су карактеристика инфламацијских болести црева (250). Улцерације и регенерација интестиналног епитела су карактеристични за запаљенске болести црева, због чега је ангиогенеза такође важан патолошки процес у патогенези улцерозног колитиса (251, 252).

VEGF је кључни медијатор ангиогенезе, али улога тумор супресорских гена у ангиогенези је и даље предмет истраживања.

Тумор супресорски ген p16^{ink4a} је инхибитор циклин зависне киназе -4 и -6 и резултати досадашњих истраживања указују на то да постоји значајна корелација између смањене експресије p16^{ink4a} и прогресије тумора (87). Поред улоге у

карциногенези, као инхибитор прогресије ћелијског циклуса, p16^{ink4a} игра важну улогу у модулацији имунског одговора. Мутације гена за p16 се детектују у око 10% болесника са улцерозним колитисом код којих нису дијагностиковане диспластичне лезије и учесталост мутације овог гена значајно расте са повећањем степена хистолошких промена инфламиране слузнице колона, која код колоректалног карцинома износи 100% (253). У улцерозном колитису, експресија p16 протеина је у корелацији са степеном хистолошких промена инфламиране слузнице колона и може послужити као прогностички фактор дисплазије слузнице, које представљају преканцерозну лезију (152).

У овој студији анализирана је експресија p16, p53 и VEGF у инфламираној слузници колона оболелих од улцерозног колитиса у зависности од хистолошког градуса при чему је експресија p16 и VEGF детектована у знатно већем проценту болесника са најтежим степеном хистолошких промена слузнице (са хистолошким градусом III) (Табела 4).

На основу овог налаза може се закључити да прогресија улцерозног колитиса је праћена повећаном експресијом p16. Сматра се да повећана експресија p16, представља аберантну форму p16 и да овако измењен тумор-супресорски ген p16, индукује повећану експресију и продукцију VEGF. Друге студије документују повећане концентрације VEGF у серуму, као и повећану експресију овог фактора раста у инфламираној слузници болесника са улцерозним колитисом (254-257). Локална ангиогенеза корелира са активношћу болести и са степеном хистолошких промена слузнице колона код болесника са улцерозним колитисом (258).

5.1.6. Оболели од улцерозног колитиса са позитивном експресијом ткивних маркера p16, p53 и VEGF имају више системске вредности проинфламаторних цитокина

У спроведеној студији забележен је пораст серумске концентрације TNF- α у групама испитаника са појединачном позитивном експресијом p16 и VEGF (Фигура 3А), док је пораст концентрације IL-6 у серуму регистрован у групама испитаника са позитивном експресијом p16, p53 и VEGF (Фигура 3Б).

Ген за p53, тумор-супресорски ген, се налази на кратком краку хромозома 17 (17p). У нормалној ћелији контролише репликацију DNA. Описује се као „чувар генома” који препознаје оштећење DNA, зауставља ћелијски циклус, дајући ћелији довољно времена да обави поправку оштећене DNA, а ако је ово оштећење превелико за поправку, индукује апоптозу односно програмирану ћелијску смрт. Губитак функције гена p53 за последицу може имати даље дељење ћелије са генетским оштећењем (85, 86). Мутације гена p53 су регистроване у инфламираној слузници колона болесника са улцерозним колитисом, без дијагностикованог колоректалног карцинома, што указује да хронична инфламација предиспонира настанак раних мутација (140). Мутације гена p53 су регистроване код 6% особа са улцерозним колитисом у слузници колона без дисплазије, 9% са неодређеном дисплазијом, 33% са дисплазијом ниског степена и код 63% особа са дисплазијом високог степена (259). Експресија p53 је значајни показатељ и активности улцерозног колитиса и у позитивној је корелацији са степеном активности болести (260) и са степеном хистолошких промена инфламиране слузнице колона (134).

Учесталост мутација p53 и p16 расте са степеном хистолошких промена слузнице колона код болесника са улцерозним колитисом и претходи појави карцинома.

Претпоставља се да у колоректалном карциному и инфламацијским болестима црева оксидативни стрес има важан допринос у мутацији p53 (261).

Неке студије указују на то да алтерације тумор-супресорских гена доприносе неоваскуларизацији у измењеној цитокинској средини (262, 263). Wild type p53 негативно регулише експресију VEGF и на тај начин инхибира ангиогенезу, у различитим туморима (264, 265). У складу са тим мутирани облици p53 у позитивној су корелацији са експресијом VEGF код неколико различитих тумора (266, 267). Такође, wild type p16 редукује ангиогенезу тако што смањује експресију VEGF (158). У моделу реуматоидног артритиса показано је да p16 смањује секрецију IL-6 у моноклеарним ћелијама (268). Претпоставља се да је изражена ангиогенеза последица дисфункције мутираних форми p16 и p53 (269). Овако измењени тумор-супресорски гени индукују експресију VEGF. Поред добро познате улоге у ангиогенези, сматра се да VEGF игра улогу и у модулацији имунског одговора. Kim YS и сарадници (270) су документовали да је VEGF кључни медијатор у активацији Т лимфоцита у дисајним путевима. Показано је да VEGF посредује регрутovanje инфламаторних ћелија и повећава експресију костимулативних молекула на регрутованим ћелијама имунског система, што индукује продукцију проинфламаторних Th17 и Th1 цитокина. Поред тога, Vasu и сарадници (155) указују на значајну улогу VEGF у проинфламаторном одговору, као и у појачавању функције меморијских Т ћелија. Претпостављамо да је експримирани p16 у инфламираној слuzници претежно мутирани облик и као такав не инхибира експресију VEGF који пак може деловати фацититирајуће на проинфламаторни одговор.

5.2. Анализа системских вредности цитокина код испитаника са улцерозним колитисом и Кроновом болешћу

Тип имунског одговора је различит у Кроновој болести и улцерозном колитису, што потврђују и патохистолошке промене. Тако на пример у Кроновој болести је карактеристично формирање гранулома, док у улцерозном колитису се региструје инфилтрација неутрофила уз деструкцију епитела. У Кроновој болести доминира Th1 тип имунског одговора (уз продукцију IL-2, IL-8, IL-12, IFN- γ и TNF- α) (21). У улцерозном колитису доминира Th2 тип имунског одговора (са продукцијом IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 и IL-13), који стимулише хуморалну имуност (21).

У овој студији, забележена је значајно виша концентрација TNF- α (фигура 9А) и IL-6 (фигура 9Б) у серуму оболелих од Кронове болести у односу на испитанике са улцерозним колитисом.

Улога TNF- α у патогенези Кронове болести је добро позната (18).

Овај пораст концентрације TNF- α у серуму болесника са Кроновом болешћу је у сагласности са подацима из литературе који указују на то да код ових болесника доминира Th1 тип имунског одговора (18, 21, 27). На основу претходно наведених налаза може се претпоставити да повишена концентрација TNF- α индукује производњу IL-6, што резултира порастом IL-6 у серуму болесника са Кроновом болешћу. Оштра подела на два типа имунског одговора није увек присутна, тако да се врло често могу уочити преклапања. У тим случајевима кључни фактор је промена микросредине и микрофлоре колона. Поред генетских фактора и микрофлора колона значајно утиче на имунски одговор. Промене у микросредини су карактеристичне код ентероентералних фистула у Кроновој болести, код проктоколектомије у случају улцерозног колитиса и приликом давања пробиотика

(18). Пораст концентрације IL-6 код болесника са Кроновом болешћу у овој студији може се објаснити тиме што су сви болесници имали фистулизирајућу форму Кронове болести. Може се закључити да је фистулизирајућа форма болести узроковала промену у микросредини колона и последичну промену типа имунског одговора.

У спроведеној студији је документовано да у серуму болесника са Кроновом болешћу постоје значајно веће вредности односа IL-6/TGF- β (Фигура 9А) и IL-17/TGF- β (Фигура 9Б), у односу на болеснике са улцерозним колитисом.

Поред системских вредности цитокина, анализирани су и количници серумских концентрација контрарегулаторних цитокина: IL-6, IL-17 и TGF- β .

TGF- β је инхибиторни цитокин и кључни регулатор имунске хомеостазе и инфламације. У здравим ћелијама, TGF- β супримира ћелијску пролиферацију и индукује диференцијацију и апоптозу ћелије. TGF- β спречава пролиферацију леукоцита и њихову активацију и на тај начин игра виталну улогу у инхибицији инфламаторног процеса и његовог ширења. Смањена активност TGF- β се сматра одговорном за развој аутоимунских поремећаја, код различитих болести, укључујући и инфламацијске болести црева (271). TGF- β је један од најмоћнијих регулатора производње и депоновања компоненти екстрацелуларног матрикса.

Стимулише фибробласте и друге ћелије да производе протеине екстрацелуларног матрикса, смањује производњу ензима који деградирају екстрацелуларни матрикс и повећава производњу протеина који инхибирају ензиме одговорне за разградњу екстрацелуларног матрикса (271). Повећана продукција проинфламаторних цитокина, редукује секрецију TGF- β (271). TGF- β као мултифункционални цитокин, негативан је регулатор инфламације слузнице црева (272). TGF- β је значајан за настанак регулаторних Т лимфоцита (273). Регулаторни Т лимфоцити могу да настану у тимусу од наивних Т лимфоцита у присуству IL-2 и TGF- β и означавају се као природни регулаторни Т лимфоцити. На периферији, наивни CD4⁺ Т лимфоцити у присуству TGF- β , који активира сигнални молекул STAT5 и транскрипциони фактор Foxp3, могу се конвертовати у индуцибилне регулаторне Т лимфоците. Регулаторни Т лимфоцити продукују велику количину TGF- β који има значајну улогу у одржавању периферне имунотолеранције и у имуносупресији (274). Th17 лимфоцити представљају субпопулацију помагачких Т лимфоцита, које су први пут изоловане из периферне крви болесника оболелих од Кронове болести, као субкласа лимфоцита која продукује велику количину IL-17 и IL-23 (275). Сматра се да Th17 лимфоцити промовишу ткивну деструкцију током инфламаторног процеса и да су значајне за настанак и развој хроничних инфламацијских болести (276).

TGF- β у комбинацији са IL-6 усмерава диференцијацију наивних Т лимфоцита у правцу Th17 лимфоцита (272, 276, 277, 278). Учешће TGF- β у процесу настанка Th17 лимфоцита, је прилично изненађујућа, обзиром да TGF- β самостално има антиинфламаторно дејство и значајан је за генерисање регулаторних Т лимфоцита (276). Претпоставља се да постоји природни антагонизам између Th17 и регулаторних Т лимфоцита, односно да у одсуству инфламаторног окружења, продукован TGF- β ће индуковати супресију ефекторских Т лимфоцита и настанак регулаторних Т лимфоцита, што је важно за одржавање имунотолеранције. У случају инфламације, цитокин IL-6, супримира настанак регулаторних Т лимфоцита и индукује настанак проинфламаторног Т ћелијског одговора, преодоминантно посредованог Th17 лимфоцитима (273). IL-6 је проинфламаторни цитокин који има важну улогу у патогенези инфламацијских болести.

У поларизацији Th17 имунског одговора значајне су ниске серумске вредности TGF- β и IL-1 (279). Типичан цитокин Th17 имунског одговора је IL-17. IL-17 је значајан у патогенези Кроне болести и моћан је индуктор локалне инфилтрације неутрофила (280). Уз то, индукује експресију проинфламаторних цитокина (TNF- α , IL-1, IL-6) (281) и нуклеарног фактора раста (NF- κ B) и MAPK киназе (282). Делује на фибробласте и индукује секрецију металопротеиназа и даље доприноси оштећењу ткива (283). Налаз ове студије јасно показује преминацију проинфламаторног тип 1 и 17 имунског одговора, као и повећан однос IL-6/TGF- β и IL-17/TGF- β код испитаника са Кроновом болешћу у односу на испитанике са улцерозним колитисом.

5.2.1. Експресија p16, p53, и VEGF у инфламираној слузници колона испитаника са улцерозним колитисом и Кроновом болешћу

У спроведеној студији проценат испитаника са Кроновом болешћу који имају позитивну експресију p16 и p53 је статистички значајно већи у односу на испитанике са улцерозним колитисом (Фигура 10).

Васкуларна пролиферација у субмукози је карактеристика Кроне болести (18). У овом истраживању сви испитаници са Кроновом болешћу су имали најтежи степен хистолошких промена инфламиране слузнице колона (хистолошки градус III), што није био случај са испитаницима са улцерозним колитисом. Код инфламацијских болести црева, експресија p16 гена (284) и p53 гена (285) је у корелацији са степеном хистолошких промена инфламиране слузнице црева. Претпостављамо да виши степен хистолошких промена слузнице прате и веће промене у генима p16 и p53. Код болесника са Кроновом болешћу документоване су повишене вредности FGF (енгл. Fibroblast growth factor), једног од кључних стимулаторних цитокина ангиогенезе (18). Налаз ове студије указује на то да је проценат испитаника са Кроновом болешћу који експримирају VEGF већи од процента испитаника са улцерозним колитисом, али није показана статистичка значајност.

5.3. Анализа серумских вредности цитокина код испитаника са колоректалним карциномом

Колоректални карцином је један од најчешћих и најагресивнијих карцинома. Антитуморски имунски одговор је регулисан бројним факторима, укључујући цитокине које продукују тумор инфилтришући лимфоцити или активирани макрофаги, дендритске ћелије и они лимфоцити који не инфилтришу тумор. Цитокини, настали локално и системски, играју значајну улогу у индукцији и обликовању имунског одговора, који може да супримира раст или да фаворизује прогресију тумора (286, 287).

У серуму испитаника са колоректалним карциномом су измерене знатно више вредности TNF- α , TGF- β , IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, IL-27 и IFN- γ , у односу на контролну групу здравих испитаника (Табела 18).

Такође је забележен и значајан пораст односа серумских вредности контрарегулаторних цитокина (IFN- γ /IL4, IFN- γ /TGF- β , IFN- γ /IL-10, IL-17/IL-10, IL-6/TGF- β , IL-27/IL-17 и IL-17/TGF- β) код испитаника са колоректалним карциномом, у односу на контролну групу испитаника (Табела 19).

5.3.1. Анализа експресије p16, p53 и VEGF у циљаном ткиву испитаника са колоректалним карциномом и улцерозним колитисом

Резултати наших истраживања спроведених имунохистохемијском техником, приказани у овом раду на фигури 17 недвосмислено су показали да је проценат испитаника са колоректалним карциномом са позитивном експресијом p16, p53 и VEGF статистички значајно већи у односу на испитанике са улцерозним колитисом. Хронично запаљење, у основи инфламацијских болести црева, је добро познати фактор ризика за развој колоректалног карцинома (288). Развој колоректалног карцинома на терену улцерозног колитиса подразумева сложене процесе који започињу на инфламираној слузници што на крају индукује настанак аденокарцинома (46). У нашем истраживању анализирани су болесници са инфламацијским болестима црева и болесници са спорадичним колоректалним карциномом. Иако постоје значајне разлике у карциногенези колоректалног карцинома на терену инфламацијских болести црева и спорадичних карцинома, постоје и неке сличности, нарочито у генези оба типа колоректалних карцинома (14). На пример, алтерације тумор-супресорских гена индукују како прогресију колоректалног карцинома тако и прогресију инфламацијских болести црева и спорадичних аденома. Тумор-супресорски p53 је један од најважнијих супресорских гена укључених у карциногенезу обе болести (14). Сматра се да мутације овог гена представљају најранији догађај у карциногенези код оболелих од IBD (14). У карциногенези спорадичних колоректалних карцинома, мутације гена p53 се дешавају релативно касније и претпоставља се да делеција гена p53 индукује прогресију тумора од аденома према карциному (14).

У нашем истраживању већина испитаника са колоректалним карциномом су имала позитивну експресију p16, p53 и VEGF, што није био случај са испитаницима са инфламацијским болестима црева (Фигура 17). Досадашња истраживања претпостављају да је повећана експресија p53 протеина резултат мутације гена p53 (135). Мутација гена p53 за последицу има измењену структуру и функцију кодираног протеина, који није у могућности да очува интегритет генома, тако да ове структурне и физичке модификације молекула p53 иницирају процес онкогенезе. Висока учесталост мутације гена p53 у карциному, рефлектује важност инактивације гена p53 у процесу карциногенезе (289). Немутирани протеин p53 има кратак полуживот у нормалним ћелијама, континуирано се ствара и разграђује и његов полуживот је око 30 минута. Када је геном оштећен, дисфункционални p53 протеин, постаје стабилизован при чему се у ћелији повећава концентрација овог протеина до десет пута као и полуживот. На тај начин се може објаснити акумулација p53 протеина у ткивима (290). Претпостављамо да су експримирани протеини p16 и p53, регистровани у овом истраживању, продукти мутираних гена и да као такви повећавају експресију VEGF.

5.3.2. Експресија VEGF у циљаном ткиву је у позитивној корелацији са концентрацијом имуносупресивног IL-10, а у негативној корелацији са концентрацијом проинфламаторног IFN- γ у серуму испитаника са колоректалним карциномом

Испитаници са колоректалним карциномом су категорисани у групе са позитивном и негативном експресијом p16, p53 и VEGF. Анализирајући системске вредности цитокина и количнике контрарегулаторних цитокина у овако дефинисаним групама, резултати несумњиво указују на снижене серумске вредности проинфламаторног цитокина IFN- γ (Фигура 12В), а повишене вредности имуносупресивног цитокина IL-10 (Фигура 12Б), код испитаника са позитивном VEGF експресијом. Поред тога, вредности односа IFN- γ /IL-10 су знатно мање у групи испитаника са позитивном експресијом p16, p53 и VEGF (Фигура 12Г).

IFN- γ је имунорегулаторни цитокин са значајном антитуморском активношћу (291). Показано је да IFN- γ испољава антитуморски ефекат и у колоректалном карциному, који је углавном последица његовог антипролиферативног ефекта *in vitro* на туморске ћелије колоректалног карцинома (292). Документоване су значајно ниже вредности IFN- γ у свим стадијумима колоректалног карцинома, што посредно указује на његову антитуморску активност. Уз то, забележен је значајан пораст серумске концентрације IFN- γ постоперативно (293).

IL-10 супримира цитотоксичну активност макрофага (294), обраду и презентацију антигена у макрофагима, као и сазревање дендритских ћелија (166). Сматра се да је повећана експресија IL-10 у меланомима и лимфомима битна за настанак и прогресију болести (295). Наш налаз код испитаника са инфламацијским болестима црева, указује на то да постоји појачан системски проинфламаторни имунски одговор који корелира са тежином болести и вероватно са локалном ткивном ангиогенезом. Супротно томе, код испитаника са колоректалним карциномом, системски проинфламаторни имунски одговор је у негативној корелацији са локалном ткивном ангиогенезом. Као што смо раније претпоставили, измењена експресија антионкогена може изазвати прекомерну експресију VEGF. Новија студија указује на то да VEGF делује имуносупресивно, тако што повећањем активности индоламин 2,3-диоксигеназе (енгл. Indoleamine 2,3-dioxygenase, IDO) у дендритским ћелијама спречава активацију и пролиферацију лимфоцита (296). Индоламин 2,3-диоксигеназа је ензим, кога секретују различите врсте ћелија, укључујући и дендритске ћелије. Повећана експресија IDO, одговорна за катаболизам триптофана, супримира функцију ефекторских Т лимфоцита и то тако што истовремено индукује исцрпљивање есенцијалног триптофана и стварање имуносупресивних метаболита триптофана (297). Дендритске ћелије представљају специјализоване антиген презентујуће ћелије, које су неопходне за адекватну активацију и стимулацију Т ћелијског имунског одговора, али такође могу да делују и као негативни регулатори имунског одговора и на тај начин заузимају важно место у регулацији имунског одговора. Незреле DCs могу да индукују или активирају регулаторне CD4⁺ Т лимфоците, док зреле DCs индукују имуностимулаторне CD4⁺ Т лимфоците (298). DCs су често мета супресивних фактора које луче тумори (299) што им смањује способност да индукују ефикасан антитуморски одговор (300). Супресивни фактори које доминантно продукују туморске ћелије су IL-10, TGF- β , VEGF и IL-6 (300-312). У присуству ових фактора DCs ћелије не сазревају. VEGF проузрокује неадекватну диференцијацију и сазревање дендритских ћелија (313-

316), повећањем активности индоламин 2,3-диоксигеназе у дендритским ћелијама. VEGF такође индукује акумулацију MDSCs (енгл. Myeloid derived suppressor cells, MDSCs), које супримирају проинфламаторну функцију DCs и инхибирају ћелијски посредовану имуност против тумора (317). Дакле, код болесника са колоректалним карциномом, VEGF делује имуномодулаторно на DCs и тако смањује проинфламаторни имунски одговор. Мијелоидне супресорске ћелије, су хетерогена популација ћелија које настају у току онкогенезе, запаљења и инфекција и имају изузетну способност да супримирају Т-ћелијски одговор (318). Ове ћелије представљају јединствену компоненту имунског система који регулише имунски одговор код здравих особа, као и у бројним обољењима. Представљају групу фенотипски хетерогених мијелоидних ћелија, које имају заједичку биолошку активност. Заједничке карактеристике мијелоидних супресорских ћелија је да су мијелоидног порекла и да поседују изузетну способност супримирања Т ћелијског одговора. Код здравих особа, MDSCs чине 0,5% периферних мононуклеарних ћелија, са десетоструким повећавањем њиховог броја у крви болесника са карциномом (319-322). Ову групу ћелија чине прекурсори мијелоидних ћелија, макрофага, гранулоцита и дендритских ћелија и у стабилном стању су присутне у коштаном сржи, када не испољавају супресорску активност. У коштаном сржи, незреле мијелоидне ћелије (енгл. Immature myeloid cells, IMCs) се диференцирају у гранулоците, макрофаге и дендритске ћелије. Различити цитокини и фактори раста који се секретују у карциному, изазивају пролиферацију IMCs и блокирају њихову диференцијацију, што све заједно резултира повећаном акумулацијом MDSCs у лимфним органима и туморима. Акумулација MDSCs индукује, инхибицију диференцијације DCs и супресију антитуморског имунског одговора (323). Такође, модулирају секрецију цитокина у макрофагима и на тај начин регулишу и урођени имунски одговор. Индукују ангиогенезу у тумору и омогућавају инвазију туморских ћелија и настанак метастаза. С друге стране, малигне ћелије луче IL-10 и истовремено стимулишу стварање овог цитокина у незрелим мијелоидним дендритским ћелијама и/или незрелим мијелоидним супресорским ћелијама (324).

5.3.3. Код испитаника са колоректалним карциномом са позитивном експресијом p16, као и код испитаника који истовремено експримирају p16 и p53 измерене су повишене серумске вредности IL-4

Пораст концентрације IL-4 је забележен у серуму оболелих од колоректалног карцинома са позитивном експресијом p16 (Фигура 12А), као и код испитаника са истовременом експресијом p16 и p53 (Фигура 12Д).

Повећана експресија p16 је у вези са мутацијом гена и губитком његове функције (325). Новија студија указује на то да дефицит p16 протеина фаворизује поларизацију макрофага у M2 фенотип и истовремено инхибира проинфламаторни M1 фенотип (325). Макрофаги представљају мононуклеарне фагоците чија је примарна функција фагоцитоза. Представљају компоненту урођене имуности, а играју и значајну улогу у ефекторским механизмима стечене имуности. Функционишу и као антиген-презентујуће ћелије и као ефекторске ћелије и у зависности од фактора средине поседују различите функционалне и фенотипске карактеристике. У ћелијском имунском одговору, Th1 лимфоцити директним контактом или цитокинима активирају макрофаге. Подела макрофага на две групе аналогна је подели Th лимфоцита на Th1 и Th2. M1 макрофаге (класично активирани макрофаги) активира

IFN- γ (326, 327) и M2 (алтернативно активирани макрофаги) активира IL-4. M1 макрофаге карактерише појачана убилачка способност туморских ћелија, повећана продукција слободних кисеоничних радикала, појачана антиген презентујућа улога (328-331, 294), повећана секреција инфламаторних цитокина и на тај начин активирају ефикасан антитуморски имунски одговор (331, 294). M2 макрофаги индукују ангиогенезу продукцијом VEGF (332), инхибирају инфламаторни одговор (331, 333, 334, 166) и протуморски имунски одговор типа 2 (166, 334). Цитокин IL-4 у комбинацији са другим Th2 цитокинима индукује поларизацију макрофага у M2 фенотип са протуморским дејством и истовремено спречава поларизацију макрофага у M1 са антитуморском активношћу (335).

Повећана експресија p16, забележена у овој студији, указује на аберантну форму овог антионкогена, који као такав вероватно олакшава поларизацију макрофага у M2 фенотип и на тај начин стимулише имунски одговор типа 2 кога карактерише повећана продукција IL-4.

5.3.4. Серумске вредности AFP и СА 19-9 су значајно више код оболелих од колоректалног карцинома са дијагностикованим метастазама у јетри

Серумске вредности AFP (Фигура 13А) и СА 19-9 (Фигура 13Б) су значајно више код болесника са дијагностикованим метастазама у јетри.

Такође смо забележили значајно више серумске вредности СЕА код оболелих од колоректалног карцинома са метастазама у јетри (Фигура 13В) и у плућима (Фигура 13Г), као и код испитаника са дијагностикованом карциноматозом перитонеума (Фигура 14Б). AFP и СА 19-9, су туморски маркери, присутни у крви и у ткивима оболелих од колоректалног карцинома. Подаци из литературе који се односе на испитивање колоректалног карцинома, указују на то да постоји неколико више или мање поузданих маркера који пружају квалитетне прогностичке или предиктивне информације, а то су СЕА, AFP и СА 19-9. AFP и СЕА су онкофетални протеини, а СА 19-9 је муцин богат угљеним хидратима (242). AFP је важан за дијагностику примарних тумора јетре и повишене вредности овог протеина се могу детектовати и код карцинома желуца, жучне кесе, панкреаса, колоректума и код свих врста карцинома са дијагностикованим метастазама у јетри (242). Серумске вредности AFP корелирају са лошијом прогнозом болести (242). Код колоректалног карцинома, повишене вредности AFP упућују на хематогено метастазирање болести (242). СА 19-9 има највећу клиничку важност код карцинома панкреаса и његове серумске вредности корелирају са величином тумора (242). Концентрација овог маркера се одређује заједно са СЕА и на тај начин се повећава сензитивност у дијагностици колоректалног карцинома (242). Код колоректалног карцинома, повишене вредности СА 19-9 указују на хематогену дисеминацију болести (242). Сматра се да серумски нивои СА 19-9 корелирају са Дукесовом класификацијом тумора (242). СЕА и СА 19-9 су данас најчешће коришћени тумор-асоцирани маркери код болесника са колоректалним карциномом.

СЕА је први карциномски маркер описан 1965. године (336, 337) у крви болесника са колоректалним карциномом. Нормално се налази у феталним ткивима и туморском ткиву и представља онкофетални протеин. Неке студије указују на то да СЕА или бар неки молекул сличан СЕА, може бити присутан и у здравим ткивима, али у значајно нижим концентрацијама (338). Код болесника са карциномом плућа региструју се повишене вредности СЕА (339). Ген за СЕА се налази на хромозому

19q и молекул СЕА показује велику хетерогеност и припада фамилији имуноглобулина (340). Везан је за мембрану ћелија, лако се ослобађа у околину и присутан је и у солубилној форми. Концентрација овог молекула у крви даје индиректан увид у ћелијску пролиферацију и метастатски потенцијал тумора (341). Високе серумске концентрације СЕА код болесника са колоректалним карциномом, су у корелацији са лошијом прогнозом болесника и агресивнијим током болести (242, 342). Најчешће метастазе колоректалног карцинома су у јетри, чак код 60% болесника (343). Код 40% ових болесника, јетра је једино место метастаза (343). СЕА у серуму болесника са колоректалним карциномом је важан у раном откривању метастаза у јетри и присутан је у високој концентрацији. Када се ослобађа из метастатских ћелија јетре, налази су у облику гликопротеина са 60% угљених хидрата. Серумске концентрације СЕА више од 15 U/ml, сматрају се високо ризичним за неповољан исход болести (344). У нашем истраживању испитаници са дијагностикованим метастазама у јетри су имали просечну вредност СЕА вишу од 30 U/ml, а са дијагностикованим метастазама на плућима вишу од 350 U/ml. Сматра се да су серумски нивои СЕА у корелацији са Дукесовом класификацијом тумора (345). College of American Pathologist Expert Groups (81) је предложила да серумске концентрације СЕА служе као прогностички маркер прве категорије код болесника са колоректалним карциномом (81).

5.3.5. Серумске вредности IL-10 су значајно више код испитаника са колоректалним карциномом и дијагностикованим асцитом и карциноматозом перитонеума

Серумске вредности IL-10 (Фигура 14А) су значајно више код испитаника са дијагностикованим асцитом и карциноматозом перитонеума. Дијагностикована карциноматоза перитонеума представља стадијум поодмакле болести. Серумске вредности IL-10 су значајно више код болесника са дијагностикованом карциноматозом перитонеума, што сугерише на протуморску улогу IL-10. Цитокини модулишу функцију тумор-инфилтришућих лимфоцита (346).

IL-10 има антиинфламаторну и имунорегулаторну улогу и претпоставља се да је важан у настанку и развоју колоректалног карцинома (216, 287). Инхибицијом синтезе проинфламаторних цитокина, као и стимулацијом пролиферације и истовременом инхибицијом апоптозе ћелија, IL-10 може промовисати раст тумора (347). Високе серумске вредности IL-10 су документоване код болесника са узнапредовалим стадијумом колоректалног карцинома (348). Такође највише серумске вредности IL-10 су показане код болесника са стадијумом IV и у директној су вези са прогресијом тумора (293, 286, 352, 353). Повишене серумске вредности IL-10 су у вези са прогресијом многих малигнома код људи, укључујући лимфоме (349), сквамозни карцином главе и врата (350), карцином јајника (351). О'Нага и сарадници такође региструју повишене вредности IL-10 код болесника са узнапредовалом болешћу колоректалног карцинома (348).

Имајући у виду биолошку функцију IL-10 претпостављамо да код колоректалног карцинома IL-10 својом имуносупресивном активношћу промовише прогресију болести. Такође је показано значајно смањење серумских вредности IL-10 постоперативно (286, 354). Досадашњи резултати подржавају хипотезу да важан извор IL-10 код болесника са колоректалним карциномом су туморске ћелије или тумор-инфилтришуће имунске ћелије (347, 355, 356).

5.4. Анализа серумских вредности цитокина код испитаника са улцерозним колитисом и колоректалним карциномом

Инфилтрација инфламаторних ћелија у ткиво колоректалног карцинома је од значаја за прогресију тумора (357). Постоје докази да проинфламаторни цитокини, које продукују туморске ћелије и тумор-асоцирани леукоцити, играју важну улогу у расту и ширењу тумора (358, 359). Већина, али не сви, тумор промовишући цитокини активирају рецепторе на епителним ћелијама у цреву и на тај начин покрећу активацију онкогених транскрипционих фактора као и других молекула укључених у сигналне путеве. Транскрипциони фактори NF κ B и STAT3 су важни у развоју колоректалног карцинома (360-363). Досадашња клиничка истраживања указују на повећан ризик за развој колоректалног карцинома код болесника са улцерозним колитисом и Кроновом болешћу (57-60, 364).

Цитокини који промовишу карциногенезу на терену инфламације колона су TNF- α , IL-6 и IL-1. Насупрот њима, цитокини као што су IL-10 и TGF- β инхибирају карциногенезу (365, 366) у колоректалној регији. IL-6, активацијом транскрипције STAT3, игра важну улогу у патогенези улцерозног колитиса, као и у карциногенези колоректалног карцинома на терену инфламације (367). IL-6 индукује пролиферацију и омогућује преживљавање ћелија (368, 369), а стимулише и пролиферацију премалигних ентероцита (322, 370, 371).

Системске вредности IL-4 су значајно више код испитаника са улцерозним колитисом у поређењу са испитаницима са колоректалним карциномом

У серуму испитаника са улцерозним колитисом су измерене значајно више вредности IL-4, у односу на испитанике са колоректалним карциномом (Фигура 16А).

IL-4 је типичан Th2 цитокин који делује на В и Т лимфоците (372). У експерименталним моделима инфламацијских болести црева даваће моноклонског анти IL-4 антитела смањује синтезу Th2 цитокина и повећава продукцију IFN- γ , што сугерише на то да је IL-4 битан за индукцију Th2 имунског одговора (373). IL-4 значајно смањује експресију васкуларног фактора раста ендотела (VEGF) код болесника са активном инфламацијском болешћу црева (374). IL-4 и IL-10 супримирају проинфламаторне медијаторе, укључујући TNF- α и IL-1, а истовремено фаворизују хуморални имунски одговор (375). Код проктитиса, комбиновани ефекти IL-4 и IL-10 индукују поларизацију лимфоцита у правцу Th2 имунског одговора (6), као и репарацију слузнице колона (енгл. Mucosal healing). IL-4 је цитокин имунског одговора типа 2. Код улцерозног колитиса доминира имунски одговор тип 2, што смо и потврдили налазом више концентрације IL-4 у серуму испитаника са улцерозним колитисом.

Системске вредности IL-17 су значајно више код испитаника са колоректалним карциномом у поређењу са испитаницима са улцерозним колитисом

У серуму испитаника са колоректалним карциномом су измерене значајно више вредности IL-17 у односу на испитанике са улцерозним колитисом (Фигура 16Б). Последњих година IL-17 је препознат као важан медијатор између урођене и стечене имуности (376). И поред релативно добро дефинисане улоге IL-17 у аутоимунским

болестима, не зна се довољно о његовој улози у антитуморској имуности. Сматра се да IL-17, као проинфламаторни цитокин кога производе и секретују Th17 лимфоцити, игра двоструку улогу у антитуморској имуности. Резултати неких истраживања указују на то да IL-17 промовише раст и развој тумора, индукцијом ангиогенезе и индукцијом продукције различитих проангиогених фактора, укључујући васкуларни фактор раста ендотела (377-379). Други аутори сугеришу на то да IL-17 индукује ћелијски имунски одговор одговоран за одбацивање тумора и то стимулацијом цитотоксичких Т лимфоцита (380-382). Корелација између ангиогенезе и инвазивности колоректалног карцинома је описана у ранијим истраживањима (382). Такође је показано да се са прогресијом колоректалног карцинома повећавају серумске вредности IL-17, што указује на то да IL-17 може директно или индиректно да допринесе развоју и прогресији колоректалног карцинома (383). Недавно, је показано да IL-17 повећава производњу металопротеиназе MMP-9 (384). Улога ове металопротеиназе у прогресији малигнома код људи је документована у бројним студијама (385, 386). У овом раду измерене су више системске вредности IL-17 код испитаника са колоректалним карциномом, у односу на испитанике са улцерозним колитисом. Показано је да IL-17 промовише раст тумора тако што стимулише синтезу проангиогених фактора, као што је VEGF (378). Наш налаз потврђује већу експресију VEGF, као и вредности IL-17 код испитаника са колоректалним карциномом, што указује на проангиогену улогу овог цитокина.

5.4.1. Сензитивност и специфичност цитокина и ткивних маркера за разликовање испитаника са улцерозним колитисом од испитаника са колоректалним карциномом

Истакли смо могућу улогу IL-4 као биомаркера за разликовање улцерозног колитиса и колоректалног карцинома и показали да повишени нивои IL-4 повећавају ризик за улцерозни колитис (Фигура 17).

Резултати ове студије указују на могућу улогу IL-17 као биомаркера за разликовање улцерозног колитиса и колоректалног карцинома и да повишени нивои IL-17 повећавају ризик за колоректални карцином (Фигура 17).

Експресија испитиваних ткивних маркера може да буде корисна у процени колоректалног карцинома. Према нашим резултатима од свих анализираних ткивних маркера p16 p53 и VEGF, p53 је показао највећу сензитивност и специфичност који омогућава дискриминацију испитаника са колоректалним карциномом од инфламацијских болести црева (Фигура 19).

ЗАКЉУЧЦИ

Експерименти приказани у овом раду по први пут указују на потенцијално различиту улогу VEGF-а у имунском одговору код улцерозног колитиса и код колоректалног карцинома.

Код испитаника са улцерозним колитисом појачан системски проинфламаторни имунски одговор је у позитивној корелацији са медијатором ангиогенезе и тежином болести. Код испитаника са колоректалним карциномом медијатор неоангиогенезе је у негативној корелацији са системским проинфламаторним имунским одговором.

Закључак је изведен на основу следећих експерименталних доказа:

1. Више системске вредности IL-6 и односа контрарегулаторних цитокина IL-17/IL-10 код испитаника са улцерозним колитисом код којих су дијагностиковане екстраинтестиналне манифестације болести, указују на развој Th17 имунског одговора
2. Снижене серумске вредности имуносупресивног IL-10 и повишене вредности односа контрарегулаторних цитокина IFN- γ /IL-10 код испитаника са улцерозним колитисом и постојањем компликација, као и позитивна корелација TNF- α са хистолошким градусом, указују на појачан имунски одговор типа 1
3. Експресија антионкогена p16 и p53 је у позитивној корелацији са експресијом медијатора ангиогенезе-VEGF, док је експресија сва три ткивна маркера у позитивној корелацији са вишим серумским вредностима проинфламаторних цитокина TNF- α и IL-6, код испитаника са улцерозним колитисом
4. Већи проценат испитаника са колоректалним карциномом има позитивну експресију маркера p16, p53 и VEGF у односу на испитанике са улцерозним колитисом и експресија антионкогена p16 и p53 је у позитивној корелацији са експресијом ангиогенезе, VEGF
5. Код испитаника са колоректалним карциномом снижене системске вредности проинфламаторног цитокина IFN- γ и повишене вредности имуносупресивног IL-10 су у позитивној корелацији са експресијом VEGF.

СКРАЋЕНИЦЕ

ADCC	цитотоксичност зависна од антитела
АРОЕ	аполипопротеин Е (енгл. Apolipoprotein E)
α-GC	α- галактозил церамид (енгл. Alpha-galactosylceramide)
APC	(енгл. Adenomatous Polyposis Coli)
APC	Антиген презентујуће ћелије
ACG	(енгл. American College of Gastroenterology)
AGA	(енгл. American Gastroenterologic Association)
ASGE	(енгл. American Society for Gastrointestinal Endoscopy)
AUC	(енгл. Area under the curve)
ABC	(енгл. Avidin-Biotin peroxidase complex)
AFP	Алфа фето протеин (енгл. Alpha-fetoprotein)
Bcl-xL	(енгл. B cell lymphoma extra large)
c-Maf	транскрипциони фактор (енгл. Musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog)
CDK2ap1	CDK2-асоцирани протеин 1 (енгл. Cyclin-dependent kinase 2)
Cdkn1a	инхибитор циклин-зависне киназе p21(енгл. Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A)
Ccng1	инхибитор циклина G
CTL	цитотоксички Т лимфоцити (енгл. Cytotoxic T Lymphocytes)
cAMP	циклични аденозин-монофосфат (енгл. Cyclic Adenosine-Mono Phosphate)
CTLA4	антиген-4 цитотоксичких Т лимфоцита (енгл. Cytotoxic T Lymphocyte Antigen-4)
CD	(енгл. Cluster of Differentiation)
CTL	цитотоксични или цитолитички Т-лимфоцити
CARD15	(енгл. Caspase activating recruitment domain 15)
CRP	Ц реактивни протеин (енгл. C-reactive protein)
CDAI	(енгл. Crohn,s Disease Activity index)
CRC	колоректални карцином (енгл. Colorectal cancer)
COX2	циклоксигеназа 2
CEA	карциноембрионски антиген (енгл. Carcino-embryonic antigen)
CIN	(енг. chromosome instability)
CpG	(енгл. CpG island methylator phenotype- CIMP)
CIMP	(енгл. CpG island methylator phenotype- CIMP)
CA 19-9	карбохидратни антиген (енгл. Carbohydrate antigen)
DAMPs	(енгл. Damage-associated molecular pattern)
DMEM	(енгл. Dulbecos Modified Eagles Medium)
DNA	(енгл. Deoxyribonucleic acid)
DALM	(енгл. Dysplasia associated lesion mass)
DCC ген	(енгл. Deleted in colon cancer)
DNK	дезоксирибонуклеинска киселина
DCs	дендритске ћелије (енгл. Dendritic Cells)
DPC	(енгл. Deleted in pancreatic cancer)
ECM	екстра-ћелијски матрикс
eNOS	(енгл. Endothelial Nitrite Oxide Synthesis)
ERK1	екстрацелуларна сигнал-регулишућа киназа 1
ELISA	(енгл. Enzyme Linked Immunosorbent Assay)

FADD	(енгл. Fas- Associated- Death- Domain- Protein)
FIAU	(енгл. 1-(29-deoxy-29-fluoro-1-β-D-arabinofuranosyl)-5-iodo-uracil)
FBS	фетални говеђи серум (енгл. Fetal Bovine Serum)
FDC	фоликулске дендритске ћелије (енгл. Follicular dendritis cell)
FoxP3	(енгл. Forkhead box P3)
FGF	(енгл. Fibroblast growt factor)
GATA	нуклеотидна секвенца молекула DNA
GALT	лимфно ткиво гастроинтестиналног тракта (енгл. Gut associated limphoid tissue)
GIST	гастроинтестинални стромални тумори (енгл. Gastrointestinal stromal tumour)
GM-CSF	(енгл. Granulocyte- macrophage colony-stimulating factor)
Ген hMSH2	(енгл. Mismatch repair gene 2)
GCP	(енгл. Good Clinicall Practice)
H&E	хематоксилин и еозин (енгл. Hematoxylin & Eosin)
HRP	(енгл. Streptavidin horseradish peroxidase)
HIF-1α	(енгл. Hypoxia-inducible factor 1-alpha)
HLA-B27	(енгл. Human Leukocyte Antigen B27)
HNPCC	херeditарни неполипозни колоректални карцином (енгл. Hereditary non-polyposis colorectal cancer)
hPMS	(енгл. Mismatch repair genes)
HGD	висок степен дисплазије (енгл. High- grade dysplasia)
HLA	(енгл. Histocompatibility complex)
HMGB1	(енгл. High mobility group box 1)
HML1	(енгл. Human mucosal lymphocyte antigen 1)
IL	интерлеукин (енгл. Interleukins)
IFN-γ	интерферон гама (енгл. Interferon-gama)
ICAM-1	интраћелијски адхезивни молекул-1 (енгл. Intracellular Adhesion Molecule-1)
ICOS	индуцибилни Т-ћелијски костимулатор (енгл. Inducible T-cell COStimulator)
IFN	интерферон (енгл. Interferon)
IL-1R1	рецептора тип I за интерлеукин-1(енгл. Interleukin 1 receptor, type I)
IL-1RacP	IL-1R помоћни протеин (енгл. Interleukin-1 receptor accessory protein)
IkBα	инхибитор транскрипционог фактора НК-κB-α (енгл. Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha)
iNKT	инваријантне NKT ћелије (енгл. Invariant natural killer T)
IMCs	незреле мијелоидне ћелије (енгл. Immature myeloid cells)
IBD	(енгл. Inflammatory bowel disease)
IDO	(енгл. Indoleamine 2,3-dioxygenase)
JNK1	JUN N-терминална киназа-1
Ј ланац	(енгл. Joing)
KLRG1	инхибиторни рецептор (енгл. Killer Cell Lectin-Like Receptor G1)
K-ras ген	гени ras фамилије
Lamp	мембрански гликопротеин удружен са лизозомима (енгл. Lysosomal associated membrane glycoproteins)
LANA	(енгл. Latency-Associated Nuclear Antigen)
LGD	дисплазија ниског степена (енгл. Low-grade dysplasia)

LMP	протеин мале молекулске масе (енгл. Low Molecular Mass Protein)
LPS	липополисахарид
LOH	(енгл. Loss of heterozygosity)
MAPK	протеин киназа активирана митогеном (енгл. Mitogen Activated Protein Kinase)
MCs	мастоцити (енгл. Mast cells)
MDSCs	мијелоидне супресорске ћелије (енгл. Myeloid derived suppressor cells)
M1	класично активирани макрофаги
M2	алтернативно активирани макрофаги
MLD-STZ	вишеструке мале дозе стрептозотоцина (енгл. Multiple low dose)
MMP	металопротеиназе матрикса (енгл. Matrix Metalloproteinase)
MMR	(енг. Mismatch Repair Mechanism)
MNFS	мононуклеарни фагоцитни систем
mRNA	информациона рибонуклеинска киселина (енгл. Messenger RNA)
MSI	микросателитска нестабилност (енг. Microsatellite instability)
MSS	микросателитски стабилни (енгл. Microsatellite stability)
MTP	микротитар плоча (енгл. MicroTiter Plate)
MHC	главни комплекс гена ткивне подударности (енгл. Major Histocompatibility Complex)
MYD88	(енгл. Myeloid differentiation primary-response protein 88)
М ћелије	ћелије са набораном мембраном (енгл. Microfold)
Neo	неомицин
NF-κB	нуклеарни фактор раста (енгл. Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells)
NGF	(енгл. Nerve growth factor),
NK ћелије	урођене убилачке ћелије (енгл. Natural Killer Cells)
NKG2D	активациони рецептор (енгл. Natural Killer Group 2, Member D)
NOS2	азот моноксид синтетаза 2 (енгл. Nitric Oxide Synthase 2)
NOD2	(енгл. Nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 2)
NKT	(енгл. Natural killer T cell)
ox-LDL	оксидовани LDL
PBS	(енгл. Phosphate Buffered Salline)
PIK3CA	(енгл. Phosphatidylinositol 3-kinase)
PPARγ	(енгл. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma)
PAMPs	(енгл. Pathogen-associated molecular patterns)
PDGF	(енгл. Platelet derived growth factor)
PI3K	(енгл. Phosphatidyl Inositol 3 Kinase)
PGE2	простагландин E2 (енгл. ProstaGlandin E2)
PAF	активирајући фактор тромбоцита (енгл. Platelet-Activating Factor)
PCR	реакција ланчаног умножавања (енгл. Polimerase Chain Reaction)
PBS	(енгл. Phosphate Buffered Salline)
pANCA	(енгл. Perinuclear Anti-Neutrophil Cytoplasmic Antibodies)
ROC curve	крива оперативне карактеристике примаоца (енгл. Receiver operating characteristic)
RNK	рибонуклеинска киселина
RANKL	(енгл. Receptor Activator of Nuclear Factor-κB Ligand)
RAG2	активациони ген 2 рекомбинације (енгл. Recombination-Activating Gene 2)

ROI	(енгл. Reactive Oxigene Intermediates) слободних кисеоничних радикала
SARSTED	бунарчићи са равним дном
STAT	(енгл. Signal Transducer and Activation of transcription)
sST2	солубилни ST2
ST2L	мембрански ST2
ST2V	варијабилни ST2
SCF	(енгл. Stem cell factor)
SLE	системски лупус еритематодес (енгл. Systemic lupus erythematosus)
T-bet	(енгл. T-box transcription factor)
TK	тимидин киназа
Th ћелије	помагачки Т лимфоцити (енгл. T helper cells)
TLR	(енгл. Toll like receptor)
TIR	(енгл. Toll-IL-1 рецептор)
Treg	регулаторни Т лимфоцити
TNF	фактор некрозе тумора (енгл. Tumor necrosis factor)
TGF-β	трансформишући фактор раста бета (енгл. Transforming growth factor beta)
TRAIL	(енгл. TNF-related apoptosis-inducing ligand)
TAM	тумор асоцирани макрофаги (енгл. Tumor Assosiated Macrophages)
TIL	тумор-инфилтришући лимфоцити (енгл. Tumour Infiltrating Lymphocytes)
TRAF6	(енгл. TNFR-associated factor 6)
TFF	(енгл. Trefoil factor family)
VEGF	фактор раста васкуларног ендотела (енгл. Vascular Endothelial Growth factor)

ЛИТЕРАТУРА

1. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Cellular and molecular immunology. Seventh edition, Elsevier 2012; 225-243.
2. Fort MM, Cheung J, Yen D, Li J, Zurawski SM, Lo S, Menon S, Clifford T, Hunte B, Lesley R, Muchamuel T, Hurst SD, Zurawski G, Leach MW, Gorman DM, Rennick DM. IL-25 induces IL-4, IL-5, and IL-13 and Th2-associated pathologies in vivo. *Immunity* 2001; 15: 985-95.
3. Müller H and Schwarz MJ. Immune System and Schizophrenia. *Curr Immunol Rev* 2010; 6: 213–220.
4. Tzartos JS, Friese MA, Craner MJ, Palace J, Newcombe J, Esiri MM, Fugger L. Interleukin-17 production in central nervous system-infiltrating T cells and glial cells is associated with active disease in multiple sclerosis. *Am J Pathol* 2008; 172: 146-55.
5. Steinman L. A brief history of T(H)17, the first major revision in the T(H)1/T(H)2 hypothesis of T cell-mediated tissue damage. *Nat Med* 2007; 13: 139-45.
6. Zhu X, Mulcahy LA, Mohammed RA, Lee AH, Franks HA, Kilpatrick L, Yilmazer A, Paish EC, Ellis IO, Patel PM, Jackson AM. IL-17 expression by breast-cancer-associated macrophages: IL-17 promotes invasiveness of breast cancer cell lines. *Breast Cancer Res* 2008; 10: 95.
7. Fujino S, Andoh A, Bamba S, Ogawa A, Hata K, Araki Y, Bamba T, Fujiyama Y. Increased expression of interleukin 17 in inflammatory bowel disease. *Gut* 2003; 52: 65-70.
8. Yen D, Cheung J, Scheerens H et al. IL-23 is essential for T cell-mediated colitis and promotes inflammation via IL-17 and IL-6. *J Clin Invest* 2006; 116: 1310-1316.
9. Chabaud M, Garnero P, Dayer JM, Guerne PA, Fossiez F, Miossec P. Contribution of interleukin 17 to synovium matrix destruction in rheumatoid arthritis. *Cytokine* 2000; 12: 1092-1099.
10. Miossec P, Korn T, Kuchroo V. Interleukin-17 and type 17 helper T cells. *N Engl J Med* 2009; 361: 888–898.
11. Korn T, Bettelli E, Gao W, Awasthi A, Jäger A, Strom TB, Oukka M, Kuchroo VK. IL-21 initiates an alternative pathway to induce proinflammatory TH17 cells. *Nature* 2007; 448: 484-487.
12. Coyle N, Ponaerts P, Van Tendeloo VF, Berneman ZN. Regulatory T cells and human

disease. *Clin Dev Immunolog* 2007; 2007: 89195.

13. Radosavljević GD, Jovanović IP, Kanjevac TV, Arsenijević NN. The role of regulatory T cells in modulation of anti-tumor immune response. *Srp Arh Celok Lek* 2013; 141: 262-267.
14. Matkowskyj KA, Chen ZE, Rao MS, Yang GY. Dysplastic lesions in inflammatory bowel disease. *Arch Pathol Lab Med* 2013; 137: 338-350.
15. Langman MJS. Epidemiological overview of inflammatory bowel disease. In: Allan RN, Rhodes JM, Hanauer SB, Keighley MRB, Alexander-Williams J, Fazio VW, eds. *Inflammatory Bowel Diseases*. New York, NY: Churchill Livingstone; 1997; 35–39.
16. Loftus EV. Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: incidence, prevalence, and environmental influences. *Gastroenterology* 2004; 126: 1504–1517.
17. Ekbohm A, Helmick C, Zack M, Adami HO. The epidemiology of inflammatory bowel disease: a large, population-based study in Sweden. *Gastroenterology* 1991; 100: 350–358.
18. Vučelić B i saradnici. *Gastroenterologija i hepatologija*. I edicija. Zagreb 2002.
19. Duerr RH, Barnada MM, Zhang L et al. Linkage and association between IBD and a locus on chromosome 12. *Am J Hum Genet* 1998; 63:95.
20. Hugot JP, Laurent-Puig P, Gower-Rousseau C et al. Mapping of a susceptibility locus for Crohn's disease in chromosome 16. *Nature* 1996; 379: 821-823.
21. Xavier RJ and Podolsky DK. Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature* 2007; 448: 427-434.
22. Raza A, Yousaf W, Giannella R, Shata MT. Th17 cells: interactions with predisposing factors in the immunopathogenesis of inflammatory bowel disease. *Expert Rev Clin Immunol* 2012; 8: 161-8.
23. Garside P, Millington O, Smith KM. The anatomy of mucosal immune responses. *Ann N Y Acad Sci* 2004;1029: 9-15.
24. Cheroutre H, Madakamutil L. Acquired and natural memory T cells join forces at the mucosal front line. *Nat Rev Immunol* 2004; 4: 290-300.
25. Gorfu G, Rivera-Nieves J, Ley K. Role of beta 7 integrins in intestinal lymphocyte homing and retention. *Curr Mol Med* 2009; 9: 836-50.
26. Koboziev I, Karlsson F, and Grisham MB. Gut-associated lymphoid tissue, T cell trafficking, and chronic intestinal inflammation. *Ann N Y Acad Sci* 2010; 1207 (1): 86-93.

27. Sarto RB. Mechanisms of Disease: Pathogenesis of Crohn's Disease and Ulcerative Colitis. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2006; 3: 390-407.
28. Truelove SC, Witts LJ. Cortisone in ulcerative colitis: final report on a therapeutic trial. *BMJ* 1955; 2: 1041.
29. Kornbluth A, Sachar DB. Ulcerative colitis practice guidelines in adults (update): American College of Gastroenterology, Practice Parameters Committee. *Am J Gastroenterol* 2004; 99: 1371-85.
30. Powell-Tuck J, Brown RL, Lennard-Jones JE. A comparison of oral prednisolone given as a single or multiple Sk daily doses. *Scand J Gastroenterol* 1978; 13: 833.
31. Farmer C, Moore C, Zika R. and Sikorski R. Effects of low and high Orinoco River flow on the underwater light field of the eastern Caribbean basin. *Journal of Geophysical Research* 1993; 98.
32. Baron JH, Connel AM, Lennard-Jones JE. Variation between observers in describing mucosal appearances in proctocolitis. *Br Med J* 1964; 1: 89-92.
33. Morson BC. Precancerous conditions of the large bowel. *Proc R Soc Med* 1971; 64: 959-962.
34. Wagtmans MJ, Verspaget HW, Lamers CB, van Hoge-zand RA. Clinical aspects of Crohn's disease of the upper gastrointestinal tract: A comparison with distal Crohn's disease. *Am J Gastroenterol* 1997; 92: 1467.
35. de Dombal FT, Burton IL, Clamp SE et al. Short-term course and prognosis of Crohn's disease. *Gut* 1974; 15: 435.
36. Best WR, Bectel JM, Singleton JW, Kern F. Development of the Crohn's Disease Activity Index. *Gastroenterology* 1976; 70: 439.
37. Harms HK, Blomer R, Bertere-Harms R et al. A pediatric Crohn's disease activity index. *Acta Paediatr* 1994; 395: 22.
38. Harvey RF, Bradshaw JM. A simple index of Crohn's disease activity. *Lancet* 1980; 1: 514.
39. van Hees PAM, van Elteren PH, van Lier HJ et al. An index of inflammatory activity in patients with Crohn's disease. *Gut* 1980; 21: 279.
40. Myren J, Bouchier IAD, Watkinson S et al. The OMGE Multinational IBD Survey (1976-1982): A further report of 2.657 cases. *Scand J Gastroenterol* 1984; 95: 19.
41. Wright JP, Alp MN, Young GO et al. Predictors of acute relapse of Crohn's disease.

Dig Dis Sci 1987; 32: 164.

42. Brignola C, Campieri M, Bazzochi B et al. A laboratory index for predicting relapse in asymptomatic patients with Crohn's disease. *Gastroenterology* 1986; 91: 1490.
43. Farraye FA, Odze RD, Eaden J, et al. AGA Institute Medical Position Panel on Diagnosis and Management of Colorectal Neoplasia in Inflammatory Bowel Disease. AGA medical position statement on the diagnosis and management of colorectal neoplasia in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2010; 138: 738–745.
44. Kornbluth A, Sachar DB. Ulcerative colitis practice guidelines in adults: American College of Gastroenterology, Practice Parameters Committee. *Am J Gastroenterol* 2010; 105: 501–523.
45. Leighton JA, Shen B, Baron TH et al. ASGE guideline: endoscopy in the diagnosis and treatment of inflammatory bowel disease. *Gastrointest Endosc* 2006; 63: 558–565.
46. Riddell RH, Goldman H, Ransohoff DF, Appleman H, Fenoglio C, Haggitt R et al. Dysplasia in inflammatory bowel disease: Standardized classification with provisional clinical applications. *Hum Pathol* 1983; 14: 931-968.
47. Nugent FW, Haggitt RC, Gilpin PA. Cancer surveillance in ulcerative colitis. *Gastroenterology* 1991; 100: 1241–1248.
48. Itzkowitz SH, Harpaz N. Diagnosis and management of dysplasia in patients with inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology* 2004; 126: 1634–1648.
49. Bernstein CN, Shanahan F, Weinstein WM. Are we telling patients the truth about surveillance colonoscopy in ulcerative colitis? *Lancet* 1994; 343: 71–74.
50. Woolrich AJ, DaSilva MD, Korelitz BI. Surveillance in the routine management of ulcerative colitis: the prediction value of low-grade dysplasia. *Gastroenterology* 1992; 103: 431–438.
51. Lennard-Jones JE, Morson BC, Ritchie JK, Williams CB. Cancer surveillance in ulcerative colitis: experience over 15 years. *Lancet* 1983; 2: 149–152.
52. Levin B, Lennard-Jones J, Riddell RH, Sachar D, Winawer SJ. Surveillance of patients with chronic ulcerative colitis: WHO collaborating centre for the prevention of colorectal cancer. *Bull World Health Organ* 1991; 69: 121–126.
53. Bernstein CN. Cancer surveillance in inflammatory bowel disease. *Curr Gastroenterol Rep* 1999; 1: 496–504.
54. Gupta RB, Harpaz N, Itzkowitz S, Hossain S, Matula S, Kornbluth A, Bodian C and

Ullman T. Histologic inflammation is a risk factor for progression to colorectal neoplasia in ulcerative colitis: a cohort study. *Gastroenterology* 2007; 133: 1099-1105.

55. Connell WR, Lennard-Jones JE, Williams CB, Talbot IC, Price AB, Wilkinson KH. Factors affecting the outcome of endoscopic surveillance for cancer in ulcerative colitis. *Gastroenterology* 1994; 107: 934-944.

56. Lashner BA, Silverstein M, Hanauer SB. Hazard rates for dysplasia and cancer in ulcerative colitis: results from a surveillance program. *Dig Dis Sci* 1989; 34: 1536-1541.

57. Ekblom A, Helmick C, Zack M, Adami HO. Ulcerative colitis and colorectal cancer. A population-based study. *N Engl J Med* 1990; 323: 1228-1233.

58. Eaden JA, Abrams KR, Mayberry JF. The risk of colorectal cancer in ulcerative colitis: a meta-analysis. *Gut* 2001; 48: 526-535.

59. Winther KV, Jess T, Langholz E, Munkholm P, Binder V. Long-term risk of cancer in ulcerative colitis: a population-based cohort study from Copenhagen County. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2004; 2: 1088-1095.

60. Langholz E, Munkholm P, Davidsen M, Binder V. Colorectal cancer risk and mortality in patients with ulcerative colitis. *Gastroenterology* 1992; 103: 1444-1451.

61. Langan RC, Gotsch PB, Krafczyk MA, Skillinge DD. Ulcerative colitis: diagnosis and treatment. *Am Fam Physician* 2007; 76: 1323-30.

62. Levine JS, and Burakoff R. Extraintestinal manifestation of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology and Hepatology* 2011; 7: 235-241.

63. Atreya R, Neurath MF. Involvement of IL-6 in the pathogenesis of inflammatory bowel disease and colon cancer. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology* 2005; 3: 187-195.

64. Wilson A, Reyes E, Ofman J. Prevalence and outcomes of anemia in inflammatory bowel disease: a systematic review of the literature. *Am J Med* 2004; 116: 44-49.

65. de Silva AD, Mylonaki M, Rampton DS. Oral iron therapy in inflammatory bowel disease: usage, tolerance, and efficacy. *Inflamm Bowel Dis* 2003; 9: 316-320.

66. Levine JB, Lukawski-Trubish D. Extraintestinal considerations in inflammatory bowel disease. *Gastroenterol Clin North Am* 1995; 24: 633-46.

67. Compston JE, Judd D, Crawley EO et al. Osteoporosis in patients with inflammatory bowel disease. *Gut* 1987; 28: 410-415.

68. Bjarnason I, Macpherson A, Mackintosh C et al. Reduced bone density in patients

- with inflammatory bowel disease. *Gut* 1997; 40: 228–233.
69. Ali T, Lam D, and Humphrey MB. Osteoporosis in Inflammatory Bowel Disease. *Am J Med* 2009; 122: 599-604.
70. Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation* 2002; 105: 1135-1143.
71. Greenstein AJ, Janowitz HD, Sachar DB. The extraintestinal manifestations of Crohn's disease and ulcerative colitis: A study of 700 patients. *Medicine* 1976; 55:401.
72. Boyle P, Langman JS. ABC of Colorectal Cancer Epidemiology. *BMJ* 2000; 32: 805-8.
73. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global Cancer Statistics. *CA Cancer J Clin* 2011; 61: 69–90.
74. Registar za rak u centralnoj Srbiji. Incidencija i mortalitet od raka u centralnoj Srbiji 2009. godine. Institut za zaštitu zdravlja Srbije „Dr Milan Jovanović - Batut” 2011.
75. Nacionalni program za prevenciju kolorektalnog karcinoma. <http://www.minzdravlja.info/downloads/Zakoni/Strategije/Nacionalni%20Program%20Za%20Preveciju%20Kolorektalnog%20Karcinoma.pdf>.
76. Kozuka S, Nogaki M, Ozeki T, Masumori S. Premalignancy of the mucosal polyp in the large intestine II. Estimation of the periods required for malignant transformation of mucosal polyps. *Dis Colon Rectum* 1975; 18: 494–500.
77. Stewart SL, Wike JM, Kato I, Lewis DR, Michaud F. A population-based study of colorectal cancer histology in the United States, 1998-2001. *Cancer* 2006; 107: 1128-41.
78. Cancer.Net Guide Colorectal Cancer. <http://www.cancer.net/patient/Cancer+Types/Colorectal+Cancer?sectionTitle=Risk%20Factors%20and%20Prevention>.
79. American Joint Committee on Cancer. Colon and rectum in: *AJCC Cancer Staging Manual*. 7th ed. New York, NY: Springer, 2010; 143-164.
80. International Agency for Research on Cancer. Tumours of the colon and rectum. In: Hamilton SR, Aaltonen LA, editors. *Pathology and genetics. Tumours of the digestive system*. Lyon: IARC Press; 2000; p. 110–1.
81. Compton CC, Fielding LP, Burgart LJ et al. Prognostic factors in colorectal cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999. *Arch Path Lab Med* 2000; 124: 979-94.

82. Understanding Your Pathology Report: Colon Cancer Carolyn Vachani, MSN, RN, AOCN, Gloria DiLullo, RN, CRNP and Bruce J. Giantonio, MD, FACP Abramson Cancer Center of the University of Pennsylvania Last Modified: June 26, 2013.
83. Stenner-Liewen F and John C. Reed Apoptosis and Cancer. Basic Mechanisms and Therapeutic Opportunities in the Postgenomic Era. *Cancer Research* 2003; 63: 263-268.
84. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990; 61: 759.
85. Galizia G, Lieto E, Ferraraccio F, Orditura M, De Vita F, Castellano P et al. Determination of molecular marker expression can predict clinical outcome in colon carcinomas. *Clinical Cancer Research* 2004; 10: 3490–3499.
86. Elsaleh H, Powell B, McCaul K, Grieu F, Grant R, Joseph D, Iacopetta B. p53 alteration and microsatellite instability have predictive value for survival benefit from chemotherapy in stage III colorectal carcinoma. *Clinical Cancer Research* 2001; 7: 1343–1349.
87. Brandau S, Böhle A. Bladder cancer I. Molecular and genetic basis of carcinogenesis. *Eur Urol* 2001; 39: 491–7.
88. Kamb A, Gruis NA, Weaver-Feldhaus J, Liu Q, Harshman K, Tavitigian SV, Johnson BE, Skolnick MH. A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types. *Science* 1994; 264: 436–40.
89. Hirama T, Koeffler HP. Role of the cyclin-dependent kinase inhibitors in the development of cancer. *Blood* 1995; 86: 841–54.
90. Cairns P, Tokino K, Eby Y, Sidransky D. Localization of tumor suppressor loci on chromosome 9 in primary human renal cell carcinomas. *Cancer Res* 1995; 55: 224–7.
91. Greenman C, Stephens P, Smith R, Dalgliesh GL, Hunter C, Bignell G et al. Patterns of somatic mutation in human cancer genomes. *Nature* 2007; 446: 153-8.
92. Sjöblom T, Jones S, Wood LD, Parsons DW, Lin J, Barber TD et al. The consensus coding sequences of human breast and colorectal cancers. *Science* 2006; 314: 268-74.
93. Martini M, Vecchione L, Siena S, Tejpar S, Bardelli A. Targeted therapies: how personal should we go? *Nat Rev Clin Oncol* 2012; 9: 87-97.
94. De Roock W, Biesmans B, De Schutter J, Tejpar S. Clinical biomarkers in oncology: focus on colorectal cancer. *Mol Diagn Ther* 2009; 13: 103-14.
95. Jonkers J, Berns A. Oncogene addiction: sometimes a temporary slavery. *Cancer Cell* 2004; 6: 535-8.

96. Samuels Y, Diaz LA Jr, Schmidt-Kittler O, Cummins JM, DeLong L, Cheong I et al. Mutant PIK3CA promotes cell growth and invasion of human cancer cells. *Cancer Cell* 2005; 7: 561-73.
97. Weinstein IB. Cancer. Addiction to oncogenes-the Achilles heel of cancer. *Science* 2002; 297: 63-4.
98. Hussain SP, Hofseth LJ, Harris CC. Radical causes of cancer. *Nat Rev Cancer* 2003; 3: 276-285.
99. Seril DN, Liao J, West AB, Yang GY. High-iron diet: foe or feat in ulcerative colitis and ulcerative colitis-associated carcinogenesis. *J Clin Gastroenterol* 2006; 40: 391-397.
100. Yang GY, Taboada S, Liao J. Inflammatory bowel disease: a model of chronic inflammation-induced cancer. *Methods Mol Biol* 2009; 511: 193-233.
101. Friedman S. Cancer in Crohn's disease. *Gastroenterol Clin North Am* 2006; 35: 621-639.
102. Marnett LJ. Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis* 2000; 21: 361-370.
103. Wang D, Kreuzer D, Essigmann JM. Mutagenicity and repair of oxidative DNA damage: insights from studies using defined lesions. *Mutat Res* 1998; 400: 99-115.
104. Morgan WF, Corcoran J, Hartmann A, Kaplan MI, Limoli CL, Ponnaiya B. DNA double-strand breaks, chromosomal rearrangements, and genomic instability. *Mutat Res* 1998; 404: 125-128.
105. Artandi SE, DePinho RA. A critical role for telomeres in suppressing and facilitating carcinogenesis. *Curr Opin Genet Dev* 2000; 10: 39-46.
106. Cottliar A, Fundia A, Boerr L et al. High frequencies of telomeric associations, chromosome aberrations, and sister chromatid exchanges in ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol* 2000; 95: 2301-2307.
107. O'Sullivan JN, Bronner MP, Brentnall TA, et al. Chromosomal instability in ulcerative colitis is related to telomere shortening. *Nat Genet* 2002; 32: 280-284.
108. Kinouchi Y, Hiwatashi N, Chida M et al. Telomere shortening in the colonic mucosa of patients with ulcerative colitis. *J Gastroenterol* 1998; 33: 343-348.
109. Wink DA, Vodovotz Y, Laval J, Laval F, Dewhirst MW, Mitchell JB. The multifaceted roles of nitric oxide in cancer. *Carcinogenesis* 1998; 19: 711-721.
110. Agoff SN, Brentnall TA, Crispin DA et al. The role of cyclooxygenase 2 in ulcerative colitis-associated neoplasia. *Am J Pathol* 2000; 157: 737-745.

111. Steele VE, Hawk ET, Viner JL, Lubet RA. Mechanisms and applications of non-steroidal anti-inflammatory drugs in the chemoprevention of cancer. *Mutat Res* 2003; 523: 137–144.
112. Aust DE, Terdiman JP, Willenbacher RF, Chang CG, Molinaro-Clark A, Baretton GB, et al. The APC/b-catenin pathway in ulcerative colitis-related colorectal carcinomas: a mutational analysis. *Cancer* 2002; 94: 1421–1427.
113. Redston MS, Papadopoulod N, Caldas C, Kinzler KW, Kern SE. Common occurrence of APC and K-ras gene mutations in the spectrum of colitis-associated neoplasias. *Gastroenterology* 1995; 108: 383–392.
114. Tarmin L, Yin J, Harpaz N et al. Adenomatous polyposis coli gene mutations in ulcerative colitis-associated dysplasias and cancers versus sporadic colon neoplasms. *Cancer Res* 1995; 55: 2035–2038.
115. Persson PG, Karlén P, Bernell O, Leijonmarck CE, Broström O, Ahlbom A and Hellers G. Crohn's disease and cancer: a population-based cohort study. *Gastroenterology* 1994; 107: 1675-1679.
116. Issa JP, Ahuja N, Toyota M, Bronner MP, Brentnall TA. Accelerated age-related CpG island methylation in ulcerative colitis. *Cancer Res* 2001; 61: 3573–3577.
117. Willenbacher RF, Zelman SJ, Ferrell LD, Moore DH, Waldman FM. Chromosomal alterations in ulcerative colitis-related neoplastic progression. *Gastroenterology* 1997; 113: 791–801.
118. Willenbacher RF, Aust DE, Chang CG et al. Genomic instability is an early event during the progression pathway of ulcerative-colitis-related neoplasia. *Am J Pathol* 1999; 154: 1825–1830.
119. Rabinovitch PS, Dziadon S, Brentnall TA et al. Pancolonial chromosomal instability precedes dysplasia and cancer in ulcerative colitis. *Cancer Res* 1999; 59: 5148–5153.
120. Conlin A, Smith G, Carey F, Wolf CR, Steele RJ. The prognostic significance of K-ras, p53, and APC mutations in colorectal carcinoma. *Gut* 2005; 54: 1283-6.
121. Itzkowitz SH, Kim YS. Colonic Polyps and Polyposis Syndromes In; Feldman M, Scharschmidt BF, Sleisenger MH, eds. *Sleisenger's and Fordtran's Gastrointestinal and Liver Disease*. Philadelphia: WB Saunders, 1998; 1865.
122. Colliver DW, Crawford NP, Eichenberger MR, Zacharius W, Petras RE, Stromberg AJ and Galandiuk S. Molecular profiling of ulcerative colitis-associated neoplastic progres-

sion. *Exp Mol Pathol* 2006; 80: 1-10.

123. Chen R, Rabinovitch PS, Crispin DA et al. DNA fingerprinting abnormalities can distinguish ulcerative colitis patients with dysplasia and cancer from those who are dysplasia/cancer free. *Am J Pathol* 2003; 162: 665–672.

124. Hammarberg C, Slezak P, Tribukait B. Early detection of malignancy in ulcerative colitis: a flow-cytometric DNA study. *Cancer* 1984; 53: 291–295.

125. Melville DM, Jass JS, Shepherd NA et al. Dysplasia and deoxyribonucleic acid aneuploidy in the assessment of precancerous changes in chronic ulcerative colitis: observer variation and correlations. *Gastroenterology* 1988; 95: 668–675.

126. Suzuki H, Harpaz N, Tarmin L et al. Microsatellite instability in ulcerative colitis-associated colorectal dysplasias and cancers. *Cancer Res* 1994; 54: 4841–4844.

127. Cawkwell L, Sutherland F, Murgatroyd H et al. Defective hMSH2/hMLH1 protein expression is seen infrequently in ulcerative colitis associated colorectal cancers. *Gut* 2000; 46: 367–369.

128. Noffsinger AE, Belli JM, Fogt F, Fischer J, Goldman H, Fenoglio-Preiser CM. A germline hMSH2 alteration is unrelated to colonic microsatellite instability in patients with ulcerative colitis. *Hum Pathol* 1999; 30: 8–12.

129. Brentnall TA, Crispin DA, Bronner MP et al. Microsatellite instability in nonneoplastic mucosa from patients with chronic ulcerative colitis. *Cancer Res* 1996; 56: 1237–1240.

130. Heinen CD, Noffsinger AE, Belli J et al. Regenerative lesions in ulcerative colitis are characterized by microsatellite mutation. *Genes Chromosomes Cancer* 1997; 19: 170–175.

131. Brentnall TA, Crispin DA, Rabinovitch PS et al. Mutations in the p53 gene: an early marker of neoplastic progression in ulcerative colitis. *Gastroenterology* 1994; 107: 369–378.

132. Levine AJ. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 1997; 88: 323–331.

133. Chaubert P, Benhattar J, Saraga E, Costa J. K-ras mutations and p53 alterations in neoplastic and nonneoplastic lesions associated with longstanding ulcerative colitis. *Am J Pathol* 1994; 144: 767–775.

134. Harpaz N, Peck AL, Yin J et al. p53 protein expression in ulcerative colitis-associated colorectal dysplasia and carcinoma. *Hum Pathol* 1994; 25: 1069–1074.

135. Fogt F, Zhuang Z, Poremba C, Dockhorn-Dworniczak B, Vortmeyer A. Comparison

of p53 immunoexpression with allelic loss of p53 in ulcerative colitis-associated dysplasia and carcinoma. *Oncol Rep* 1998; 5: 477–480.

136. Burner GC, Crispin DA, Kolli VR et al. Frequent loss of a p53 allele in carcinomas and their precursors in ulcerative colitis. *Cancer Commun* 1991; 3: 167–172.

137. Yin J, Harpaz N, Tong Y et al. p53 point mutations in dysplastic and cancerous ulcerative colitis lesions. *Gastroenterology* 1993; 104: 1633–1639.

138. Kern SE, Redston M, Seymour AB et al. Molecular genetic profiles of colitis associated neoplasms. *Gastroenterology* 1994; 107: 420–428.

139. Holzmann K, Klump B, Borchard F et al. Comparative analysis of histology, DNA content, p53 and Ki-ras mutations in colectomy specimens with long-standing ulcerative colitis. *Int J Cancer* 1998; 76: 1–6.

140. Hussain SP, Amstad P, Raja K et al. Increased p53 mutation load in noncancerous colon tissue from ulcerative colitis: a cancer-prone chronic inflammatory disease. *Cancer Res* 2000; 60: 3333–3337.

141. Miyoshi Y, Nagase H, Ando H et al. Somatic mutations of the APC gene in colorectal tumors: mutation cluster region in the APC gene. *Hum Mol Genet* 1992; 1: 229–233.

142. Umetani N, Sasaki S, Watanabe T et al. Genetic alterations in ulcerative colitis-associated neoplasia focusing on APC, K-ras gene and microsatellite instability. *Jpn J Cancer Res* 1999; 90: 1081–1087.

143. Greenwald BD, Harpaz N, Yin J et al. Loss of heterozygosity affecting the p53, Rb, and mcc/apc tumor suppressor gene loci in dysplastic and cancerous ulcerative colitis. *Cancer Res* 1992; 52: 741–745.

144. Fogt F, Vortmeyer AO, Goldman H, Giordano TJ, Merino MJ, Zhuang Z. Comparison of genetic alterations in colonic adenoma and ulcerative colitis associated dysplasia and carcinoma. *Hum Pathol* 1998; 29: 131–136.

145. Meltzer SJ, Mane SM, Wood PK et al. Activation of c-Ki-ras in human gastrointestinal dysplasias determined by direct sequencing of polymerase chain reaction products. *Cancer Res* 1990; 50: 3627–3630.

146. Burner GC, Levine DS, Kulander BG, Haggitt RC, Rubin CE, Rabinovitch PS. C-Ki-ras mutations in chronic ulcerative colitis and sporadic colon carcinoma. *Gastroenterology* 1990; 99: 416–420.

147. Bell SM, Kelly SA, Hoyle JA et al. c-Ki-ras gene mutations in dysplasia and

- carcinomas complicating ulcerative colitis. *Br J Cancer* 1991; 64: 174–178.
148. Sonnenberg A, McCarty DJ, Jacobsen SJ. Geographic variation of inflammatory bowel disease within the United States. *Gastroenterology* 1991; 100: 143–149.
149. Noffsinger A, Kretschmer S, Belli J, Fogt F, Fenoglio-Preiser C. Microsatellite instability is uncommon in intestinal mucosa of patients with Crohn's disease. *Dig Dis Sci* 2000; 45: 378–384.
150. Souza RF, Yin J, Smolinski KN et al. Frequent mutation of the E2F-4 cell cycle gene in primary human gastrointestinal tumors. *Cancer Res* 1997; 57: 2350–2353.
151. Macarthur M, Hold GL, El-Omar EM. Inflammation and Cancer: Role of chronic inflammation and cytokine gene polymorphisms in the pathogenesis of gastrointestinal malignancy. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004; 286: 515-20.
152. Holmgren L, O'Reilly MS, Folkman J. Dormancy of micrometastases: Balanced proliferation and apoptosis in the presence of angiogenesis suppression. *Nat Med* 1995; 1: 149-53.
153. Gabrilovich D, Ciernik F, Carbone DP. Dendritic cells in anti-tumor immune responses. Defective antigen presentation in tumor-bearing hosts. *Cell Immunol* 1996; 170: 101.
154. Vitale G, Dicitore A, Gentilini D, Cavagnini F. Immunomodulatory effects of VEGF: Clinical implications of VEGF targeted therapy in human cancer. *Cancer Biology & Therapy* 2010; 9: 694-698.
155. Basu A, Hoerning A, Datta D, Edelbauer M, Stach MP, Calzadilla K et al. Cutting Edge: Vascular Endothelial Growth Factor Mediated Signaling in human CD45RO+ CD4+ T cells Promotes Akt and ERK Activation and Costimulates IFN- γ Production. *Journal Immunology* 2013; 184: 545-549.
156. Kondo Y, Arii S, Furutani M, Isigami S, Mori A, Orodera H et al. Implication of vascular endothelial growth factor and p53 status for angiogenesis in noninvasive colorectal carcinoma. *Cancer* 2000; 88: 1820-27.
157. Arii S, Mori A, Uchid S, Fujimoto K, Shimada Y, Imamura M. Implication of vascular endothelial growth factor in the development and metastasis of human cancers. *Hum Cell* 1999; 12: 25-30.
158. Harada H, Nakagawa K, Iwata S, Saito M, Kumon Y, Akaki S et al. Restoration of Wild Type p16 Down-Regulates Vascular Endothelial Growth Factor Expression and Inhibits

Angiogenesis in Human Gliomas. *Cancer Research* 1999; 59: 3783-3789.

159. Deschoolmeester V, Baay M, Specenier P, Lardon F, Vermorken JB. A review of the most promising biomarkers in colorectal cancer: one step closer to targeted therapy. *Oncologist* 2010; 15: 699-731.

160. Jass JR, Whitehall VL, Young J, Leggett BA. Emerging concepts in colorectal neoplasia. *Gastroenterology* 2002; 123: 862-76.

161. Perea J, Lomas M, Hidalgo M. Molecular basis of colorectal cancer: Towards an individualized management? *Rev Esp Enferm Dig* 2011; 103: 29-35.

162. Worthley DL, Leggett BA. Colorectal cancer: Molecular features and clinical opportunities. *Clin Biochem Rev* 2010; 31: 31-8.

163. Markowitz SD, Bertagnolli MM. Molecular Basis of Colorectal Cancer. *N Engl J Med* 2009; 361: 2449-60.

164. Zlobec I, Lugli A. Prognostic and predictive factors in colorectal cancer. *J Clin Pathol* 2008; 61: 561-9.

165. Duffy MJ. Carcinoembryonic Antigen as a Marker for Colorectal Cancer: Is It Clinically Useful? *Clinical Chemistry* 2001; 47: 624-630.

166. Mantovani A, Allavena P, Sica A. Tumour-associated macrophages as a prototypic type II polarised phagocyte population: role in tumour progression. *Eur J Cancer* 2004; 40: 1660-1667.

167. Nishimura T, Nakui M, Sato M, Iwakabe K, Kitamura H, Sekimoto M, Ohta A, Koda T and Nishimura S. The critical role of Th1-dominant immunity in tumor immunology. *Cancer Chemother Pharmacol* 2000; 46: 52-61.

168. Plunkett TA, Correa I, Miles DW and Taylor-Papadimitriou J. Breast cancer and the immune system: opportunities and pitfalls. *J. Mammary. Gland. Biol. Neoplasia* 2001; 6: 467-475.

169. Ito N, Nakamura H, Tanaka Y and Ohgi S. Lung carcinoma: analysis of T-helper type 1 and 2 cells and T-cytotoxic type 1 and 2 cells by intracellular cytokine detection with flow cytometry. *Cancer* 1999; 85: 2359-2367.

170. Dobrzanski MJ, Reome JB, Hylindand JC, Rewers-Felkins KA. CD8-Mediated Type 1 Antitumor Responses Selectively Modulate Endogenous Differentiated and Nondifferentiated T Cell Localization, Activation, and Function in Progressive Breast Cancer. *J Immunol* 2006; 177: 8191-8201.

171. Ellyard JI, Simson L, Parish CR. Th2-mediated anti-tumour immunity: friend or foe? *Tissue Antigens* 2007; 70: 1-11.
172. Bennett SR, Carbone FR, Karamalis F, Miller JF, Heath WR. Induction of a CD8+ cytotoxic T lymphocyte response by cross-priming requires cognate CD4+ T cell help. *J Exp Med* 1997; 186: 65-70.
173. Smith CM, Wilson NS, Waithman J et al. Cognate CD4(+) T cell licensing of dendritic cells in CD8(+) T cell immunity. *Nat Immunol* 2004; 5: 1143-1148.
174. Lizée G, Radvanyi LG, Overwijk WW, Hwu P. Improving antitumor immune responses by circumventing immunoregulatory cells and mechanisms. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 4794-4803.
175. Sakaguchi S. Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat Immunol* 2005; 6: 345-352.
176. Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 1986; 136: 2348-2357.
177. Mosmann TR, Sad S. The expanding universe of T cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol Today* 1996; 17: 138-146.
178. Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR. Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol* 2005; 6: 1123-1132.
179. Stout RD, Bottomly K. Antigen-specific activation of effector macrophages by IFN-gamma producing (TH1) T cell clones. Failure of IL-4-producing (TH2) T cell clones to activate effector function in macrophages. *J Immunol* 1989; 142: 760-765.
180. Hung K, Hayashi R, Lafond-Walker A, Lowenstein C, Pardoll D, Levitsky H. The central role of CD4(1) T cells in the antitumor immune response. *J Exp Med* 1998; 188: 2357-2368.
181. Pardoll DM, Topalian SL. The role of CD4+ T cell responses in antitumor immunity. *Curr Opin Immunol* 1998; 10: 588-594.
182. Heidenhain M. Noch einmal über die darstellung der centralkörper durch eishamatoxylin nebst einigen allgemeinen bemerkungen über die hamatoxylinfarben. *Z Wiss Mikrosk* 1896; 13: 186.
183. Gurr AB. *Biological staining methods*. Hopkin and Williams Chadowell Heath 1976.

184. Radosavljevic G, Ljubic B, Jovanovic I, Srzentic Z, Pavlovic S, Zdravkovic N et al. Interleukin-17 may be a valuable serum tumour marker in patients with colorectal carcinoma. *Neoplasma* 2010; 57: 135-44.
185. Abrahao AC, Bonelli BV, Nunes FD, Dias EP, Cabral MG. Immunohistochemical expression of p53, p16 and hTERT in oral squamous cell carcinoma and potentially malignant disorders. *Braz Oral Res* 2011; 25: 34-41.
186. Shih DQ, Targan SR. Immunopathogenesis of inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2008; 126: 1620-1633.
187. Abbas AK, Murphy KM, Sher A. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* 1996; 383: 787.
188. Kolls JK and Linden A. Interleukin 17 family members and inflammation. *Immunity* 2004; 21: 467-476.
189. McKenzie BS, Kastelein RA, Cua DJ. Understanding the IL-23-IL-17 immune pathway. *Trends Immunol* 2006; 27: 17-23.
190. Kallmann BA, Hüther M, Tubes M, Feldkamp J, Bertrams J, Gries FA, Lampeter EF, Kolb H. Systemic bias of cytokine production toward cell-mediated immune regulation in IDDM and toward humoral immunity in Graves' disease. *Diabetes* 1997; 46: 237-43.
191. Hyun JG, Mayer L. Mechanisms underlying inflammatory bowel disease. *Drug Discov Today Dis Mech* 2006; 3: 457-62.
192. Li MC, He SH. IL-10 and its related cytokines for treatment of inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 620-625.
193. Chung YC, Chang YF. Serum interleukin-6 levels reflect the disease status of colorectal cancer. *Journal of Surgical Oncology* 2003; 83: 222-226.
194. Ueda T, Shimada E, Urakawa T. Serum levels of cytokines in patients with colorectal cancer: possible involvement of interleukin-6 and interleukin-8 in hematogenous metastasis. *J Gastroenterol* 1994; 29: 423-9.
195. Suzuki A, Hanada T, Mitsuyama K et al. CIS3/SOCS3/SSI3 plays a negative regulatory role in STAT3 activation and intestinal inflammation. *J Exp Med* 2001; 193: 471-481.
196. Atreya R, Mudter J, Finotto S et al. Blockade of interleukin 6 trans signaling suppresses T-cell resistance against apoptosis in chronic intestinal inflammation: Evidence in Crohn disease and experimental colitis in vivo. *Nat Med* 2000; 6: 583-588.
197. Reinisch W, Gasche C, Tillinger W et al. Clinical relevance of serum interleukin-6 in

Crohn's disease: single point measurements, therapy monitoring, and prediction of clinical relapse. *Am J Gastroenterol* 1999; 94: 2156–2164.

198. Murata Y, Ishiguro Y, Itoh J, Munakata A, Yoshida Y. The role of proinflammatory and immunoregulatory cytokines in the pathogenesis of ulcerative colitis. *J Gastroenterol* 1995; 30: 56-60.

199. Atreya R, Neurath MF. Involvement of IL-6 in the pathogenesis of inflammatory bowel disease and colon cancer. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology* 2005; 28: 187-195.

200. Zhou L, Ivanov II, Spolski R, Min R, Shenderov K, Egawa T et al. IL-6 programs T(H)-17 cell differentiation by promoting sequential engagement of the IL-21 and IL-23 pathways. *Nat Immunol* 2007; 8: 967-974.

201. Dominitzki S, Fantini MC, Neufert C et al. Cutting edge: trans-signaling via the soluble IL-6R abrogates the induction of FoxP3 in naive CD4CD25 T cells. *J Immunol* 2007; 179: 2041–2045.

202. Yao Z, Franslow WC, Seldin MF, Rousseau AM, Painter SL, Comeau MR, Cohen JI and Spriggs MK. Herpesvirus saimiri encodes a new cytokine IL-17 which binds to novel cytokine receptor. *Immunity* 1995; 3: 811-821.

203. Shin HC, Benbernou N, Esnault S and Guenounou M. Expression of IL-17 in human memory CD45RO+ T lymphocytes and its regulation by protein kinase A pathway. *Cytokine* 1999; 11: 257-266.

204. Schwartz S, Beaulieu JF and Ruemmele FM. Interleukin-17 is a potent immuno-modulator and regulator of normal human intestinal epithelial cell growth. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 337: 505-509.

205. Shimada M, Andoh A, Hata K et al. IL-6 secretion by human pancreatic periacinar myofibroblasts in response to inflammatory mediators. *J Immunol* 2002; 168: 861–8.

206. Chabaud M, Lubberts E, Joosten L et al. IL-17 derived from juxta-articular bone and synovium contributes to joint degradation in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res* 2001; 3:168–77.

207. Matusевичius D, Kivisakk P, He B et al. Interleukin-17 mRNA expression in blood and CSF mononuclear cells is augmented in multiple sclerosis. *Mult Scler* 1999; 5: 101–4.

208. Kurasawa K, Hirose K, Sano H, et al. Increased interleukin-17 production in patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 2000; 43: 2455–63.

209. Wong CK, Ho CY, Li EK, et al. Elevation of proinflammatory cytokine (IL-18, IL-17, IL-12) and Th2 cytokine (IL-4) concentrations in patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus* 2000; 9: 589–93.
210. Albanesi C, Scarponi C, Cavani A, et al. Interleukin-17 is produced by both Th1 and Th2 lymphocytes, and modulates interferon- γ - and interleukin-4-induced activation of human keratinocytes. *J Invest Dermatol* 2000; 115: 81–7.
211. Luzzza F, Parrello T, Monteleone G et al. Up-regulation of IL-17 is associated with bioactive IL-8 expression in *Helicobacter pylori*-infected human gastric mucosa. Up-regulation of IL-17 is associated with bioactive IL-8 expression in *Helicobacter pylori*-infected human gastric mucosa. *J Immunol* 2000; 165: 5332–7.
212. Linden A. Role of interleukin-17 and the neutrophil in asthma. *Int Arch Allergy Immunol* 2001; 126: 179–84.
213. Hsieh HG, Loong CC, Lui WY, et al. IL-17 expression as a possible predictive parameter for subclinical renal allograft rejection. *Transpl Int* 2001; 14: 289–98.
214. Fujino S, Andoh A, Bamba S, Ogawa A, Hata K, Araki Y, Bamba T, Fujiyama Y. Increased expression of interleukin 17 in inflammatory bowel disease. *Gut* 2003; 52: 65-70.
215. Roda G, Sartini A, Marocchi M, Belluzzi A, Caponi A, Rosati G, Ugolini G, Roda A, Roda E, Mazzella G. Mucosal cytokine profiles in inflammatory bowel disease patients. University of Bologna, Bologna, poster presentation ECCO 2012.
216. Lin W, Karin M. A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer. *J Clin Invest* 2007; 117: 1175–1183.
217. Cho ML, Kang JW, Moon YM et al. STAT3 and NF- κ B signal pathway is required for IL-23-mediated IL-17 production in spontaneous arthritis animal model IL-1 receptor antagonist-deficient mice. *J Immunol* 2006; 176: 5652–5661.
218. Paul G, Khare V, Gasche C. Inflamed gut mucosa: downstream of interleukin-10. *Eur J Clin Invest* 2012; 42: 95–109.
219. Fiorentino DF, Bond MW, Mosmann TR. Two types of mouse T helper cell IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J Exp Med* 1989; 170: 2081–2095.
220. Fiorentino DF, Zlotnik A, Vieira P et al. IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells. *J Immunol* 1991; 146: 3444–51.
221. Schreiber S, Heinig T, Thiele HG, Raedler A. Immunoregulatory role of interleukin

- 10 in patients with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1995; 108: 1434–1444.
222. Bogdan C, Vodovotz Y, Nathan C. Macrophage deactivation by interleukin 10. *J Exp Med* 1991; 174: 1549-55.
223. de Waal Malefyt R, Haanen J, Spits H et al. Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen presenting capacity of monocytes via down regulation of class II major histocompatibility complex expression. *J Exp Med* 1991; 174: 915-24.
224. Fiorentino DF, Zlotnik A, Mosmann TR et al. IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. *J Immunol* 1991; 147: 3815-22.
225. D'Andrea A, Aste Amezaga M, Valiante NM et al. Interleukin 10 (IL-10) inhibits human lymphocyte interferon gamma production by suppressing natural killer cell stimulatory factor IL-12 synthesis in accessory cells. *J Exp Med* 1993; 178: 1041-8.
226. Niessner M, Volk BA. Altered Th1/Th2 cytokine profiles in the intestinal mucosa of patients with inflammatory bowel disease as assessed by quantitative reversed transcribed polymerase chain reaction (RT-PCR). *Clinical & Experimental Immunology* 1995; 101: 428–435.
227. Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, et al. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol* 2001; 19: 683–765.
228. Linskens R, van Bodegraven A, Schoorl M et al. Predictive value of inflammatory and coagulation parameters in the course of severe ulcerative colitis. *Dig Dis Sci* 2001; 46: 644–648.
229. Moran A, Jones A, Asquith P. Laboratory markers of colonoscopic activity in ulcerative colitis and Crohn's colitis. *Scand J Gastroenterol* 1995; 30: 356-360.
230. Schunk K, Kern A, Oberholzer K et al. Hydro-MRI in Crohn's disease: appraisal of disease activity. *Invest Radiol* 2000; 35: 431–437.
231. Gomes P, du Boulay C, Smith C et al. Relationship between disease activity indices and colonoscopic findings in patients with colonic inflammatory bowel disease. *Gut* 1986; 27: 92-95.
232. Solem CA, Loftus EV, Tremaine WJ, Harmsen WS, Zinsmeister AR, Sandborn WJ. Correlation of C-reactive protein with clinical, endoscopic, histologic and radiographic activity in inflammatory bowel disease. *Inflammatory Bowel Diseases* 2005; 11: 707–712.

233. Osada T, Ohkusa T, Okayasu I, Yoshida T, Hirai S, Beppu K, Shibuya T, Sakamoto N, Kobayashi O, Nagahara A, Terai T, Watanabe S. Correlations among total colonoscopic findings, clinical symptoms, and laboratory markers in ulcerative colitis. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 2008; 23: 262–267.
234. Gussekloo J, Schaap MC, Frolich M, Blauw GJ, Westendorp RG. C-reactive protein is a strong but nonspecific risk factor of fatal stroke in elderly persons. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20: 1047-1051.
235. Grimm Jr RH, Neaton JD, Ludwig W. Prognostic importance of the white blood cell count for coronary, cancer, and all-cause mortality. *JAMA* 1985; 254: 1932-1937.
236. Friedman GD, Fireman BH. The leukocyte count and cancer mortality. *Am J Epidemiol* 1991; 133: 376-380.
237. Yano K, Grove JS, Chen R et al. Plasma fibrinogen as a predictor of total and cause-specific mortality in elderly Japanese-American men. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21: 1065-1070.
238. Artis D. Epithelial-cell recognition of commensal bacteria and maintenance of immune homeostasis in the gut. *Nat Rev Immunol* 2008; 8: 411.
239. Begue B, Wajant H, Bambou JC, Dubuquoy L, Siegmund D, Beaulieu JF, Canioni D, Berrebi D, Brousse N, Desreumaux P et al. Implication of TNF-related apoptosis-inducing ligand in inflammatory intestinal epithelial lesions. *Gastroenterology* 2006; 130: 1962–1974.
240. Kruglov AA, Kuchmiy A, Grivennikov SI, Tumanov AV, Kuprash DV, Nedospasov SA. Physiological functions of tumor necrosis factor and the consequences of its pathologic overexpression or blockade: mouse models. *Cytokine Growth Factor Rev* 2008; 19: 231–244.
241. Grivennikov SI, Kuprash DV, Liu ZG, Nedospasov SA. Intracellular signals and events activated by cytokines of the tumor necrosis factor superfamily: from simple paradigms to complex mechanisms. *Int Rev Cytol* 2006; 252: 129 –161.
242. Arnoud JP, Koehl C, Adloff M. Carcinoembryonic antigen (CEA) in diagnosis and prognosis of colorectal carcinoma. *Dis Colon Rectum* 1980; 23: 141-4.
243. Kobayashi T, Okamoto S, Hisamatsu T, Kamada N, Chinen H, Saito R et al. IL23 differentially regulates the Th1/Th17 balance in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Gut* 2008; 57: 1682-1689.
244. Mukhopadhyay D, Zeng H, Bhattacharya R. Complexity in the vascular permeability

- factor/vascular endothelial growth factor (VEGF)-receptors signaling. *Mol Cell Biochem* 2004; 264: 51–61.
245. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 2003; 9: 669–676.
246. Beck PL, Podolsky DK. Growth factors in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 1999; 5: 44–60.
247. Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med* 1995; 1: 27–31.
248. Folkman J. Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery? *Nat Rev Drug Discov* 2007; 6: 273–286.
249. Folkman J. Angiogenesis. *Annu Rev Med* 2006; 57: 1–18.
250. Brown P, Bargen J, Weber HA. Chronic inflammatory lesions of the small intestine (regional enteritis). *Am J Dig Dis* 1934; 1: 426–431.
251. Kapsoritakis A, Sfiridaki A, Maltezos E et al. Vascular endothelial growth factor in inflammatory bowel disease. *Int J Colorectal Dis* 2003; 18: 418–422.
252. Chidlow JH, Shukla D, Grisham MB, Keivilian CG. Pathogenic angiogenesis in IBD and experimental colitis: new ideas and therapeutic avenues. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007; 293: 5–18.
253. Sato F, Harpaz N, Shibata D, Xu Y, Yin J, Mori Y, Zou TT, Wang S, Desai K, Leytin A, Selaru FM, Abraham JM and Meltzer SJ. Hypermethylation of the p14(ARF) gene in ulcerative colitis-associated colorectal carcinogenesis. *Cancer Res* 2002; 62: 1148–1151.
254. Di Sabatino A, Ciccocioppo R, Armellini E et al. Serum bFGF and VEGF correlate respectively with bowel wall thickness and intramural blood flow in Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 2004; 10: 573–577.
255. Kanazawa S, Tsunoda T, Onuma E et al. VEGF, basic-FGF, and TGF-beta in Crohn's disease and ulcerative colitis: a novel mechanism of chronic intestinal inflammation. *Am J Gastroenterol* 2001; 96: 822–828.
256. Griga T, Tromm A, Spranger J et al. Increased serum levels of vascular endothelial growth factor in patients with inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol* 1998; 33: 504–508.
257. Griga T, Werner S, Koller M et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) in Crohn's disease: increased production by peripheral blood mononuclear cells and decreased

- VEGF 165 labeling of peripheral CD14+monocytes. *Dig Dis Sci* 1999; 44: 1196–1201.
258. Ferrante M, Pierik M, Henckaerts L, Joossens M, Claes K, Van Schuerbeek N, Vlietinck R, Rutgeerts P, Van Assche G, Vermeire S. The role of vascular endothelial growth factor (VEGF) in inflammatory bowel disease. *Inflammatory Bowel Diseases* 2006; 12: 870–878.
259. Burner GC, Rabinovitch PS, Haggitt RC, Crispin DA, Brentnall TA, Kolli VR, Stevens AC and Rubin CE. Neoplastic progression in ulcerative colitis: histology, DNA content, and loss of a p53 allele. *Gastroenterology* 1992; 103: 1602–1610.
260. Sipos F, Molnár B, Zágoni T, Berczi L, Tulassay Z. Growth in Epithelial Cell Proliferation and Apoptosis Correlates Specifically to the Inflammation Activity of Inflammatory Bowel Diseases: Ulcerative Colitis Shown Specific p53 and EGFR Expression Alterations. *Disease of the Colon & Rectum* 2005; 48 (4): 775-786.
261. Alkim C, Savas B, Ensari A, Alkim H, Dagli U et al. Expression of p53, VEGF, Microvessel Density, and Cyclin-D1 non cancerous Tissue of Inflammatory Bowel Disease. *Digestive Diseases and Sciences* 2008; 54 (9): 1979-84.
262. Hsu SC, Volpert OV, Steck PA, Mikkelsen T, Polverini PJ, Rao S et al. Inhibition of angiogenesis in human glioblastomas by chromosome 10 induction of thrombospondin-1. *Cancer Res* 1996; 56: 5684–5691.
263. Van Meir EG, Polverini PJ, Chazin VR, Su Huang HJ, de Tribolet N, Cavenee WK. Release of an inhibitor of angiogenesis upon induction of wild type 53 expression in glioblastoma cells. *Nat Genet* 1994; 8: 171–176.
264. Mukhopadhyay D, Tsiokas L and Sukhatme VP. Wild-type p53 and v-Src exert opposing influences on human vascular endothelial growth factor gene expression. *Cancer Res* 1995; 55: 6161–6165.
265. Bouvet M, Ellis LM, Nishizaki M, Fujiwara T, Liu W, Bucana CD et al. Adenovirus-mediated wild-type p53 gene transfer down-regulates vascular endothelial growth factor expression and inhibits angiogenesis in human colon cancer. *Cancer Res* 1998; 58: 2288–2292.
266. Fontanini G, Boldrini L, Vignati S, Chine S, Basolo F, Silvestri V et al. Bcl2 and p53 regulate vascular endothelial growth factor (VEGF)-mediated angiogenesis in non-small cell lung carcinoma. *Eur J Cancer* 1998; 34: 718–723.
267. Crew JP, O'Brien T, Bradburn M, Fuggle S, Bicknell R, Cranston D et al. Vascular endothelial growth factor is a predictor of relapse and stage progression in superficial bladder cancer. *Cancer Res* 1997; 57: 5281–5285.

268. Murakami Y, Mizoguchi F, Saito T, Miyasaka N, Kohsaka H. p16 (INK4a) exerts an anti-inflammatory effect through accelerated IRAK1 degradation in macrophages. *J Immunol* 2012; 189: 5066-5072.
269. Santra M, Mann DM, Mercer EW, Skorski T, Calabretta B and Iozzo RV. Ectopic expression of decorin protein core causes a generalized growth suppression in neoplastic cells of various histogenetic origin and requires endogenous p21, an inhibitor of cyclin-dependent kinases. *J Clin Inv* 2013; 2: 149-157.
270. Kim YS, Hong SW, Choi JP, Shin TS, Moon HG, Choi EJ et al. Vascular endothelial growth factor is a key mediator in the development of T cell priming and its polarization to type 1 and type 17 T helper cells in the airways. *J Immunol* 2009; 183: 5113-5120.
271. Marek A, Brodzicki J, Liberek A, Korzon M. TGF-beta (transforming growth factor-beta) in chronic inflammatory conditions a new diagnostic and prognostic marker? *Med Sci Monit* 2002; 8: 145-151.
272. Romagnani S, Maggi E, Liotta F, Cosmi L, Annunziato F. Properties and origin of human Th17 cells. *Mol Immunol* 2009; 47: 3-7.
273. Oukka M. Interplay between pathogenic Th17 and regulatory T cells. *Ann Rheum Dis* 2007; 66: 87-90.
274. Vojdani A, Lambert J. The Role of Th17 in Neuroimmune Disorders: Target for CAM Therapy. Part I. *Evid Based Complement Alternat Med* 2009.
275. Lohr J, Knoechel B, Caretto D, Abbas AK. Balance of Th1 and Th17 effector and peripheral regulatory T cells. *Microbes Infect* 2009; 11: 589-93.
276. Louten J, Boniface K, de Waal Malefyt R. Development and function of TH17 cells in health and disease. *J Allergy Clin Immunol* 2009; 123: 1004-11.
277. Ghilardi N, Ouyang W. Targeting the development and effector functions of TH17 cells. *Semin Immunol* 2007; 19: 383-93.
278. Fuss IJ, Heller F, Boirivant M, Leon F, Yoshida M, Fichtner-Feigl S et al. Non classical CD1d-restricted NK T cells that produce IL-13 characterize an atypical Th2 response in ulcerative colitis. *J Clin Invest* 2004; 113: 1490-1497.
279. Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK et al. Th-17 cells in the circle of immunity and autoimmunity. *Nat Immunol* 2007; 8: 345-350.
280. Moseley TA, Haudenschild DR, Rose L, Reddi AH. Interleukin-17 family and IL-17 receptors. *Cytokine Growth Factor Rev* 2003; 14: 155-174.

281. Jovanovic JA, Di Battista J, Martel-Pelletier FC, Jolicoeur Y et al. IL-17 stimulates the production and expression of proinflammatory cytokines, IL-beta and TNF-alpha, by human macrophages. *J Immunol* 1998; 160: 3513-3521.
282. Shalom-Barak T, Quach J and Lotz M. Interleukin 17 induced gene expression in articular chondrocytes is associated with activation of mitogen activated protein kinases and NF-kappa. *J Biol Chem* 1998; 273: 27467-27473.
283. Fossiez F, Djossou O, Chormarat P, Flores-Romo L, Ait-Yahia S, Matt C, Pin JJ, Garrone P, Garcia E, Saeland S et al. T cell interleukin-17 induced stromal cells to produce proinflammatory and hematopoietic cytokines. *J Exp Med* 1996; 183: 2593-2603.
284. Furth EE, Gustafson KS, Dai CY, Gibson SL, Menard-Katcher P, Chen T et al. Induction of the tumor-suppressor p16 (INK4a) within regenerative epithelial crypts in ulcerative colitis. *Neoplasia* 2006; 8 (6): 429-36.
285. Lam A, Kate O, Jafari GM, Yik-Hong H. p16 expression in colorectal adenocarcinoma: marker of aggressiveness and morphological types. *Pathology* 2008; 40 (6): 580-585.
286. Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity* 2004; 21: 137-148.
287. Dranoff G. Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2004; 4: 11-22.
288. Yang GJ, Taboada S, Liao J. Inflammatory bowel disease: a model of chronic inflammation-induced cancer. *Methods Mol Biol* 2009; 511: 193-233.
289. Gurova KV, Hill JE, Razorenova OV, Chumakov PM, Gudkov AV. p53 pathway in renal cell carcinoma is repressed by a dominant mechanism. *Cancer Res* 2004; 64: 1951-8.
290. Finlay CA, Hinds PW, Tan TH, Eliyahu D, Oren M, Levine AJ. Activating mutations for transformation by p53 produce a gene product that forms an hsc70-p53 complex with an altered half-life. *Mol Cell Biol* 1988; 8: 531-539.
291. Jonasch E, Haluska F. Interferon in oncological practice: Review of interferon biology, clinical application, and toxicities. *Oncologist* 2001; 6: 34-55.
292. Yang JL, Qu XJ, Russell PJ et al. Interferon-alpha promotes the antiproliferative effect of gefitinib (ZD 1839) on human colon cancer cell lines. *Oncology* 2005; 69: 224-238.
293. Stanilov N, Miteva L, Deliyevsky T, Jovchev J, Stanilova S. Advanced Colorectal Cancer Is Associated With Enhanced IL-23 and IL-10 Serum Levels. *LabMedicine* 2010; 41: 159-163.

294. Verreck FA, de Boer T, Langenberg DM, Hoeve MA, Kramer M, Vaisberg E, Kastelein R, Kolk A, de Waal-Malefyt R, Ottenhoff TH. Human IL-23-producing type 1 macrophages promote but IL-10 producing type 2 macrophages subvert immunity to (myco) bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 4560-4565.
295. Asadullah K, Sterry W and Volk HD. Interleukin-10 Therapy Review of a New Approach *Pharmacological Reviews* 2003; 55: 241-269.
296. Marti LC, Pavon L, Severino P, Sibov T, Guilhen D, Moreira-Filho CA. Vascular endothelial growth factor-A enhances indoleamine 2,3-dioxygenase expression by dendritic cells and subsequently impacts lymphocyte proliferation. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2013; 0: 0.
297. Fallarino F, Grohmann U, Hwang KW, Orabona C, Vacca S, Bianchi R et al. Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells. *Nat Immunol* 2003; 4: 1206-12.
298. Foti M, Granucci F and Ricciardi-Castagnoli P. A central role for tissue-resident dendritic cells in innate responses. *Trends Immunol* 2004; 25: 650-654.
299. Yang L, Carbone DP. Tumor-host immune interactions and dendritic cell dysfunction. *Adv Cancer Res* 2004; 92: 13-27.
300. Pinzon-Charry A, Maxwell T, López JA. Dendritic cell dysfunction in cancer: A mechanism for immunosuppression. *Immunol Cell Biol* 2005; 83: 451-461.
301. Rabinovich GA, Gabrilovich D, Sotomayor EM. Immunosuppressive strategies that are mediated by tumor cells. *Annu Rev Immunol* 2007; 25: 267-296.
302. Gabrilovich D. Mechanisms and functional significance of tumor-induced dendritic-cell defects. *Nat Rev Immunol* 2004; 4: 941-952.
303. Gabrilovich D, Pisarev V. Tumor escape from immune response: Mechanisms and targets of activity. *Curr Drug Targets* 2003; 4: 525-536.
304. Zou W. Regulatory T-cells, tumor immunity and immunotherapy. *Nat Rev Immunol* 2006; 6: 295-307.
305. Curiel TJ, Coukos G, Zou L, Alvarez X, Cheng P, Mottram P, Evdemon-Hogan M, Conejo-Garcia JR, Zhang L, Burow M, Zhu Y et al. Specific recruitment of regulatory T-cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med* 2004; 10: 942-949.
306. Vieweg J, Su Z, Dahm P, Kusmartsev S. Reversal of tumor-mediated immunosup-

pression. *Clin Cancer Res* 2007; 13: 727-732.

307. Banerjee DK, Dhodapkar MV, Matayeva E, Steinman RM, Dhodapkar KM. Expansion of FOXP3 high regulatory T-cells by human dendritic cells (DCs) in vitro and after injection of cytokine-matured DCs in myeloma patients. *Blood* 2006; 108: 2655-2661.

308. Uchida K, Schneider S, Yochim JM, Kuramochi H, Hayashi K, Takasaki K, Yang D, Danenberg KD, Danenberg PV. Intratumoral COX-2 gene expression is a predictive factor for colorectal cancer response to fluoropyrimidine-based chemotherapy. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 3363-3368.

309. Williams C, Shattuck-Brandt RL, Du Bois RN. The role of COX-2 in intestinal cancer. *Ann NY Acad Sci* 1999; 889: 72-83.

310. Inaba T, Sano H, Kawahito Y, Hla T, Akita K, Toda M, Yamashina I, Inoue M, Nakada H. Induction of cyclooxygenase-2 in monocyte/macrophage by mucins secreted from colon cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 2736-2741.

311. Soumaoro LT, Uetake H, Higuchi T, Takagi Y, Enomoto M, Sugihara K. Cyclooxygenase-2 expression: A significant prognostic indicator for patients with colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 8465-8471.

312. Muthuswamy R, Urban J, Lee JJ, Reinhart TA, Bartlett D, Kalinski P. Ability of mature dendritic cells to interact with regulatory T-cells is imprinted during maturation. *Cancer Res* 2008; 68: 5972-5978.

313. Gabrilovich DI, Chen HI, Girgis KR, Thomas Cunningham H, Meny GM, Nadag S, Kavanaugh D, Carbone DP. Production of vascular endothelial growth factor by human tumors inhibits the functional maturation of dendritic cells. *Nature Medicine* 1996; 2: 1096-1103.

314. Zhang P, McGrath BC, Reinert J, Olsen DS, Lei L, Gilli S, Wek SA, Vattem KM, Wek SR, Kimball SR et al. The GCN2 alpha2 kinase is required for adaptation to amino acid deprivation in mice. *Mol Cell Biol* 2002; 22: 6681-6688.

315. Osada T, Chong G, Tansik R, Hong T, Spector N, Kumar R, Hurwitz H, Dey I, Nixon AB, Lyerly HK. The effect of anti-VEGF therapy on immature myeloid cell and dendritic cells in cancer patients. *Cancer Immunology* 2008; 57: 1115-1124.

316. Mimura K, Kono K, Takahashi A, Kawaguchi Y, Fujii H. Vascular endothelial growth factor inhibits the function of human mature dendritic cells mediated by VEGF receptor-2. *Cancer Immunology* 2007; 56: 761-770.

317. Nakamura I, Shibata M, Gonda K, Yazawa T, Shimura T, Anazawa T et al. Serum levels of vascular endothelial growth factor are increased and correlate with malnutrition, immunosuppression involving MDSCs and systemic inflammation in patients with cancer of the digestive system. *Oncol Lett* 2013; 5: 1682-1686.
318. Nagaraj S, Gabrilovich DI. Myeloid-Derived Suppressor Cells. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 2007; 601: 213-223.
319. Ochoa AC, Zea AH, Hernandez C, Rodriguez PC. Arginase, prostaglandins, and myeloid-derived suppressor cells in renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2007; 13: 721–726.
320. Almand B et al. Increased production of immature myeloid cells in cancer patients. A mechanism of immunosuppression in cancer. *J Immunol* 2001; 166: 678–689.
321. Mirza N et al. All-trans-retinoic acid improves differentiation of myeloid cells and immune response in cancer patients. *Cancer Res* 2006; 66: 9299–9307.
322. Diaz-Montero CM et al. Increased circulating myeloid-derived suppressor cells correlate with clinical cancer stage, metastatic tumor burden, and doxorubicin-cyclophosphamide chemotherapy. *Cancer Immunol Immunother* 2009; 58: 49–59.
323. Cheng P, Corzo CA and Gabrilovich DI. Inhibition of dendritic cell differentiation and accumulation of myeloid-derived suppressor cells in cancer is regulated by S100A9 protein. *J Exp Med* 2008; 205: 2235-2249.
324. Huang B, Pan PY, Li Q, Sato AL, Levil DR, Bromberg J et al. Gr-1+CD115+ immature myeloid suppressor cells mediate the development of tumor-induced T regulatory cells and T-cell anergy in tumor-bearing host. *Cancer Res* 2006; 66: 1123-31.
325. Cudejko C, Wouters K, Fuentes L, Hannou SA, Paquet C, Bantubungi K et al. p16INK4a deficiency promotes IL-4-induced polarization and inhibits proinflammatory signaling in macrophages. *Blood* 2011; 118: 2556-2566.
326. Sica A, Larghi P, Mancino A, Rubino L, Porta C, Totaro MG et al. Macrophage polarization in tumour progression. *Semin Cancer Biol* 2008; 18: 349-355.
327. Jovanovic IP, Pejnovic NN, Radosavljevic GD, Arsenijevic NN, Lukic ML. IL-33/ST2 axis in innate and acquired immunity to tumors. *OncoImmunology* 2012; 1: 229-231.
328. Mantovani A, Sozzani S, Locati M, Allavena P, Sica A. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol* 2002; 23: 549-555.

329. Gordon S, Taylor PR. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol* 2005; 5: 953-964.
330. Mantovani A, Sica A, Locati M. Macrophage polarization comes of age. *Immunity* 2005; 23: 344-346.
331. Martinez FO, Helming L, Gordon S. Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective. *Annu Rev Immunol* 2009; 27: 451-483.
332. Lin EY, Li JF, Gnatovskiy L, Deng Y, Zhu L, Grzesik DA, Qian H, Xue XN, Pollard JW. Macrophages regulate the angiogenic switch in a mouse model of breast cancer. *Cancer Res* 2006; 66: 11238-11246.
333. Pollard JW. Trophic macrophages in development and disease. *Nat Rev Immunol* 2009; 9: 259-270.
334. Condeelis J, Pollard JW. Macrophages: obligate partners for tumor cell migration, invasion, and metastasis. *Cell* 2006; 124: 263-266.
335. Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol* 2004; 25: 677-686.
336. Gold P, Freedman SO. Demonstration of tumor-specific antigens in human colonic carcinomata by immunological tolerance and absorption techniques. *J Exp Med* 1965; 121: 439-62.
337. Gold P, Freedman SO. Specific carcinoembryonic antigens of the human digestive system. *J Exp Med* 1965; 122: 467-81.
338. Boucher D, Cournoyer D, Stanners CP, Fuks A. Studies on the control of gene expression of the carcinoembryonic antigen family in human tissue. *Cancer Res* 1989; 49: 847-52.
339. Biomarkers Definitions Working Group. Biomarkers and surrogate end points: preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther* 2001; 69: 89-95.
340. Thomas P, Toth CA, Saini KS, Jessup JM, Steele G. The structure, metabolism and function of the carcinoembryonic antigen gene family. *Biochim Biophys Acta* 1990; 1032: 177-89.
341. Jessup JM, Thomas P. Carcinoembryonic antigen: function in metastasis by human colorectal carcinoma. *Cancer Metastasis Rev* 1989; 8: 263-80.
342. Cromheecke M, de Jong KP, Hoekstra HJ. Current treatment for colorectal cancer

- metastatic to the liver. *Eur J Surg Oncol* 1999; 25: 451–63.
343. Wagner JS, Adson MA, van Heerden JA, Adson MH, Ilstrup DM. The natural history of hepatic metastases from colorectal cancer: a comparison with resective treatment. *Ann Surg* 1984; 199: 502–8.
344. Forslund A, Engaras B, Lonroth C, Lundholm K. Prediction of postoperative survival by preoperative serum concentrations of anti-p53 compared to CEA, CA 50, CA 242 and conventional blood tests in patients with colorectal carcinoma. *Oncology* 2004; 66: 126-31.
345. Reiter W, Stieber P, Reuter C, Nagel D et al. Multivariate analysis of the prognostic value of CEA and CA 19-9 serum levels in colorectal cancer. *Anticancer Res* 2000; 20: 5195-8.
346. Dalerba P, Maccalli C, Casati C et al. Immunology and immunotherapy of colorectal cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* 2003; 46: 33–57.
347. Mocellin S, Maricola FM, Young HA. Interleukin-10 and the immune response against cancer: A counterpoint. *J Leukoc Biol* 2004; 78: 1043–1051.
348. O’Hara RJ, Greenman J, MacDonald AW et al. Advanced colorectal cancer is associated with impaired interleukin 12 and enhanced interleukin 10 production. *Clin Cancer Res* 1998; 4: 1943–1948.
349. Lech-Maranda E, Bienvenu J, Michallet AS et al. Elevated IL-10 plasma levels correlate with poor prognosis in diffuse large B-cell lymphoma. *Eur Cytokine Netw* 2006; 17: 60–66.
350. Jebreel A, Mistry D, Loke D et al. Investigation of interleukin 10, 12, and 18 levels in patients with head and neck cancer. *J Laryngol Otol* 2007; 121: 246–252.
351. Mustea A, Könsgen D, Braicu EI et al. Expression of IL-10 in patients with ovarian carcinoma. *Anticancer Res* 2006; 26: 1715–1818.
352. Nielsen OH, Køppen T, Rüdiger N, Horn T, Eriksen J, Kirman I. Involvement of interleukin-4 and 10 in inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci* 1996; 41: 1786-1793.
353. Stanilov N, Miteva L, Stankova N, Jovchev J, Deliyski T, Stanilova S. Role of IL-12P40 and IL-10 in progression of colorectal cancer. *Khirurgiia* 2010; (4-5): 26-9.
354. Gianotti L, Fortis C, Braga M et al. Radical oncologic surgery affects the circulatory levels of interleukin 10. *J Surg Oncol* 1997; 66: 244–247.
355. Mocellin S, Panelli MC, Wang E et al. The dual role of IL-10. *Trends Immunol* 2003; 24: 36–43.

356. Galizia G, Orditura M, Romano C et al. Prognostic significance of circulating IL-10 and IL-6 serum levels in colon cancer patients undergoing surgery. *Clin Immunol* 2002; 102: 169–178.
357. Coussens LM and Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature* 2002; 420: 860-867.
358. Wilson J and Balkwill F. The role of cytokines in the epithelial cancer microenvironment. *Semin Cancer Biol* 2002; 12: 113-120.
359. Miki C, Tonouchi H, Wakuda R, Hatada T, Inoue Y, Minato E, Kobayashi M and Kusunoki M: Intra-tumoral interleukin-6 downregulation system and genetic mutations of tumor suppressor genes in colorectal cancer. *Cancer* 2002; 94: 1584-1592.
360. Greten FR, Eckmann L, Greten TF et al. IKKb links inflammation and tumorigenesis in a mouse model of colitis-associated cancer. *Cell* 2004; 118: 285–296.
361. Grivennikov S, Karin E, Terzic J et al. IL-6 and Stat3 are required for survival of intestinal epithelial cells and development of colitis associated cancer. *Cancer Cell* 2009; 15: 103–113.
362. Bollrath J, Greten FR. IKK/NF-kappaB and STAT3 pathways: central signalling hubs in inflammation-mediated tumour promotion and metastasis. *EMBO Rep* 2009; 10: 1314–1319.
363. Bromberg J, Wang TC. Inflammation and cancer: IL-6 and STAT3 complete the link. *Cancer Cell* 2009; 15: 79– 80.
364. Jess T, Winther KV, Munkholm P, Langholz E, Binder V. Intestinal and extra-intestinal cancer in Crohn's disease: follow-up of a population-based cohort in Copenhagen County, Denmark. *Aliment Pharmacol Ther* 2004; 19: 287-93.
365. Becker C, Fantini MC, Schramm C et al. TGF-beta suppresses tumor progression in colon cancer by inhibition of IL-6 trans signaling. *Immunity* 2004; 21: 491–501.
366. Tang Y, Katuri V, Srinivasan R et al. Transforming growth factor-beta suppresses non metastatic colon cancer through Smad4 and adaptor protein ELF at an early stage of tumorigenesis. *Cancer Res* 2005; 65: 4228–4237.
367. Li Y, de Haar C, Chen M, Deuring J, Gerrits MM, Smits R, Xia B, Kuipers EJ, van der Woude CJ. Disease-related expression of the IL6/STAT3/SOCS3 signalling pathway in ulcerative colitis and ulcerative colitis-related carcinogenesis. *Gut* 2010; 59: 227–235.
368. Lust JA and Donovan KA. The role of interleukin-1, in the pathogenesis of multiple myeloma. *Hematol Oncol Clin North Am* 1999; 13: 1117-1125.

369. Ito H and Miki C. Profile of circulating levels of interleukin-1 receptor antagonist and interleukin-6 in colorectal cancer patients. *Scand J Gastroenterol* 1999; 11: 1139-1143.
370. Fenton JJ, Hursting SD, Perkins SN, Hord NG. Interleukin-6 production induced by leptin treatment promotes cell proliferation in an Apc (Min) colon epithelial cell line. *Carcinogenesis* 2006; 27: 1507–1515.
371. Becker C, Fantini MC, Wirtz S et al. IL-6 signaling promotes tumor growth in colorectal cancer. *Cell Cycle* 2005; 4: 217–220.
372. Rogler G, Andus T. Cytokines in inflammatory bowel disease. *World J Surg* 1998; 22: 382–389.
373. Iijima H, Takahashi I, Kishi D, Kim JK, Kawano S, Hori M, Kiyono H. Alteration of interleukin 4 production results in the inhibition of T helper type 2 cell-dominated inflammatory bowel disease in T cell receptor alpha chain-deficient mice. *J Exp Med* 1999; 190: 607–615.
374. Mizoguchi A, Mizoguchi E, Bhan AK. The critical role of interleukin 4 but not interferon gamma in the pathogenesis of colitis in T-cell receptor alpha mutant mice. *Gastroenterology* 1999; 116: 320–326.
375. Rogy MA, Beinhauer BG, Reinisch W, Huang L, Pokieser P. Transfer of interleukin-4 and interleukin-10 in patients with severe inflammatory bowel disease of the rectum. *Hum Gene Ther* 2000; 11: 1731–1741.
376. Tartour E, Fossiez F, Joyeux I, Galinha A, Gey A, Claret E, Sastre-Garau X, Couturier J, Mosseri V, Vives V, Banchereau J, Fridman WH, Wijdenes J, Lebecque S, Sautès-Fridman C. Interleukin 17, a T-cell-derived cytokine, promotes tumorigenicity of human cervical tumors in nude mice. *Cancer Res* 1999; 59: 3698-3704.
377. Numasaki M, Fukushi J, Ono M, Narula SK, Zavodny PJ, Kudo T, Robbins PD, Tahara H, Lotze MT. Interleukin-17 promotes angiogenesis and tumor growth. *Blood* 2003; 101: 2620-2627.
378. Kato T, Furumoto H, Ogura T, Onishi Y, Irahara M, Yamano S, Kamada M, Aono T. Expression of IL-17 mRNA in ovarian cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 282: 735-738.
379. Hirahara N, Nio Y, Sasaki S, Minari Y, Takamura M, Iguchi C, Dong M, Yamasawa K, Tamura K. Inoculation of human interleukin-17 gene-transfected Meth-A fibrosarcoma cells induces T cell dependent tumor-specific immunity in mice. *Oncology* 2001; 61: 79-89.

380. Hirahara N, Nio Y, Sasaki S, Takamura M, Iguchi C, Dong M, Yamasawa K, Itakura M, Tamura K. Reduced invasiveness and metastasis of Chinese hamster ovary cells transfected with human interleukin-17 gene. *Anticancer Res* 2000; 20: 3137-3142.
381. Benchetrit F, Ciree A, Vives V, Warnier G, Gey A, Sautès-Fridman C, Fossiez F, Haicheur N, Fridman WH, Tartour E. Interleukin-17 inhibits tumor cell growth by means of a T-cell-dependent mechanism. *Blood* 2002; 99: 2114-2121.
382. Wong MP, Cheung N, Yuen ST, Leung SY and Chung LP. Vascular endothelial growth factor is up-regulated in the early premalignant stage of colorectal tumour progression. *Int J Cancer* 1999; 81: 845-850.
383. Huang W, Chen R, Hiang J, Zhang G. Expressions of serum IL-17 and IL-6 of patients colorectal carcinoma and their clinical significance. *Tumor* 2012; 32.
384. Prause O, Bozinovski S, Anderson GP and Linden A. Increased matrix metalloproteinase-9 concentration and activity after stimulation with interleukin-17 in mouse airways. *Thorax* 2004; 59: 313-317.
385. Matrisian LM, Wright J, Newell K and Witty JP. Matrix degrading metalloproteinases in tumor progression. *Princess Takamatsu Symp* 1994; 24: 152-161.
386. Roeb E, Dietrich CG, Winograd R, Arndt M, Breuer B, Fass J, Scumpelick V and Matern S. Activity and cellular origin of gelatinases in patients with colon and rectal cancer differential activity of matrix metalloproteinase-2. *Cancer* 2001; 92: 2680-2691.

ПРИЛОГ

8.1. КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАТИКА

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА

Редни број:
РБ

Идентификациони број:
ИБР

Тип документације: Монографска публикација
ТД

Тип записа: Текстуални штампани материјал
ТЗ

Врста рада: Докторска дисертација
ВР

Аутор: Др Наташа Д. Здравковић
АУ

Ментор/коментор Доц. др Иван П. Јовановић

Наслов рада: Експресија p16, p53, VEGF и цитокински профил у колоректалном карциному и инфламаторним болестима црева

Језик публикације: Српски (ћирилица)
ЈП

Језик извода: Српски/енглески
ЈИ

Земља публикавања: ЗП	Србија
Уже географско подручје: УГП	Србија
Година: ГО	2014.
Издавач: ИЗ	Ауторски репринт
Место и адреса: МС	34000 Крагујевац, Србија Светозара Марковића 69
Физички опис рада: ФО	Дисертација има 161 страну, 7 поглавља, 4 слике, 19 графикана, 29 табела и 386 референци
Научна област:	Медицина
Научна дисциплина: ДИ	Ендокринологија
Предметна одредница/кључне речи: ПО	колоректални карцином, инфламаторне болести црева p16, p53, VEGF, цитокини Th1, Th2, Th17
УДК	
Чува се: ЧУ	У Библиотеци факултета Медицинских наука у Крагујевцу 34000 Крагујевац Србија, Светозара Марковића 69
Важна напомена: МН	
Извод: ИД	

Абстракт:

АБ

Прогресија од инфламацијске болести црева до колоректалног карцинома је вишестепени процес, који укључује алтерацију тумор-супресорских гена, као што су p53 и p16. Циљ ове студије био је да испита обрасце експресије p16, p53 и VEGF у циљаном ткиву, као и серумске вредности цитокина (TNF- α , TGF- β , IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, IL-27 и IFN- γ) и туморских маркера (AFP, СА 19-9, СЕА) код испитаника са инфламацијском болешћу црева и колоректалним карциномом.

Серумске вредности цитокина код испитаника са улцерозним колитисом (n=24), Кроновом болешћу (n=5) и колоректалним карциномом (n=75), као и здравих контрола (n=37) анализирани су ELISA техником. Ендоскопске биопсије узорака циљаног ткива (улцерозни колитис, Кронова болест, колоректални карцином) анализирани су имунохистохемијским бојењем на p16, p53 и VEGF.

Испитаници са улцерозним колитисом и постојањем екстраинтестиналних манифестација, компликација и позитивне експресије p16, p53 и VEGF (појединачно) имали су више серумске вредности проинфламаторних цитокина. Значајно већи проценат испитаника са колоректалним карциномом имао је позитивну експресију p16, p53 и VEGF, у односу на испитанике са инфламацијском болешћу црева.

Испитаници са колоректалним карциномом и позитивном експресијом VEGF имали су снижене системске вредности проинфламаторног цитокина IFN- γ и повишене вредности имуносупресивног цитокина IL-10.

Релативно ниске вредности IL-10 код испитаника са тежом формом улцерозног колитиса нису довољне да компензују секрецију IL-6 и следствени развој тип 1/17 имунског одговора. Код испитаника са улцерозним колитисом p16 и p53 индукују појачану експресију VEGF и следствену продукцију проинфламаторних цитокина TNF- α и IL-6. Код испитаника са колоректалним карциномом “изгледа” да VEGF има имуносупресивну улогу. Претпостављамо да тумор супресор ген-VEGF осовина има различит ефекат на имунски одговор у инфламацији (улцерозни колитис) и расту и прогресији тумора (колоректални карцином).

Датум прихватања теме од стране ННВ:

ДП

Датум одбране:

ДО

Чланови комисије:

КО

Председник: Проф. др Небојша Арсенијевић, редовни професор за уже научне области Микробиологија и имунологија и Основи онкологије, Факултета медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу

Ментор: Доц. др Иван Јовановић, доцент за уже научне области Микробиологија и имунологија и Основи онкологије, Факултета медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу

Члан: Доц. др Гордана Радосављевић, доцент за ужу научну област Микробиологија и имунологија, Факултета медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу

Члан: Проф. др Срђан Ђурановић, ванредовни професор за ужу научну област Интерна медицина, Медицинског факултета, Универзитета у Београду

8.2. KEY WORDS DOCUMENTATION

UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC
FACULTY OF MEDICINE KRAGUJEVAC

Accession number:

ANO

Identification number:

INO

Documentation type:

DT

Monographic publication

Type of record:

TR

Textual printed material

Contents code:

CC

PhD thesis

Author:

AU

Dr Natasa D. Zdravkovic

Menthor/co-mentor:

MN

Doc. dr Ivan P. Jovanovic

Title:

TI

The expression of p16, p53, and VEGF, and cytokine profile of colorectal cancer and inflammatory bowel disease

Language of text:

LT

Serbian (Cyrillic)

Language of abstract:

Serbian/English

Country of publication: CP	Serbia
Locality of publication: LP	Serbia
Publication year: PY	2014.
Publisher: PU	Author reprint
Publication place: PP	34000 Kragujevac, Serbia Svetozara Markovica 69
Physical description: PD	Thesis contains 161 pages, 7 chapters, 4 pictures, 19 graphs, 29 tables and 386 citations
Scientific field: SF	Medicine
Scientific discipline: SD	Endocrinology
Subject/key words: SKW	colorectal cancer, inflammatory bowel disease, cytokines, p16, p53, VEGF, Th1, Th2, Th17
UDC	
Holding data:	Library of Medical faculty Kragujevac 34000 Kragujevac, Serbia Svetozara Markovica 69
Note: N	

Abstract:

AB

Progression from ulcerative colitis (UC) toward colorectal carcinoma (CRC) is multistep process that includes gene alterations of tumor suppressor genes, such as p53 and p16. The aim of this study was to investigate the expression patterns of p16, p53 and VEGF in affected tissue and serum levels of cytokines TNF- α , IFN- γ , IL-4, IL-6, IL-10 and IL-17 in patients with UC and CRC, respectively.

Serum levels of cytokine in patients with UC (n=24) and CRC (n=75) and in a healthy group (n=37) were analyzed by ELISA. Endoscopic biopsies specimens of UC and CRC were studied by immunohistochemical staining for p16, p53 and VEGF.

Patients with UC with presence of extraintestinal manifestations, complications, and positive staining of p16, p53 and VEGF respectively had higher serum levels of pro-inflammatory cytokines. Higher percentage of CRC patients had positive staining of p16, p53 and VEGF. CRC patients with positive staining of VEGF had decreased systemic values of pro-inflammatory IFN- γ and increased values of immunosuppressive IL-10.

Relatively low IL-10 in patients with severe UC is insufficient to compensate IL-6 secretion and subsequently enhanced type 1/17 immune response. In UC patients, p16 and p53 induce enhanced VEGF expression and subsequent production of pro-inflammatory TNF- α and IL-6. In CRC patients VEGF seems to have immunosuppressive role. It appears that tumor suppressor gene-VEGF axis have dual role on immune response in inflammation of UC and tumor growth and progression of CRC.

Accepted by the Scientific Board on:

ASB

Defended on:

DE

Thesis defended board

(Degree/name/surname/title/faculty)

DB

President: Prof. dr Nebojsa Arsenijevic, Professor of Microbiology and Immunology, Basic of Oncology, Faculty of Medicine, University of Kragujevac

Menthor: Doc. dr Ivan Jovanovic, Assisant professor of Microbiology and Immunology, Basic of Oncology Faculty of Medicine, University of Kragujevac

Member: Doc. dr Gordana Radosavljevic, Assisant professor of Microbiology and Immunology, Faculty of Medicine, University of Kragujevac

Member: Prof. dr Srdjan Djuranovic, Associate professor of Internal medecine, Faculty of Medicine, University of Belgrade

8.3. БИОГРАФСКИ ПОДАЦИ АУТОРА

Наташа Здравковић рођена је 14.07.1973. године у Крагујевцу, општина Крагујевац, Р. Србија, где је завршила основну и средњу школу.

Опште студије медицине завршила је 1999. године на Медицинском факултету у Крагујевцу, са просечном оценом у току студија 8,94 и стекла звање доктора медицине. Специјалистичке студије из Интерне медицине завршила је 2004. године на Медицинском факултету у Крагујевцу, са оценом 5,00 и стекла звање специјалисте Интерне медицине.

Субспецијалистичке студије из интерне медицине, област гастроентерохепатологије, завршила је 2009. године, са оценом 10,00 и стекла звање субспецијалисте гастроентерохепатолога.

Докторске академске студије, изборно подручје Експериментална и клиничка интерна медицина уписала је школске 2005/2006. године на Медицинском факултету у Крагујевцу. Усмени докторски испит положила је 2009. године, са оценом 10А.

У току 2013. године пријавила је тему докторске дисертације под називом: Експресија p16, p53 и VEGF и цитокински профил у колоректалном карциному и инфламаторним болестима црева.

Од 2000. године је у сталном радном односу у Клиничком центру Крагујевац, од 2004. године као лекар специјалиста Интерне медицине, од 2009. године као субспецијалиста гастроентерохепатолог.

Од децембра 2008. године запослена је на Факултету медицинских наука у Крагујевцу у звање сарадника за ужу научну област Интерна медицина. У току 2011. и 2013. године бирана је у звање асистента за ужу научну област Интерна медицина.

8.4. СПИСАК ОБЈАВЉЕНИХ РАДОВА

Научни радови објављени у целини у часописима међународног значаја:

1. Anđelkovic M, Jovanovic DB, Zdravkovic N. Gallbladder Emptyng in Patients with Major Depression. A Case Series. Pharmacopsychiatry 2011; 44 (5): 165-192.

M22 – 5 бодова

Научни радови објављени у целини у часописима националног значаја

1. Zdravkovic N, Nikolic D, Milošević Z, Themis E, Parodi O and Filipovic N. Computer modeling of restenosis and heating stent thermal effects in the coronary artery. Journal of the Serbian Society for Computational Mechanics 2013; 1 (7).

M52-1,5 бода

2. Zdravković N, Živic Ž, Grbović V, Stolić R. Neuroendokrini tumor rektuma-prikaz bolesnika. Medicinski časopis 2014 (у штампи).

M53 - 1 бод

3. Zdravković N, Živic Ž, Grbović V. Primarni maligni melanom jednjaka-prikaz bolesnika. Medicinski časopis 2010; 2: 20-23.

M53 - 1 бод

4. Živić Ž, Zdravković N, Stolić R. Akutno krvarenje kod gastrointestinalnog stromalnog tumora jednjaka-prikaz bolesnika. Praxis medica 2010; 38 (3-4); 147-150.

M53- 1 бод

5. Živić Z, Zdravković N, Stolić R, Zdravković J, Davidović G, Grbović V. Overlap sindrom: primarna bilijarna ciroza, autoimuni hepatitis i primarni Sjogrenov sindrom-prikaz bolesnika. Medicinski Časopis 2009; 2: 26-28.

6. Grbović Marković V, Zdravković N, Jurišić Škevin S, Milošević O. Kompleksni regionalni bolni sindrom tip 1 kod povreda donjih ekstremiteta, Med Časopis Pons 2009; 18 (5): 1-5.

7. Stolić R, Živić Ž, Zdravković N, Trajković G, Perić V, Sovtić S, Milinić S, Pajović S, Stolić D, Novaković T, Jovanović A, Odalović B, Lazarević M, Lazarević T, Labudović T, Petrović D, Šubarić-Gorgieva G. Karakteristike endoskopskih lezija bolesnika na hroničnoj hemodijalizi i kontrolne grupe ispitanika bez simptoma bubrežne bolesti. Medicinski anali 2007; 39-41.

Зборници националних научних скупова

1. Zdravković N, Živić Z, Nagorni A, Stolić R. Primarni maligni melanom jednjaka – prikaz jednog bolesnika. X Kongres udruženja internista Srbije, Beograd, Srbija 2010, Zbornik sažetaka 2010; P10.

M64 - 0,2 бода

2. Živić Ž, Zdravković N, Nagorni A, Stolić R, Milinić S. Akutno krvarenje kod gastrointestinalnog stromalnog tumora jednjaka. X kongres internista Srbije, Beograd, Srbija 2010, Zbornik sažetaka 2010; P11.

M64- 0,2 бода

3. Živić Z, Zdravković N, Petrović Nj, Stolić R, Dejanović D. Efikasnost primene sistemskih antihemoroidalnih sredstava u kombinaciji sa lokalnim u bolesnika sa krvarećim hemoroidima. VIII Kongres Interne medicine Srbije i Crne Gore Igalo, 20- 24 јун 2006, Zbornik sažetaka 2006; 53.

M64 - 0,2 бода

Biography

Natasha Zdravkovic was born on 14 July 1973. in Kragujevac, Republic of Serbia, where she attended and completed primary and secondary school. She finished Faculty of Medicine in Kragujevac, in January 1999. with the final score of 8,94 and gained a medical degree.

Postgraduate studies of Internal medicine ended 5 July 2004. at Faculty of Medicine in Kragujevac, with the final score of 5,00 and gained a degree of specialist of Internal medicine.

Subspeciality studies of gastroenterohepatology ended in 13 July 2009. at Faculty of Medicine in Belgrade, with the final score of 10,00 and earned a degree of subspecialist in gastroenterohepatology.

In 19 of June 2013. she applied the dissertation: The expression of p16, p53 and, VEGF and cytokine profile in colorectal cancer and inflammatory bowel disease.

She has been employed at the Clinical Center Kragujevac, since 2004. as a specialist of Internal Medicine, and since 2009. as a subspecialist of gastroenterohepatology.

She has also been employed at the Faculty of Medical Sciences in Kragujevac since December 2008. in the position of associate in the field of Internal medicine. In 2011. and in 2013. she has been named as assistant professor of Internal medicine.

8.5. THE LIST OF PUBLISHED PAPERS

The published paper in extenso in international journals

1. Anđelkovic M, Jovanovic DB, Zdravkovic N. Gallbladder Emptyng in Patients with Major Depression: A Case Series. *Pharmacopsychiatry* 2011; 44 (5): 165-192.

M22 – 5 points

The published paper in extenso in national journals

1. Zdravkovic N, Nikolic D, Milošević Z, Themis E, Parodi O and Filipovic N. Computer modeling of restenosis and heating stent thermal effects in the coronary artery. *Journal of the Serbian Society for Computational Mechanics* 2013; 1 (7).

M52-1,5 point

2. Zdravkovic N, Zivic Z, Grbovic V, Stolic R. Neuroendocrine rectal tumor. case report. *Medical Journal* 2013. (in press)

M53-1 point

3. Zdravkovic N, Zivic Z, Grbovic V. The Primary malignant melanoma of the oesopgagus-case report. *Medical Journal* 2010; 2: 20-23.

M53-1 point

4. Zivic Z, Zdravkovic N, Stolic R, Zdravkovic J, Davidovic G, Grbovic V. Overlap Syndome: primary billiary cirrhosis, autoimmune hepatitis and primary Sjogren’s syndrome-case report. *Medical Journal* 2009; 2: 26-28.

M53-1 point

5. Zivic Z, Zdravkovic N, Stolic R. Acute bleeding in the gastrointestinal stromal tumor of the esophagus- case report. *Praxis medica* 2010; 38 (3-4): 147-150.

M53-1 point

6. Grbovic Markovic V, Zdravkovic N, Jurisic Skevin S, Milosevic O. The complex regional pain syndrome type 1 with injuries of the lower extremity. Med. Journal Pons 2009; 18 (5): 1-5.

7. Stolic R, Zivić Z, Zdravkovic N, Trajkovic G, Peric V, Sovtic S, Milinic S, Pajovic S, Stolic D, Novakovic T, Jovanovic A, Odalovic B, Lazarevic M, Lazarevic T, Labudovic T, Petrovic D, Subaric-Gorgieva G. The Characteristics of endoscopic lesion in patients on chronic hemodialysis and control groups of patients without symptoms of kidney disease. Annals of Medicine 2007; 39-41.

The national congress presentations published as abstracts

1. Zdravkovic N, Zivic Z, Nagorni A, Stolic R. The Primary malignant melanoma of esophagus- case report. X Congress of the Serbian Association of internists, Belgrade, Serbia 2010, Proceedings of 2010; P10.

M64 - 0,2 point

2. Zivic Z, Zdravkovic N, Nagorni A, Stolic R, Milinic S. Acute bleeding in the gastrointestinal stromal tumor of the esophagus- case report. X Congress of the Serbian Association of internists, Belgrade, Serbia 2010, Proceedings of 2010; P11.

M64- 0,2 point

3. Zivic Z, Zdravkovic N, Petrovic Nj, Stolic R, Dejanovic D. The efficacy of systemic antihemoroidal agents in combination with local agents, in patients with bleeding hemorrhoids. VII Congres of Internal Medicine of Serbia and Montenegro, Igalo 2006, Proceedings of 2006; 53.

M64 - 0,2 point

8.6. ИДЕНТИФИКАЦИОНА СТРАНИЦА ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ

I. Аутор

Име и презиме: Наташа Д. Здравковић

Датум и место рођења: 14.07.1973. године, Крагујевац, Република Србија

Садашње запослење: Специјалиста интерне медицине, субспецијалиста гастроентерохепатолог, Центар за гастроентерохепатологију, Интерна клиника, Клинички центар Крагујевац
Асистент за ужу научну области Интерна медицина, Факултет Медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу

II. Докторска дисертација

Наслов: Експресија p16, p53 и VEGF и цитокински профил у колоректалном карциному и инфламаторним болестима црева

Број страница: 161

Број слика: 22

Број библиографских података: 386

Установа и место где је рад израђен: Факултет Медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу, Центар за гастроентерохепатологију, Клинички центар Крагујевац

Научна област (УДК): ендокринологија

Ментор: Доц. др Иван П. Јовановић

III. Оцена и одбрана

Датум пријаве теме: 13.06.2013.године

Број одлуке и датум прихватања докторске дисертације:01-8571/3-6 од 25.09.2013 године

Комисија за оцену подобности теме и кандидата:

1. Доц. др Иван Јовановић, доцент за уже научне области Микробиологија и имунологија и Основи онкологије, Факултета медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу, председник
2. Доц. др Гордана Радосављевић, доцент за ужу научну област Микробиологија и имунологија, Факултета медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу, члан
3. Проф. др Срђан Ђурановић, ванредовни професор за ужу научну област Интерна медицина, Медицинског факултета, Универзитета у Београду, члан

Комисија за оцену докторске дисертације:

1. Проф. др Небојша Арсенијевић, редовни професор за уже научне области Микробиологија и имунологија и Основи онкологије, Факултета медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу, председник
2. Доц. др Гордана Радосављевић, доцент за ужу научну област Микробиологија и имунологија, Факултета Медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу, члан
3. Проф. др Срђан Ђурановић, ванредовни професор за ужу научну област Интерна медицина, Медицинског факултета, Универзитета у Београду, члан

Комисија за одбрану докторске дисертације:

1. Проф. др Небојша Арсенијевић, редовни професор за уже научне области Микробиологија и имунологија и Основи онкологије Факултета медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу, председник
2. Доц. др Гордана Радосављевић, доцент за ужу научну област Микробиологија и имунологија, Факултета Медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу, члан
3. Проф. др Срђан Ђурановић, ванредовни професор за ужу научну област Интерна медицина, Медицинског факултета, Универзитета у Београду, члан

Датум одбране дисертације: 2014. година

ОБРАЗАЦ 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а _____
број уписа _____

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

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

Потпис аутора

У Крагујевцу, _____

ОБРАЗАЦ 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора _____
Број уписа _____
Студијски програм _____
Наслов рада _____
Ментор _____

Потписани _____

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

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

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

Потпис аутора

У Крагујевцу, _____

ОБРАЗАЦ 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Крагујевцу унесе моју докторску дисертацију под насловом:

која је моје ауторско дело.

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

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

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

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, чији је кратак опис дат је на обрасцу број 4.).

Потпис аутора

У Крагујевцу, _____
