



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА

Милан Јовановић

**Колоректални карцином: Значај концентрација цитокина
у серуму и фецесу за процену тежине болести**

ДОКТОРСКА ДИСЕРТАЦИЈА

Ментор др сци. мед. Дарко Мирковић, редовни професор

КРАГУЈЕВАЦ, 2018. године

ИДЕНТИФИКАЦИОНА СТРАНИЦА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

<i>I Аутор</i>
Име и презиме: Милан Јовановић
Датум и место рођења: 08.11.1976. године, Крагујевац, Србија
Садашње запослење: Специјалиста опште хирургије, Војномедицинска академија, Асистент на катедри за хируршке науке I, Медицински факултет Министарства одбране у Београду
<i>II Докторска дисертација</i>
Наслов: „Колоректални карцином: Значај концентрација цитокина у серуму и фецесу за процену тежине болести“
Број страница: 128
Број слика: 16
Број библиографских података: 178
Установа и место где је рад израђен: Клинички центар Крагујевац, Факултет медицинских наука Универзитета у Крагујевцу.
Научна област (УДК): Медицина
Ментор: проф. др Дарко Мирковић
<i>III Оцена и одбрана</i>
Датум пријаве теме: 06.06.2016.
Број одлуке и датум прихватања теме докторске дисертације: IV-03-1071/15 од 15.11.2016. године
Комисија за оцену научне заснованости теме и испуњености услова кандидата: 1. проф. др Драган Чановић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Хирургија, председник 2. проф. др Небојша Арсенијевић, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за уже научне области Микробиологија и имунологија и Онкологија, члан 3. доц. др Братислав Трифуновић, доцент Медицинског факултета Министарства одбране за ужу научну област Хирургија, члан
Комисија за одбрану докторске дисертације: 1. проф. др Драгче Радовановић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Хирургија, председник 2. проф. др Небојша Арсенијевић, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за уже научне области Микробиологија и имунологија и Онкологија, члан 3. проф. др Братислав Трифуновић, ванредни професор Медицинског факултета Министарства одбране за ужу научну област Хирургија, члан
Датум одбране дисертације:

Абстракт:

АБ

Колоректални карцином (engl. Colorectal carcinoma- CRC) је један од најчесталијих карцинома на свету. CRC се често дијагностикује у узнапредовалим стадијумима са лошом прогнозом, указујући на потребу за новим дијагностичким и прогностичким маркерима.

Циљ студије био је да се испита повезаност вредности цитокина у серуму и фецесу са стадијумом болести и клиничко-патолошким карактеристикама, код пацијената са колоректалним карциномом.

Детектована је значајно већа фецесна концентрација Gal-3 код пацијената са CRC-ом са већом нуклеарним градусом, слабом диференцијацијом туморског ткива, већим TNM стадијумом и метастатском болешћу, док је преминација Gal-3 над проинфламацијским цитокинима забележена код пацијената са узнапредовалим TNM стадијумом и метастатском болести. Фецесни Gal-3 позитивно корелира с тежином болести (већи TNM стадијум, већи нуклеарни градус и слаба диференцијација туморског ткива) и прогресијом (присуство метастаза у плућима/јетри или перитонеалне карциноматозе) и системских биомаркера AFP и СЕА. Ови налази указују на Gal 3 као потенцијални маркер тежине и прогресије CRC-а.

Такође је показана повећана концентрација Gal-1 у фецесу пацијената са CRC-ом и већим нуклеарним градусом и слабом диференцијацијом туморског ткива, док је преминација Gal-1 у односу на проинфламацијске цитокине детектована код пацијената са узнапредоваим TNM стадијумом и метастатском болешћу.

Преминација Gal-1 и Gal-3 у односу на проинфламацијске цитокине, код испитаника са напредном и прогресивном болешћу, може указати на имуномодулаторну улогу галектина у ограничавању континуираних проинфламацијских процеса и спречавању снажног антитуморског имунског одговора. Фекалне вредности Gal-1 и Gal-3 могу се користити као значајан маркер за тежину и прогресију CRC-а. Ови налази указују да Gal-1 и Gal-3 могу допринети имунолошкој привилегији тумора модулацијом локалног имунског одговора и указују на њихову потенцијалну употребу као терапеутских мета.

Abstract:

AB

Colorectal cancer (CRC) represents one of the most common cancers worldwide. CRC is frequently diagnosed at advanced stages with poor prognosis, indicating on need for new diagnostic and prognostic markers.

The aim of the study was to investigate the correlation between the level of cytokines in serum and faeces with the stage of the disease and the clinical and pathological characteristics in patients with colorectal carcinoma.

Significantly higher fecal Gal-3 was observed in patients with CRC with higher nuclear grade, poor tumor differentiation, higher TNM stage and metastatic disease, while Gal-3 predominance over proinflammatory cytokines was observed in patients with advanced TNM and metastatic diseases. Fecal Gal-3 positively correlates with the severity of the disease (higher TNM stage, higher nuclear grade and poor tumor tissue differentiation) and progression (presence of lung/liver metastasis or peritoneal carcinomatosis) and systemic biomarkers AFP and CEA. These findings indicate Gal 3 as a potential marker of the severity and progression of CRC.

An increased Gal-1 concentration in feces of patients with CRC and a higher nuclear grade and a poorly differentiated tumor tissue was observed, while Gal-1 prevalence over proinflammatory cytokines was detected in patients with advanced TNM and metastatic disease.

The prevalence of Gal-1 and Gal-3 over proinflammatory cytokines, in subjects with advanced and progressive disease, may indicate the immunomodulatory role of galectins in limiting ongoing proinflammatory processes and thus preventing a strong antitumor immune response. The fecal values of Gal-1 and Gal-3 can be used as a significant marker for severity and progression of the CRC. These findings indicate that Gal-1 and Gal-3 can contribute to the immune privileges of the tumor by modulating the local immune response and point to their potential use as therapeutic targets.

Ову дисертацију посвећујем мом прерано преминулом пријатељу Милутину Рашковићу.

Захваљујем се родитељима и породици на непрекидној подршци, а посебно сину Немањи и ћерки Анастасији који су ноћима радили са мном на финализацији тезе.

Захваљујем се мом ментору проф. др Дарку Мирковићу који је својим саветима и подршком учинио да овај рад има смисла.

Захваљујем се ректору, дивном човеку и професору Небојши Арсенијевићу који је својим огромним знањем и залагањем помогао да свака фаза писања доктората буде реализована на најбољи начин.

Захваљујем се прим. др Мирољубу Драшковићу, пријатељу и учитељу, који је увек био ту да ме подржи без резерве.

Захваљујем се мом ментору на специјализацији и учитељу проф. др Сидору Мишовићу, који је увек имао лепу реч за мене.

Захвалан сам проф. др Братиславу Трифуновићу који је увек нашао времена да се консултујемо у вези недоумица на које сам наилазио пишући тезу.

Захвалан сам проф. др Небојши Станковићу, мом првом начелнику, на свему што је учинио и чини свих ових година за мене.

Захваљујем се проф. др Горану Кроњи који ме је својим саветима и искуством увек правилно усмеравао.

Захваљујем се мом великом пријатељу Дробњак Срђану који је био увек уз мене када је било тешко, несебично ми дарујући своју подршку.

Посебну захвалност дугујем зету Зорану Ковачевићу и сестри Мирјани који су ме све време искрено бодрили да се потрудим и више него што сам мислио да могу.

Захваљујем се посебно проф. др Данилу Војводићу, проф. др Ивану Јовановићу и особљу Центра за молекуларну медицину и истраживање матичних ћелија који су својим врхунским знањем и саветима учинили да се рад уобличи.

Захваљујем се Стевановић др Јовани, која је значајно помогла у праћењу најновије литературе.

Захвалан сам и Љубинки Рашковић и њеној породици на безрезервном пријатељству свих ових година.

1. УВОД.....	1
1.1. Епидемиологија колоректалног карцинома.....	1
1.2. Етиопатогенза колоректалног карцинома.....	1
1.2.1. Биологија колоректалног тумора.....	3
1.2.2. Иmunски одговор код колоректалног карцинома.....	4
1.2.3. Улога галектина-1 и галектина-3 у биологији колоректалног карцинома.....	6
1.2.4. Улога TNF- α , IFN- γ , IL-1, IL-10, TGF- β у биологији колоректалног карцинома.....	7
1.2.5. Улога CRP, AFP, CEA, CA19-9 у биологији колоректалног карцинома.....	11
1.3. Класификација колоректалног карцинома.....	12
1.3.1. Муцинозни аденокарцином.....	12
1.3.2. Аденокарцином ћелија прстена печатњака (Signet ring cell carcinoma, SRCC).....	14
1.3.3. Медуларни аденокарцином.....	14
1.4. Патохистолошка класификација и процена исхода.....	15
1.5. Симптоми и знаци болести.....	17
1.6. Дијагностика.....	17
1.7. Лечење.....	18
1.8. Screening.....	18
2. ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА.....	20
3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ.....	21
3.1. Испитивани узорак.....	21
3.2. Истраживачки поступак.....	22
4. РЕЗУЛТАТИ.....	29
5. ДИСКУСИЈА.....	79
6. ЗАКЉУЧЦИ.....	88
7. СКРАЋЕНИЦЕ.....	90
8. РЕФЕРЕНЦЕ.....	92
9. ПРИЛОГ.....	107

1. УВОД

1.1. Епидемиологија колоректалног карцинома

Колоректални карцином (енгл. Colorectal Carcinoma, CRC) је други најчешћи карцином код жена и трећи најчешћи код мушкараца. Стопа инциденције је већа у развијеним земљама него у неразвијеним. Међутим, морталитет је већи у неразвијеним (52% од укупних смртних случајева), што говори о лошијем преживљавању (1). CRC је трећи најчешћи карцином у свету, и један је од водећих узрока смрти које су повезане са карциномом (1). Према статистичким подацима НИИ-а (енгл. National Institutes of Health, NIH), средња вредност година у тренутку дијагностиковања CRC-а је 68 година (2). Сматра се да особе рођене око 1990. године имају двоструко већи ризик за добијање CRC-а у односу на особе рођене око 1950. године (3). Упркос задовољавајућем петогодишњем преживљавању код раних стадијума, што је верификовано од стране UICC (енгл. Union for International Cancer Control, UICC), прогноза у поодмаклој фази је веома лоша, поготово за IV стадијум (петогодишње укупно преживљавање <5%) (4). Због тога је неопходно пронаћи ефикасне индикаторе за рано откривање рака и правилну процену статуса болести.

1.2. Етиопатогенза колоректалног карцинома

CRC је мултикаузална болест у чијем настанку највећу улогу имају генетски фактори, а поред тога и утицаји спољашње средине, укључујући исхрану и инфламацијске болести дигестивног тракта. Носиоци мутације APC (енгл. Adenomatous Polyposis Coli, APC) гена која узрокује фамилијарну аденоматозну полипозу (енгл. Familial adenomatous polyposis, FAP), имају 100% ризик од настанка CRC-а након 40. године. У основи HNPCC или Lynch syndrome (енгл. Hereditary nonpolyposis colon cancer syndrome, HNPCC) налази се мутација у неком од гена за поправку погрешно спарених база (hMLH1, hMSH2, hMSH6, hPMS1, hPMS2 и др.) и особе са овим синдромом поседују око 40% ризика за настанак CRC-а, као и карцинома уротелијума и ендометријума. Осим генетских чиниоца, животне навике и исхрана битно утичу на појаву CRC-а према бројним студијама (4). Доказано је да повећан унос црвеног меса, животињских масти и смањен унос влакана, воћа и поврћа, битно повећава ризик од

настанка CRC-а. Према вишегодишњем праћењу пацијената, Tabung и сарадници дошли су до сазнања да повећан унос црвеног и обрађеног меса, гојазни мушкарци, мршаве жене и конзумирање алкохола и код мушкараца и код жена, представљају предиспонирајуће факторе у настанку CRC-а (5,6). Ретроспективне епидемиолошке студије показале су статистички значајну корелацију између смањеног ризика за настанак CRC-а и уноса фолата, калцијума и супституционе терапије естрогена (4). Према другим проспективним кохортним студијама, повећан ризик за настанак CRC-а је у корелацији са гојазношћу, конзумирањем цигарета и алкохола, као и седетарним начином живота. Конзумирање цигарета је повезано са повећаним ризиком од CRC-а, и то више од карцинома ректума, него колона, посебно код мушкараца. Бивши пушачи су такође под повећаним ризиком (7). Према подацима из друге проспективне студије, доказана је повезаност између настанка CRC-а и повећаног уноса алкохола (само преко 30 грама дневно) код појединаца који имају и позитивну породичну анамнезу за ову болест (8). Дијабетес мелитус је доказан као независан фактор ризика за настанак карцинома колона и карцинома ректума (9). Jacobs и сарадници доказали су да повећан BMI (енгл. Body Mass Index, BMI) има утицаја на рани стадијум карциногенезе CRC-а, посебно код мушкараца (10). Morikawa и сарадници су поставили хипотезу о повезаности гојазности и смањене физичке активности са подтипом CRC-а у односу на CTNNB1 статус. Откривено је да активација WNT сигналног пута има битну улогу у настанку CRC-а (резултује губитком APC гена), а CTNNB1 ген, који кодира β -catenin, један је од главних медијатора овог пута. Истовремено, WNT-CTNNB1 комплекс укључен је у метаболизам глукозе и метаболичке болести као што су гојазност и дијабетес мелитус тип II. Међутим, ови истраживачи нису доказали повезаност између BMI, нивоа физичке активности и CTNNB1 позитивних тумора коло-ректума (11). Инфламаторне болести црева (улцерозни колитис и Кронова болест) су у позитивној корелацији са повећаним ризиком за настанак CRC-а, посебно са дужим трајањем болести и већом захваћеношћу колона (4).

1.2.1. Биологија колоректалног тумора

У основи CRC-а идентификован је велики број генетских аберација (12,13,14). Недавно, неколико фактора привукло је већу пажњу улогом у одвајању туморских ћелија чиме значајно доприносе напредовању карцинома. На основу геномске нестабилности могу се разликовати два пута настанка CRC-а, супресорски (традиционални) и мутаторски пут (15). Поред ова два предложено је и трећи, молекуларни пут канцерогенезе карцинома колона, метилаторски пут (16). Класификација CRC-а, са молекуларне тачке гледишта, базира се на ћелијским догађајима који карактеришу ова три пута карциногенезе: хромозомска нестабилност, микросателитска нестабилност и метилаторски фенотип CpG острваца (енгл. CpG island methylator phenotype, CIMP) (17). Супресорски пут или традиционални пут колоректалне карциногенезе предложили су још 90-тих година прошлог века Fearon и Vogelstein (18). Овај модел настанка тумора од аденома до микросателитски стабилних карцинома може се уочити код 60-85% спорадичних CRC-а (19). Молекуларни профил ових тумора карактерише се хромозомском нестабилношћу која укључује губитак и амплификацију хромозома, анеуплоидију, транслокације, губитак хетерозиготности и то најчешће за: 5q(АРСген), 8p,17p(ТР53ген) и 18q (гени DCC, SMAD2 и SMAD4) (19). Тригером овог пута сматра се губитак или мутација у туморсупресорском APC гену, али карактеристичне су и мутације прото-онкогена K-RAS. Губитак гена DCC, SMAD2 и SMAD4 индукује даљу прогресију тумора и то онемогућавањем апоптозе туморских ћелија. Мутације TP53 гена дешавају се касније током преласка бенигне лезије у инвазивну болест (19). Карциноми који настају мутаторским путем колоректалне карциногенезе имају оштећен механизам за поправку погрешно спарених база у DNA, чиме је омогућено накупљање мутација (15). Овај механизам за поправку погрешно спарених база је под контролом неколико гена при чему су најчешћи MLH1, MLH2, MLH6, PMS2. Немогућност поправке може се лако уочити јер резултује у варијабилности дужина кратких, поновљених нуклеотидних секвенци у DNA (микросателита) од ћелије до ћелије, тј. у микросателитској нестабилности (15). Метилаторски пут колоректалне карциногенезе подразумева пажљиву карактеризацију епигенетских фактора, нарочито метилацију промоторских секвенци гена, што доводи до дефиниције CIMP (енгл. CpG island methylator phenotype, CIMP) карцинома (19). Око 40% генских промотора сисара садржи CpG острваца која су

неметилована код експримираних гена (17). Сматра се да механизам метилације промоторских региона има улогу у настанку око 35% CRC-а (20). 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“(20).

1.2.2. Иmunски одговор код колоректалног карцинома

Th лимфоцити усмеравају функцију других имунских ћелија секрецијом цитокина. Th CD4⁺ 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 (енгл. Natural killer cell, NK) и дендритске ћелије (енгл. Dendritic cells, DCs), такође могу секретовати цитокине (21). Прецизније је имунски одговор означити као тип-1, тип-2 или тип-17. Критеријум за разликовање специфичног цитокинског профила обухвата следеће цитокине: IFN- γ , TNF- α , IL-2, IL-12 и IL-18 за тип-1; IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 и IL-13 за тип-2; IL-6 и IL-17 за тип-17; док су 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 туморске ћелије и стимулишу касни тип преосетљивости. Тип-2 имунски одговор је праћен секрецијом IL-4, IL-5, IL-9 и IL-13 (22). Тип-2 цитокини активирају B лимфоците и учествују у хуморалном имунском одговору, укључујући продукцију антитела против екстрацелуларних патогена (23). Обележје тип-17 имунског одговора је IL-17, потентни медијатор инфламаторног одговора у аутоимунским болестима (24,25). Последњих година IL-17 је класификован као медијатор урођеног и стеченог имунитета (26). IL-17 игра важну улогу у одбрани од инфекција као и у запаљенским и аутоимуним болестима, укључујући хроничну грануломатозну болест црева (27), мултиплу склерозу (28) и реуматоидни артритис (29). Показано је да IL-17 игра кључну улогу у акутној инфламацији, у којој доминирају неутрофили (30). На тип-17 имунски одговор, као негативни регулатор, утиче IL-27, цитокин који продукују углавном дендритске ћелије, моноцити и макрофаги (31). Улога IL-1 у CRC-у је контроверзна. IL1 β транскрипти су повећани у биоптату туморског ткива код пацијената са метастатским CRC-ом (32) и полиморфизам антагониста IL-1 рецептора

(IL1RN) може бити повезан са CRC-ом (33). Као одговор на стрес ћелије или инфекцију, долази до активације IL-1 β каспазом посредованим цепањем након активације инфлазома богатог леуцином (енгл. NOD-like receptors, NLRs). IL-4 је прекомерно експримиран у раним догађајима настанка CRC-а, обухватајући хиперпластичне полипе, аденоме и рецкасте аденоме, док код аденокарцинома ниво IL-4 није повишен у поређењу са нормалним слузокожом (34). Осим тога, повишен ниво IL-4 у серуму пронађен је код пацијената са удаљеним метастазама (M1) за разлику од пацијената без метастаза (M0) (35). IL-6 је прототип инфламацијских цитокина који је очигледно повезан са развојем спорадичних CRC-а и карцинома удружених са колитисом (енг. colitis associated cancer; CAC) (36). IL-6 је прекомерно експримиран у ткиву CRC-а (37,38). и повишен ниво овог цитокина у серуму корелира са већим димензијама тумора, појавом метастаза у јетри и смањеним преживљавањем (39). Штавише, повећана концентрација IL-6 у крви је независтан неповољан прогностички показатељ преживљавања код пацијената са CRC-ом (40). Пацијенти оболели од инфламаторне болести црева (енг. Inflammatory bowel disease, IBD) који имају повећан ризик за развој CAC показују повишене вредности IL-6 у серуму и подслузокожи (lamina propria) (41,42). Код пацијената са CRC-ом, експресија IL-8 је усходно регулисана у туморском ткиву за разлику од суседног здравог ткива дебелог црева (43). Штавише, полиморфизми матичних ћелија IL-8 и VEGF (енг. vascular endothelial growth factor), два гена који су укључени у ангиогенезу тумора, повезани су са повећаним ризиком од рецидива у III стадијуму болести код пацијената са CRC-ом који су третирани адјувантном хемиотерапијом (44). IL-9 изгледа да игра двоструку улогу у развоју тумора. Иако IL-9 вероватно потпомаже настанак лимфома (45), такође инхибира раст меланома директно или посредством антитуморског имуног одговора (46,47). У поређењу са здравим особама, пацијенти са CRC-ом имају снижен ниво IL-9 у серуму и интестиналном ткиву, и експресија IL-9 у овим случајевима негативно корелира са прогресијом тумора (48). Насупрот томе, једна студија није показала битне промене експресије IL-9 у серуму пацијената са CRC-ом, са могућом тенденцијом ка повишеним нивоима IL-9 код тумора високог степена (35).

1.2.3. Улога галектина-1 и галектина-3 у биологији колоректалног карцинома

Галектин-1 (Gal-1)

Велики број доказа показује да галектини учествују у бројним нормалним ћелијским функцијама и да су измењени код пацијената са CRC-ом (49-52). Међу свим познатим галектинима, галектин-1 је добро описан. Gal-1 је вишефункционални β -галактозид који везује лектин синтетисан од стране различитих васкуларних, интерстицијалних, епителних, имунских ћелија, као и неопластичних ћелија (53,54). Може се налазити унутар ћелија у једру и цитоплазми или у ванћелијском простору (53,54). Показано је да је Gal-1 укључен у неколико биолошких процеса и у различитим фазама туморогенезе попут регулације ћелијског раста и миграција, интеракција ћелија-екстрацелуларни матрикс и ћелија-ћелија интеракција, ангиогенезе, избегавања имунског система од стране туморских ћелија (55,56). Примећена је повећана експресија Gal-1 у ткивима различитих солидних малигних тумора, док у нормалном ткиву није пронађена никаква експресија или врло слаба (49-52). Имуномодулаторна улога Gal-1 је такође позната, а и његов јак утицај на инфламацију је добро установљен (57). Улога Gal-1 у настанку, прогресији и смањењу инфламације је добро позната (57). Претходне студије показале су да Gal-1 инхибира раст ћелија и индукује апоптозу активираних имунских ћелија (58,59). Показано је да Gal-1 „скреће“ баланс према типу 2 имуног одговора, истовремено инхибирајући продукцију IFN- γ , TNF- α , IL-2 и IL-12 и олакшавајући секрецију IL-5, у *in vitro* и *in vivo* условима (60-62). Неке студије сугеришу да Gal-1 може инхибирати Т-ћелијску ефекторску функцију или индуковати смрт туморских ћелија инфилтришући их леукоцитима, и накнадно сузбити јак имуни одговор изазван проинфламаторним цитокинима (61,63-65). Camby I и сарадници (65) закључили су да туморске ћелије могу умањити Т-ћелијску ефекторску функцију помоћу секреције Gal-1 што фаворизује настанак имunosупресивног окружења на месту тумора.

Галектин-3 (Gal-3)

Галектин-3 је вишефункционални β -галактозид везујући лектин високо експримиран у различитим инфламацијским и епителним ћелијама (66). Вишеструке функције Gal-3 зависе од његовог положаја унутар ћелије или на ћелијској површини (67). Добро је познато да Gal-3 учествује у неколико биолошких процеса, као што су ћелијско везивање, ћелијска диференцијација и пролиферација, ембриогенеза, инфламација, инвазија туморских ћелија и метастазе (68,69). Претходне студије су откриле важност Gal-3 као прогностичког маркера за CRC. Показано је да болесници са детектабилном експресијом Gal-3 у тумору имају више лимфних и удаљених метастаза, често венску инвазију и инвазију дубљих зидова у односу на Gal-3 недетектабилне случајеве (70). Штавише, недавна студија показала је да серумски Gal-3 и карциноембриогени антиген (енгл. Carcinoembryonic antigen, CEA) поспешују миграцију и метастазе туморских ћелија CRC-а (71). Gal-3 игра важне улоге у различитим биолошким и патолошким процесима, као што су раст ћелија и диференцијација, интеракција ћелија-екстрацелуларни матрикс метастазе, регулација апоптозе (72,73). Раније студије су испитивале могућу повезаност између Gal-3 и CRC-а. Имунохистохемијским бојењем потврђено је да је CRC са детектабилним Gal-3 значајно већих димензија, са дубљом инвазијом зида колона и са лошијом хистолошком диференцијацијом (70,73). Други су показали да је Gal-3 усходна регулација у корелацији са прогресијом тумора и предвиђа краће преживљавање пацијената са CRC-ом (73).

1.2.4. Улога TNF- α , IFN- γ , IL-1, IL-10, TGF- β у биологији колоректалног карцинома

TNF- α

TNF- α је проинфламацијски цитокин кога продукују првенствено макрофаги, а исто тако и туморске ћелије (74). Има улогу медијатора у акутној фази имунског одговора, раној фази инфламацијског одговора и регулише продукцију осталих цитокина, хемокина и ендотелних адхезионих молекула. Као што се сматра цитокином који повећава антитуморски одговор имунског система, у новије време постоји све више студија које указују на двојаку улогу TNF- α што се објашњава измењеном експресијом

TNF- α на туморским ћелијама, тако да тим путем активирају апоптозу имунских ћелија и избегавају антитуморски одговор организма. Он активира онкогене сигналне путеве у епителним ћелијама, укључујући WNT и NF- κ B (енгл. Nuclear factor κ B, NF- κ B), и тиме регулише њихов раст и опстанак. Способност TNF- α да изазове оштећења DNA (енгл. Deoxyribonucleic acid, DNA) у *in vitro* и *in vivo* условима, повезана је са стварањем ROS (енгл. reactive oxygen species, ROS), а антиоксиданси битно смањују оштећење DNA узроковано дејством TNF- α . Третирање ћелија са TNF- α доводи до повећања хромозомске нестабилности, мутације и амплификације гена, што указује на директан механизам којим TNF- α потпомаже настанак карцинома (75). Осим тога, према одређеним студијама сматра се да не само да делује протоонкогено, већ има битну улогу у самом процесу развоја тумора и метастатском ширењу тумора (76,77). Доказано је да је повезан и са рецидивом CRC-а и присутним метастазама у лимфним чворовима (78).

IFN- γ

IFN- γ је проинфламацијски цитокин који осим антимикуробне и антивирусне улоге, игра важну улогу у процесу апоптозе, ћелијском циклусу и медијатор је других цитокина. За испољавање дејства неопходни су рецептори преко којих делује (IFNGR1, IFNGR2) (79). IFN сигнални пут има значајну улогу у карциногенези. Одређене студије су испитивале директан утицај генетски измењеног IFN- γ на настанак CRC-а, међутим та хипотеза није доказан (80,81). С друге стране, вршена су испитивања утицаја генетски измењених компоненти IFN сигналног пута и доказано је да је IRF2 (енгл. Interferon regulatory factor, IRF2) повезан са настанком карцинома колона и ректума. Такође је доказана корелација између осталих компоненти овог сигналног пута и настанка карцинома колона (IFN- γ , IRF3) и карцинома ректума (IFNGR1, IFNGR2, IRF4, IRF6, IRF8). Ипак, мора се нагласити да и друге претходно наведене животне навике имају битан утицај на настанак CRC-а у комбинацији са генетским варијацијама ових компоненти IFN сигналног пута, као и инфламација као кључни елемент у карциногенези колона и ректума (79).

IL-1 β

Проинфламацијски цитокин кога продукују углавном активирани макрофаги. IL-1 β индукује експресију TNF- α , IL-6, IL8, IL-17, COX-2 and PGE2 који су важни проинфламацијски медијатори и промотори раста туморских ћелија (76). Доказано је да апликовање IL-1 β или LPS-a, који је снажни активатор IL-1 β , повећава метастазе код третираних мишева, док терапија антагонистима IL-1R смањује метастазе и повећава стопу преживљавања. IL-1 β је регулисан на транскрипцијом, транслацијом и посттранслацијом нивоу, а TNF- α или LPS су одговорни за претварање инактивног прекурсора IL-1 β у секретован биолошки активан протеин уз учешће каспазе-1 (82). NOD2 директно активира каспазу-1 и тако покреће матурацију и секрецију IL-1 β (83). Дефицијентне STAT1 (енгл. Signal transducer and activator of transcription, STAT1) ћелије имају неправилну експресију каспазе-1 и сходно томе LPS индукована секреција IL-1 β и тумором индуковано ослобађање IL-1 β су значајно снижени од стране STAT1 дефицијентних макрофага (84,85,86). Доказано је да туморске ћелије CRC-a нису успеле да индукују отпуштање IL-1 β од стране STAT1 дефицијентних макрофага, сходно томе ни ови макрофази нису успели да активирају WNT сигнални пут у ћелијама CRC-a и на тај начин су онемогућили даљи раст туморских ћелија. Осим тога, доказана је значајна хемопревентивна активност витамина D3 у настанку CRC-a јер витамин D3 инхибира тирозин-фосфорилацију STAT1 у макрофазима и тако инхибира ослобађање IL-1 β и активацију WNT сигналног пута, а тако и раст туморских ћелија (86).

IL-10

IL-10 спада у групу регулаторних цитокина кога луче Th2 лимфоцити, В лимфоцити, туморске ћелије и макрофаги. Он је снажан инхибитор проинфламаторних цитокина (IL-1 β , TNF- α и IL-6) за кога је доказано да има како протуморогену, тако и антитуморогену активност. Доказано је да мишеви који имају дефицијенцију IL-10 развијају спонтани колитис, а осим тога и CRC услед третирања са АОМ (енгл. Azoxy methane, АОМ) уз активацију TLR/MyD88 сигналног пута који је важан за процес карциногенезе CRC-a (87). Према бројним студијама сматра се да овај IL има двојаку улогу у развоју туморских ћелија у зависности од цитокинског миљеа у коме

делује. Многе студије су доказале значајну корелацију између повишених вредности концентрације IL-10 у серуму пацијената са CRC-ом и напредних стадијума болести, веће инвазије тумора и лошијом прогнозом, а смањење концентрације овог цитокина у серуму пацијената постоперативно такође указује на ову повезаност. Протуморогену активност остварује супресијом имуног одговора при чему је туморским ћелијама омогућено да избегну имуни одговор организма (88). Супротно овим тврдњама, у студијама у којима је ниво концентрације IL-10 био нижи код пацијената са CRC-ом у односу на контролну групу, али виши код пацијената са лошијом прогнозом, доказано је да овај цитокин има и антитуморогену активност што се може објаснити на више начина. Један од начина постизања антитуморогене активности јесте да на почетку развоја тумора има могућност активирања NK ћелија и примарног имуног одговора који има улогу да заустави раст тумора. Такође се може објаснити улогом овог цитокина у COX-2 mRNA експресији тако што повишене вредности IL корелирају са смањеном експресијом COX-2. Протуморогена активност COX-2 огледа се у прекомерној експресији на местима полипозе колона, инхибицији апоптозе, трансформацији проканцерогених промена у канцерогене, појачаној ангиогенези и имуносупресији. Осим ових начина, доказан је повољан утицај IL-10 на CD8+ Т меморијске ћелије чиме побољшава њихову ефекторску функцију *in situ* (88).

TGF- β

Такође спада у групу регулаторних цитокина који игра важну улогу у инфламацији и настанку карцинома. За активност TGF- β сигналног пута, одговорни су Smads протеини и то регулаторни Smad 2, 3, 1, 5, 8 који се активирају након формирања комплекса TGF- β -TGF- β R2, а потом се везивањем за Smad4 транслоцирају у језгро и врше регулацију експресије гена за TGF- β . Мутација у TGF- β R2 или инактивација Smad4 су честе у појединим типовима карцинома, укључујући и CRC. TGF- β инхибира раст туморских ћелија, активира апоптозу или аутофагију и тако супримира развој тумора. Као и IL-10 инхибира IL-6 зависан тип CRC-а (89). Насупрот овим тврдњама, доказана је супротна активност TGF- β и то поспешивање прогресије тумора и метастатско ширење туморских ћелија. Стога, TGF- β игра двојаку улогу у ћелијској пролиферацији и ћелијској смрти. TGF- β може потпомагати обнављање туморских

матичних ћелија или индуковати њихову диференцијацију (89). Трансгенска прекомерна експресија TGF- β у Т лимфоцитима битно је одложила развој карцинома код мишева који су третирани АОМ/DSS (енгл. Dextran sodium sulphate, DSS) и експресија dnTGFR β II повећала је број лезија, што потврђује битну улогу TGF β сигналног пута у настанку CRC-а (90). Мукозне Т ћелије код пацијената са IBD-ом показују повишен ниво Smad7 (инхибитор TGF β сигналног пута) и ткиво црева код ових пацијената показује смањен ниво фосфорилисаног Smad3 (76).

1.2.5. Улога CRP, AFP, CEA, CA19-9 у биологији колоректалног карцинома

CRP (енгл. C-reactive protein) је сензитиван, али неспецифичан параметар упале кога примарно секретују хепатоцити под дејством IL-6 као одговор на инфекцију, трауму, некрозу ткива, туморске промене и др. Доказано је у многим студијама да пацијенти са CRC-ом имају значајно више вредности циркулишућег CRP-а преоперативно у односу на контролну групу здравих. Такође је доказано да су високе вредности CRP-а у корелацији са унапредовалим стадијумом болести и лошијом прогнозом (117).

AFP (енгл. Alpha fetoprotein) је протеин који се нормално синтетише у јетри и жуманчаној кеси фетуса. Користисе као тумор маркер код одраслих и повишене вредности се могу наћи код тумора јетре, тестиса и оваријума. Повишене вредности AFP-а су ретке код CRC-а, али у случајевима у којима је то доказано упитању су били пацијенти са CRC-ом са метастазама у јетри, плућима и костима, тако да су повишене вредности овог тумор маркера доведене у везу са унапредовалом болешћу и лошијом прогнозом (118).

CEA (енгл. Carcinoembryonic antigen) представља гликопротеин који се налази на површини ћелија и учествује у ћелијској адхезији. Нормално га синтетишу феталне ћелије гастроинтестиналног тракта непосредно до рођења. Повишени нивои овог гликопротеина у серуму могу се наћи код различитих карцинома попут карцинома колона, желуца, панкреаса, плућа, дојке и др. па се користи као тумор маркер за ове типове карцинома. Осим што је доказано да постоје повишене вредности овог тумор маркера код CRC-а и да су вредности више у унапредовалом стадијуму болести, доказана је и позитивна корелација између повишених вредности CEA у постоперативном периоду и поновног јављања болести. Стога, постоперативно

Колоректални карцином: Значај концентрација цитокина у серуму и фецесу за процену тежине болести

мерење СЕА може на време открити поновно јављање болести и рано секундарно лечење (119).

СА 19-9 (енгл. Carbohydrate antigen) јесте тумор маркер који се првенствено мери у склопу дијагностиковања карцинома панкреаса, али и код CRC-а, карцинома езофагуса, хепатоцелуларног карцинома и др. Код CRC-а примењује се мерење овог тумор маркера преоперативно у циљу *staging*-а и током постоперативног праћења, поготово код пацијената код којих је примењивана хемиотерапија. Доказано је да су повишене концентрације код узрапредовале болести, метастатског ширења CRC-а у јетру и плућа. Како су повишене вредности СА 19-9 повезане са касним стадијумом болести, овај тумор маркер се не може користити за детекцију раног стадијума болести, већ за процену прогнозе болести и праћење напретка лечења (120).

1.3. Класификација колоректалног карцинома

Више од 90% CRC-а су аденокарциноми епителног порекла, потичу из мукозе колоректума (91). Остали ретки типови су аденосквамозни, сквамозни, CRC вретенастих ћелија, недиферентовани. Класични аденокарцином карактеришу glandуларне формације, које чине основу хистолошког градирања. Код добро диферентованих тумора, 95% тумора чине glandуларне формације. Умерено диферентоване аденокарциноме чини између 50 и 95% glandуларних формација. Лоше диферентовани су углавном солидни са мање од 50% glandуларних формација. У клиничкој пракси најчешћи је умерено диферентовани који чини око 70% свих аденокарцинома. У класификацији Светске здравствене организације, постоји више хистололошких варијанти колоректалног карцинома, као што су: муцинозни, ћелија прстена печатњака, медуларни, микропапиларни, назубљени, крибриформни, вретенастих ћелија, недиферентовани (92). Само прве три варијанте биће разматране у овом тексту.

1.3.1. Муцинозни аденокарцином

Чини 10-15% свих дијагностикованих CRC-а. Код овог типа карцинома више од 50% екстрацелуларног муцина чини укупни туморски волумен (слика 1). Тумори са

значајном муцинозном компонентом, више од 10%, а мања од 50 %, називају се аденокарциноми са муцинозном диференцијацијом. Прогноза муцинозног аденокарцинома у односу на конвенционални аденокарцином је различита међу ауторима и студијама. Исто тако, постоје значајне разлике у клиничким и хистопатолошким карактеристикама између муцинозног и конвенционалног аденокарцинома колоректума. Муцинозни се чешће налази код карцинома колона него код карцинома ректума. Муцинозни карцином је подтип CRC-а који се чешће јавља код жена него код мушкараца, и преобладајно, али не и ексклузивно, локализован у проксималном колону. Демографски, чешће се налази у Европи, Северној Америци и у Аустралији. Даље, муцинозни аденокарцином је чешће дијагностикован код пацијената са инфламаторним болестима црева, као и што пацијенти са историјом пелвичног и абдоминалног зрачења, чешће оболевају од аденокарцинома муцинозног типа. Муцинозни аденокарцином се сматра лоше диферентованим (градус 3), и генерално се дијагностикују у каснијем стадијуму болести. Постоји више хипотеза које покушавају да објасне овај феномен. На првом месту муцинозни аденокарцином се чешће јавља у проксималном колону, исто тако мање је солидан што га укупно чини тежим за дијагнозу. Такође, у односу на класични аденокарцином има другачији молекуларни „потпис“, што хипотетички може условити бржу прогресију болести. Многи муцинозни аденокарциноми се јављају код пацијената са херeditарним неполипозним CRC-ом (HNPCC или Lynch синдром), када најчешће испољавају висок ниво микросателитне нестабилности (енг. High microsatellite instability, MSI-H). За разлику од MSI-H муцинозних тумора који су боље прогнозе, муцинозни аденокарциноми (енг. Mucinous colorectal carcinoma; MCC) су агресивнији и повезани са лошијом прогнозом, када се дијагностикују у каснијем стадијуму болести. BRAF мутација се такође, чешће налази код муцинозних аденокарцинома и повезана је са инфилтративним начином раста. Занимљиво је да је учесталија и KRAS и PIK3CA мутација код пацијената са муцинозним CRC-ом. MUC2 ген, који кодира муцин-2 протеин, је често повећане експресије код пацијената са муцинозним аденокарциномом. Из горе наведеног, проистичу механизми који покушавају да објасне релативну резистентност муцинозних аденокарцинома на хемио и радио терапију, у поређењу са класичним аденокарциномом. Ова резистенција је вероватно узрокована комбинацијом другачије молекуларне основе, клиничке експресије у односу на класични аденокарцином.^[74]

Колоректални карцином: Значај концентрација цитокина у серуму и фецесу за процену тежине болести

Муцинозни аденокарцином дијагностикован у метастатској болести је уопштено, лошије прогнозе у поређењу са метастатском болешћу аденокарцинома.

1.3.2. Аденокарцином ћелија прстена печатњака (Signet ring cell carcinoma, SRCC)

SRС карцином колона је редак, заузима мање од 1% свих CRC-а . По дефиницији он је лоше диферентован (висок градус), и има лошију прогнозу у односу на конвенционални аденокарцином.

Ретроспективна студија Турских аутора, са приказом 22 случајева дијагностикованог SRC CRC-а, долази до закључка да постоји полна разлика у дистрибуцији овог карцинома, са доминантном појавом у мушкој популацији. Већина болесника је млађе животне доби, око 40 година живота, односно четврта деценија живота и јавља се око 10-ак година раније него конвенционални аденокарцином. За разлику од Јапанске студије, која проксимални колон идентификује као доминантно место појаве SRC CRC-а, у Турској студији ректум је најчешћа локализација. У односу на стадијум, већина студија показује да се дијагноза SRC CRC-а поставља у III или IV стадијуму болести (78-80%), са захватањем лимфних нодуса у 77.4%, перитонеалним метастазама у 38.7% и хепатичном болешћу у само 2.9% случајева. SRC CRC је тумор са дифузном инфилтрацијом и циркуларним задебљањем зида црева, зато се често назива „колонични линитис пластика“, мада у каснијим стадијума може имати клиничку презентацију у виду вегетације или велике туморске масе. Куративна, онколошка ресекција је била изводљива у нешто више од 50% случајева (93). У већини студија, просечно време преживљавања је између 20 и 45 месеци.

1.3.3. Медуларни аденокарцином

Овај карцином је екстремно редак, са просечном инциденцом од 3.47 на популацији од 10 милиона становника. Просечно се се дијагностикује 5-7 случајева медуларног CRC-а на 10 000 дијагностикованих CRC-а. Медуларни аденокарцином колоректума је подтип аденокарцинома са снажном повезаношћу са MSI-H. И поред лоше диференцијације релативно је боље прогнозе (92).

1.4. Патохистолошка класификација и процена исхода

Ресецирани сегмент дебелог црева је кључни извор података релевантних за исход оперативног лечења и постоперативно праћење болесника. Анализирани су извештаји о макроскопској и микроскопској патохистолошкој анализи да би се болесници сврстали у хомогене групе са различитим ризиком од периоперативне смрти. Овај модел дозвољава и категоризацију болесника у различите групе са идентичним стадијумом тумора и хистолошком грађом у циљу ефикасније прогнозе периоперативног морталитета болесника након хируршког лечења карцинома дебелог црева (94,95).

Да би се постигла униформност и конзистентност у патохистолошким извештајима, препоручује се хистолошка класификација тумора предложена 2003. године од стране Светске здравствене организације (СЗО) (93,94). Патохистолошка класификација СЗО за одређивање стадијума тумора јесте tumor, nodes, metastases (TNM) класификација, а за одређивање резидуалног статуса тумора residual (R) класификација (93,94). Најпознатија и највише коришћена класификација је она коју је 1932. године предложио Cuthbert Dukes, а која прати трансмуралну пенетрацију инвазивног карцинома према околном ткиву, као и присуство лимфонодалних метастаза: А – раст карцинома ограничен на мукозу и субмукозу без захватања лимфних чворова, В – карцином захвата цео зид црева, али без метастаза у регионалне лимфне чворове, С – карцином захвата зид дебелог црева до различите дубине, али су присутне метастазе у регионалне лимфне чворове, D – присутне су удаљене метастазе без обзира на друге факторе или локално иноперабилан тумор (93,95). Оригинална Dukes класификација модификована је и допуњена Astler-Coller класификацијом, са подгрупама В1 и С1.

Данас се најчешће користи UICC/AJCC (International Union Against Cancer/American Joint Committee on Cancer) TNM класификација, која се базира на суштинским елементима Astler-Coller-Dukes класификације: Tis – carcinoma in situ, стадијум 0, А – карцином ограничен на мукозу – T1, стадијум I; В1 – карцином захвата мукозу и субмукозу – T1N0, стадијум II; В2 – карцином продире кроз мускуларис проприју – T3N0, стадијум II; С1 – тумор ограничен на мускуларис проприју, метастазе у регионалне лимфне чворове – T2N1-2, стадијум III; С2 – тумор инфилтрише кроз мускуларис проприју, метастазе у лимфне чворове, тумор пробија цео зид црева (тумор захвата овојницу црева) – T3N1-2, стадијум III; D – удаљене метастазе или локално иноперабилан тумор T1-4, N0-2, M1, стадијум IV (95,96). Важан корак у

патохистолошком испитивању интраоперативно и постоперативно је одређивање класификације R, односно потврда или искључивање присуства резидуалног туморског ткива, посебно у околини ресекционих линија. У том смислу најважније је постићи комплетну туморску ресекцију без резидуалног тумора (R0). Распон од случајева са микроскопским (категирија R1) или случајева са макроскопским резидуалним тумором представља независни прогностички фактор (96). Хистолошки градус је полуквантитативни параметар који одређује степен диферентованости туморског ткива. Мултидисциплинарна радна група за колоректалне карциноме на консензус конференцији 2000. године препоручила је поједностављену поделу на: а) добро диферентоване (low grade) аденокарциноме и б) слабо диферентоване (high grade) аденокарциноме. Према овој препоруци, подела се врши на основу процента заступљености гландуларних формација у тумору (више или мање од 50%) (97,98). Поред субкласификације колоректалних карцинома по Astler-Coller-Dukes, присутна је и субкласификација коју је дала Gastrointestinal Tumor Study Group (GITSG) која са C1 означава тумор са метастазама у 1–4 лимфна чвора, а са C2 тумор са метастазама у 5 и више лимфних чворова, што треба имати у виду због могућег неслагања (99). Паралелна процена по различитим системима веома је важна и у литератури је познат случај исто тако познатог болесника, председника САД, коме је оперисан аденокарцином дебелог црева Dukes A, Astler-Coller B1, који није еквивалент Dukes B стадијуму. Болесници са колоректалним карциномом Dukes A имају петогодишње преживљавање 80–90%, што је више него што имају болесници са Dukes B карциномом (99). Литературни подаци показују да тумор са више од 50% муцинозног карцинома има знатно лошију прогнозу од немучинозног тумора, али само у стадијумима A и C, док муциозна диференцијација не корелише са прогнозом у стадијумима B и D (84). Пропорција муциозних аденокарцинома и Astler-Coller-Dukes група C2 чешћа је код болесника млађих од 30 година, те приликом процене прогностичких фактора ваља узети у обзир и године болесника. На прогнозу хируршке терапије има утицаја и венска инвазија туморских ћелија, док налаз малигнућ ћелија у циркулишућој крви није везан за венску инвазију и нема прогностичког значаја у односу на преживљавање болесника (100,101). Болесници са патохистолошким D степеном тумора (Astler-Coller- Dukes), стадијума IV болести (TNM,T1-4,N0-2,M1), слабо диферентованим муциозним аденокарциномом, имају статистички значајно виши морталитет у периоперативном току (77,8%).

1.5. Симптоми и знаци болести

Ова болест може бити потпуно асимптоматска у раном стадијуму, док се касније могу јавити умор, малаксалост, губитак у телесној тежини, осећај надутости у абдомену, поремећај пражњења црева, анемија, ректално крварење, палпабилна туморска маса у абдомену, бол у абдомену, хепатомегалија, асцит, опструкција или перфорација црева и др. Тумор асцендентног дела колона презентује се најчешће крварењем, анемијом и дијарејом, док се тумор десцендентног дела колона презентује касније и најчешће се открива као опструкција црева.

1.6. Дијагностика

Златни стандард за дијагностику CRC-а је колоноскопија са биопсијом (4,102). Ендоскопски се констатује постојање туморске инфилтрације и одређује се њена локализација у смислу удаљености од анокутане линије. Хистопатолошки налаз биоптата тумора обезбеђује потврду постојања малигне неопластичне пролиферације и у највећем броју случајева утврђивање хистолошког типа тумора. Степен диференцијације тумора одређен на биоптичком узорку показује ниску подударност са степеном диференцијације истог тумора, одређеним на оперативном материјалу (103). Пре приступања оперативном лечењу пацијената, неопходно је урадити комплетну анализу крви, као и процену функције јетре и бубрега, док се одређивање нивоа СЕА (енгл. carcinoembryonic antigen, СЕА) у серуму болесника врши ради процене тежине и исхода болести. Повишен ниво СЕА у серуму корелира са узнапредовалом дисеминованом болешћу и лошијом прогнозом болести код ресектабилних тумора (104). Код оперисаних болестника се дефинитивна дијагноза тумора, са одређивањем свих прогностичких и предиктивних фактора, поставља хистопатолошком експертизом оперативног материјала одстрањеног колона са тумором. Радиолошке методе, као нпр. СТ (енгл. Computerized Tomography, СТ) преглед абдомена и грудног коша имају своју улогу у процени дисеминације болести, али не и у дијагностици примарног тумора. Радиолошка дијагностика је, међутим, од изузетног значаја за евалуацију локорегионалног статуса примарног карцинома ректума (102). Осим СТ-а, све више је у употреби и PET scan (енгл. Positron emission tomography scanning, PET scan) који омогућава визуелизацију депозита у скелету, осим код муцинозног карцинома прстена печатњака (5). Поред стандардних дијагностичких метода, ради постизања бољих

результата лечења, примену налази и молекуларна дијагностика. Сходно томе, препоручује се тестирање RAS мутација (K-RAS и N-RAS) код пацијената код којих се разматра примена anti- EGFR, затим BRAF V600 мутација као прогностички фактор, dMMR/MSI се тестира код свих пацијената са CRC-ом ради прогнозе и идентификације Lynch синдрома (105).

1.7. Лечење

Карцином колона је болест код које је у великом броју случајева терапија мултимодална. Потенцијално куративан је хируршки третман, који је довољан код пацијената у стадијумима I и II (4,102,106). Међутим, уколико постоје индикатори високог ризика, као што су висок хистолошки градус, лимфо-васкуларна инвазија, перинеурална инвазија или илеус у време операције, онда се након хируршког лечења додаје и адјувантна хемиотерапија 5- флуороурацилом и леуковорином (102). У III стадијуму болести (локо-регионална болест) се постоперативно даје капецитабин, док се пацијентима са удаљеним метастазама поред флуоропиримидина у терапију укључује још и иринотекан или оксалиплатин. Болесници са удаљеним, а потенцијално ресектабилним метастазама у јетри и плућима, додатно добијају и имунотерапију антителом на рецептор васкуларног ендотелијалног фактора раста – бевацизумаб, или на рецептор епидермалног фактора раста – цетуксимаб, у зависности од мутационог K-RAS статуса. Зрачна терапија има своје место и у неoadјувантном и у постоперативном третману пацијената са карциномом ректума, али не и пацијената са карциномом колона (102).

1.8. Screening

Основни циљ screening-а јесте да смањи морталитет раном дијагностиком и лечењем преканцерозних лезија (полипа) и раних стадијума канцерозних лезија. Кроз многе студије је доказан значај раног дијагностиковања и лечења полипа како би се предупредио развој инвазивног облика CRC-а. Према бројним водичима, препорука је да се спроводи колоноскопија код асимптоматских мушкараца и жена након 50. године. Постоји неколико тестова који се могу применити у циљу раног дијагностиковања и лечења CRC-а и то било који од наведених: флексибилна сигмоидоскопија на сваких 5

Колоректални карцином: Значај концентрација цитокина у серуму и фецесу за процену тежине болести

година, колоноскопија на 10 година, снимање баријумом на 5 година, СТ колонографија на 5 година. Осим ових могу се поуздано применити и анализе које су високо сензитивне за CRC: FOBT (енгл. Guaiac-based fecal occult blood test, FOBT) и FIT (енгл. Fecal immunochemical test, FIT) анализе једном годишње, а MSDT (енгл. Multitarget stool DNA test, MSDT) у зависности од процене. Уколико је код пацијента откривен полип колона, препоруке су да се колоноскопија ради на: 10 година за хиперпластични полип <10 mm у сигмоидном делу колона или ректуму; 5 до 10 година за 1 – 2 тубуларна аденома <10 mm; 3 године за 3 – 10 тубуларна аденома; чешће од 3 године за 10 аденома; 3 године за један или више тубуларних аденома ≥ 10 mm, један или више вилозних аденома и аденома са високим степеном дисплазије (107).

2. ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА

Основни циљ истраживања је да се испита корелација вредности цитокина у серуму и фецесу IL-1b, IL-2, IFN- γ , IL-12, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, IL-22 и IL-27 са стадијумом болести и клиничко-патолошким карактеристикама, код пацијената са колоректалним карциномом.

У складу са основним циљем поставили смо следеће експерименталне задатке:

1. Анализирати концентрације IL-1b, IL-2, IFN- γ , IL-12, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, IL-22 и IL-27 у серуму пацијената са колоректалним карциномом и корелацију добијених вредности са клиничким и патохистолошким карактеристикама болести;
2. Анализирати концентрације IL-1b, IL-2, IFN- γ , IL-12, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, IL-22 и IL-27 у фецесу пацијената са колоректалним карциномом и корелацију добијених вредности са клиничким и патохистолошким карактеристикама болести;
3. Испитати међусобну корелацију системских и локалних вредности (у фецесу) IL-1b, IL-2, IFN- γ , IL-12, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, IL-22 и IL-27.

ХИПОТЕЗЕ СТУДИЈЕ

1. Серумске концентрације анти-инфламаторних цитокина у позитивној су корелацији са клиничким и хистопатолошким карактеристикама прогресивне болести;
2. Концентрације анти-инфламаторних цитокина у фецесу у позитивној су корелацији са клиничким и хистопатолошким карактеристикама прогресивне болести;
3. Концентрације про- и анти- инфламаторних цитокина у серуму и фецесу болесника са карциномом у колоректалној регији међусобно позитивно корелирају.

3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

Студија је спроведена 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 2017. године до јануара 2018. године.

Истраживање 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 (енгл. Good Clinical Practice, GCP).

3.1. Испитивани узорак

У студију су укључени испитаници којима је током колоноскопског прегледа дијагностикован колоректални карцином, што је потврђено биопсијом *ex tempore* (дијагноза верификована у Центру за патоанатомску дијагностику Клиничког центра Крагујевац) и који су хоспитализовани. Другу, контролну групу, чини 20 здравих испитаника.

Испитаници који су уврштени у студију су по процени специјалисте гастроентерохепатолога испунили све укључујуће и ниједан искључујући критеријум. Општи укључујући критеријум 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 столицу, анемија, губитак апетита и тежине, позитиван тест на фекално окултно крварење). Искључујући критеријуми су раније ресекције колоректалног карцинома, рецидивантни тумори колоне и спроведена зрачна и/или хемиотерапија, коморбидитет са другим гастроентеролошким болестима (рефлуксна болест једњака, улкусна болест,

Колоректални карцином: Значај концентрација цитокина у серуму и фецесу за процену тежине болести 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* дијагностикован је колоректални карцином. Колоноскопски прегледи су обављани у Центру за гастроентерохепатологију Клиничког центра Крагујевац, уз одговарајућу припрему испитаника. Испитаницима на дан пријема је узета крв за рутинске лабораторијске анализе, одређивање концентрације туморских маркера и цитокина у серуму. Узет је и узорак столице за одређивање концентрације цитокина. 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.

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.

Варијабле које се мере у студији

Као независне варијабле праћени су: пол, старост, лабораторијске анализе (CRP, AFP, СЕА и СА19-9), локализација, активност болести, ендоскопски налаз, патохистолошки налаз, хистолошки тип, нуклеарни градус, радиолошки налаз, компликације, екстраинтестиналне манифестације, ултразвучни преглед стомака, радиолошки преглед срца и плућа, компјутеризована томографија, TNM класификација тумора.

Као зависне варијабле праћене су концентрације цитокина TNF- α , IL-1 β , IL-2, IL-22, IL-27, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, IL-13, IL-17, IL-33, sST2, TGF- β , IFN- γ , Gal-1 и Gal-3 у серуму и фецесу.

Збуњујуће варијабле:

- удружене болести (дијабетес, повишен крвни притисак...)
- лекови које узимају пацијенти
- лабораторијске анализе крви (функција јетре и бубрега)
- навике пацијената (пушач, конзумирање алкохола, кафе)

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 су болесници сврстани у две групе, односно у групу са карциноматозом перитонеума и и групу без карциноматозе перитонеума.

Класификација тумора је учињена према критеријумима UICC (енгл. The Union for International Cancer Control)- TNM, а градирање према класификацији WHO (енгл. World Health Organization).

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 анализу (од сваког испитаника узето је по 5 исечака ткива, величине 4-5 mm).

Патохистолошка анализа ткивних исечака

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 (108) и сагласно препорукама Gurr-а (109): 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, Centrophem, Србија) и препарати су прекривени покровним стаклима. Овако припремљени ткивни исечци су, након 24-часовног сушења, анализирани светлосном микроскопијом (увеличање 10x и 40x).

Хистопатолошке (микроскопске) особине су подразумевале одређивање хистолошког (ХГ) и нуклеарног градуса (НГ) 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) (110). Према Светској здравственој организацији разликује се добро, умерено, слабо диферентовани и недиферентовани тумор (111). Оба система су заснована 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

Колоректални карцином: Значај концентрација цитокина у серуму и фецесу за процену тежине болести непромењену, здраву ћелију. Дефинише се као низак (НГI), средњи (НГII) и висок (НГIII) (112).

У нашој студији испитаници са колоректалним карциномом у односу на хистолошки градус су сврстани у две групе: 1) градус I, добро диферентован и 2) градус II, умерено диферентован + градус III, лоше диферентован, а у односу на нуклеарни градус у три групе: низак (I), средњи (II) и висок (III). Ниједан од анализираних тумора није имао недиферентован хистолошки и нуклеарни градус.

Сви карциноми су затим подељени на две групе: са детектованом и без детектоване инвазије лимфних, односно крвних судова.

Изолација течне фракције фецеса

Узорци столице пацијената (1-10 g) сакупљани су у стерилним контејнерима и премерени. Подељени су на аликвоте од по 1 g и затим ресуспендовани у 5 ml коктела инхибитора протеазе (protease inhibitor cocktail- SIGMA, P83401), разблаженог 1:100, и центрифугирани 5 минута на G, на 4°C, како је претходно описано (113,114). Супернатанти су сакупљени и складиштени на - 80°C до анализе.

Одређивање концентрације медијатора инфламације у серуму и фецесу

Издвојени серум и течна фракција фецеса испитаника који учествују у истраживању су замрзнути на -20°C до извођења анализе. Концентрације TNF- α , IL-1 β , IL-2, IL-22, IL-27, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, IL-13, IL-17, IL-33, sST2, TGF- β , IFN- γ , Gal-1 и Gal-3 одређиване су одговарајућим комерцијалним ELISA тестовима специфичним за хумане цитокине (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), као што је описано у нашим претходним истраживањима (115,116).

Стандарди су пре употребе растворени у PBS-у (pH 7.2), тако да почетне концентрације буду 250 pg/ml за IL-1 β ; 600 pg/ml за IL-6; 1000pg/ml за IL-17, IFN- γ , TNF- α ; 1500 за IL-33; 2000 pg/ml за IL-4, IL-10, TGF- β , sST2; 4000 pg/ml за Gal-3; 6000 pg/ml за IL-13; 8000 pg/ml за IL-12; 20ng/ml за Gal-1. Од оваквих штокова направљена су серијска разблажења у 7 тачака у комерцијалном растварачу, према упутству произвођача. 100 μ l радне концентрације везујућег антитела (енгл. Capture Antibody)

сипано је у бунарчиће полистиренских микротитар плоча (енгл. Microtiter-plate, MTP) 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 μ l 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 μ l 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 μ l 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 μ l раствора супстрата (енгл. Substrate Solution: Colorreagent A+Colorreagent B, 1:1). Двадесет минута касније, додато је 50 μ l стоп раствора (енгл. Stop Solution: 2 NH_2SO_4) и абсорбанца 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 дубликату.

Одређивање серумских концентрација CRP и туморских маркера AFP, CEA и CA 19-9

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 су одређиване турбидиметријском методом, док серумске концентрације туморских маркера AFP,

СЕА и СА 19-9 су одређиване методом хемилуминисценције, у централној лабораторији Клиничког центра.

Снага студије и величина узорка

Величина узорка је израчуната на основу података о вредностима серумске концентрације про-инфламацијског цитокина IL-10, публикованих у студији сличног дизајна. Прорачун је сачињен коришћењем одговарајућег рачунарског програма уз вероватноћу α грешке од 0,05, снагу студије од 0,8, величину ефекта од 0,80, који показује статистички значајну корелацију између серумског нива IL-10 код пацијената са колоректалним карциномом и прогресије болести (група пацијената са узнапредовалом болешћу има веће серумске вредности IL-10), са двосмерним статистичким тестирањем нулте хипотезе, Ман-Витнијевим тестом. Имајући у виду горе наведене параметре, величина узорка је прорачуната на минимално 50 испитаника.

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

Колоректални карцином: Значај концентрација цитокина у серуму и фецесу за процену тежине болести 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 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 $p < 0,05$.

4. РЕЗУЛТАТИ

Карактеристике испитаника

У студију је укључено 60 испитанка са колоректалним карциномом. Другу, контролну групу, чини 20 здравих испитаника. Демографске карактеристике ових испитаника приказане су у табели 1. Није нађена статистички значајна разлика у полној дистрибуцији између група.

Табела 1. Основне карактеристике испитаника

	Број
Пол (мушки/женски)	35/25
Старост (средња вредност[ранг])	64 [50–82] године
Локализација (P/D/R)	15/34/11
Нуклеарни градус (I/II/III)	8/37/15
Стадијум (TNM: I/II/III/IV)	32/0/16/12
Некроза (изражена/умерена/одсутна)	16/44/0

Note: P: проксимални колон; D: дистални колон; R: ректум.

Серумске и фецесне концентрације Gal-3 и Gal-1 као и однос галектина и проинфламацијских цитокина корелира са хисто-патолошким карактеристикама CRC-а

Оболели од CRC-а подељени су на три групе, на основу нуклеарног градуса (I/II/III). Анализиране су концентрације цитокина IL-2, IL-22, IL-27, IL-17, IL-33, sST2, IL-4, IL-6, IL-1- β , TGF- β , IFN- γ , IL-10, IL-12, IL-13, TNF- α , gal-1 и gal-3 у серуму испитаника и упоређене између дефинисаних група. На табели 2 уочава се да је серумски ниво IL-4 статистички значајно већи у групи испитаника са нуклеарним градусом II, у односу на градус III. Није нађена статистички значајна разлика у системским и фецесним вредностима цитокина IL-2, IL-22 и IL-27 (резултати нису приказани).

Табела 2. Концентрација испитиваних биомаркера у серуму болесника са CRC-ом у односу на нуклеарни градус

Концентрација цитокина (pg/ml)	Нуклеарни градус			p
	I	II	III	
IL-17	74,08±2,85	71,83±15,91	76,39±5,89	p>0.05
IL-33	89,98±37,39	67,29±71,38	98,43±59,22	p>0.05
sST2	1469,96±250,09	921,45±672,21	669,02±467,89	p>0.05
IL-4	625,52±28,76	713,11±133,78	594,31±60,45	p=0.014
IL-6	8,86±0,44	7,81±2,09	12,28±16,85	p>0.05
IL-1β	11,76±2,26	11,05±9,52	10,28±2,64	p>0.05
TGF-β	1374,12±43,72	1118,08±563,47	1072,70±480,53	p>0.05
IFN-γ	187,80±126,29	194,47±130,36	162,27±73,67	p>0.05
IL-10	4,91±061	4,47±2,39	4,41±0,74	p>0.05
IL-12	57,13±13,47	47,44±21,41	55,46±14,13	p>0.05
IL-13	351,93±84,22	411,19±102,29	437,85±100,67	p>0.05

Анализа обухвата 60 испитаника са CRC-ом, који су подељени на три групе: Нуклеарни градус I (n=8), нуклеарни градус II (n=37), нуклеарни градус III (n=15). Анализиране су серумске концентрације испитиваних биомаркера и упоређене између дефинисаних група. Статистичка значајност је тестирана Mann-Whitney-евим тестом. Вредности су приказане као средње вредности ± стандардна девијација.

Колоректални карцином: Значај концентрација цитокина у серуму и фецесу за процену тежине болести

Анализом концентрације истих цитокина у фецесу испитаника и поређењем између дефинисаних група показане су статистички значајно веће концентрације IL-17 и IL-12 у фецесу испитаника са нуклеарним градусом III у односу на градус II (Табела 3).

Табела 3. Концентрација испитиваних биомаркера у фецесу болесника са CRC-ом у односу на нуклеарни градус

Концентрација цитокина (pg/ml)	Нуклеарни градус			p
	I	II	III	
IL-17	263,67±189,27	435,64±334,00	538,26±310,13	p=0.039
IL-33	340,10±19,14	374,41±255,57	376,25±249,23	p>0.05
sST2	459,06±158,16	831,05±678,47	855,28±587,04	p>0.05
IL-4	1443,31±612,28	2530,16±1453,02	2958,63±1299,19	p>0.05
IL-6	24,58±14,89	45,43±26,62	51,53±19,97	p>0.05
IL-1β	419,68±626,55	2183,19±4666,18	657,56±472,29	p>0.05
TGF-β	4045,30±2664,31	8786,78±8986,42	5913,61±4031,84	p>0.05
IFN-γ	656,08±228,95	1913,86±1713,61	1518,68±847,19	p>0.05
IL-10	7,17±3,04	25,93±21,90	25,17±10,62	p>0.05
IL-12	214,00±89,76	458,53±326,08	736,52±451,59	p=0.019
IL-13	476,71±437,43	1445,83±1610,80	1257,19±886,29	p>0.05

Анализа обухвата 60 испитаника са CRC-ом, који су подељени на три групе: Нуклеарни градус I (n=8), нуклеарни градус II (n=37), нуклеарни градус III (n=15). Анализиране су фецесне концентрације испитиваних биомаркера и упоређене између дефинисаних група. Статистичка значајност је тестирана Mann-Whitney-евим тестом. Вредности су приказане као средње вредности ± стандардна девијација.

Колоректални карцином: Значај концентрација цитокина у серуму и фецесу за процену тежине болести

Додатно, анализом односа серумских вредности контрарегулаторних цитокина показано је да је вредност односа TGF- β /TNF- α статистички значајно већа код испитаника са тумором градуса III, док је однос IL-10/TNF- α статистички значајно мањи код исте групе испитаника (Табела 4).

Табела 4. Односи концентрација испитиваних биомаркера у серуму болесника са CRC-ом у односу на нуклеарни градус

Односи цитокина	Нуклеарни градус			p
	I	II	III	
TGF- β /IL-12	9,79 \pm 2,09	9,82 \pm 5,82	7,70 \pm 3,67	p>0.05
TGF- β /TNF- α	4,15 \pm 1,79	4,17\pm2,77	6,62\pm2,90	p=0.014
TGF- β /IL-1 β	120,48 \pm 28,41	146,09 \pm 95,04	105,42 \pm 47,73	p>0.05
TGF- β /IL-17	18,39 \pm 0,75	15,83 \pm 8,21	14,15 \pm 6,40	p>0.05
TGF- β /IFN- γ	10,47 \pm 7,71	8,53 \pm 7,03	9,17 \pm 7,76	p>0.05
IL-10/TNF- α	0,64 \pm 0,28	1,97\pm5,69	0,16\pm0,20	p=0.001
IL-10/IL-1 β	0,44 \pm 0,14	0,49 \pm 0,16	0,45 \pm 0,13	p>0.05
IFN- γ /IL-10	37,17 \pm 21,45	43,76 \pm 16,89	37,10 \pm 15,88	p>0.05
IL-17/IL-10	15,37 \pm 1,79	18,52 \pm 5,84	17,77 \pm 3,56	p>0.05
sST2/IL-33	19,59 \pm 12,12	19,42 \pm 13,98	14,26 \pm 17,31	p>0.05

Анализа обухвата 60 испитаника са CRC-ом, који су подељени на три групе: Нуклеарни градус I (n=8), нуклеарни градус II (n=37), нуклеарни градус III (n=15). Анализирани су односи серумских концентрација испитиваних биомаркера и упоређени између дефинисаних група. Статистичка значајност је тестирана Mann-Whitney-евим тестом. Вредности су приказане као средње вредности \pm стандардна девијација.

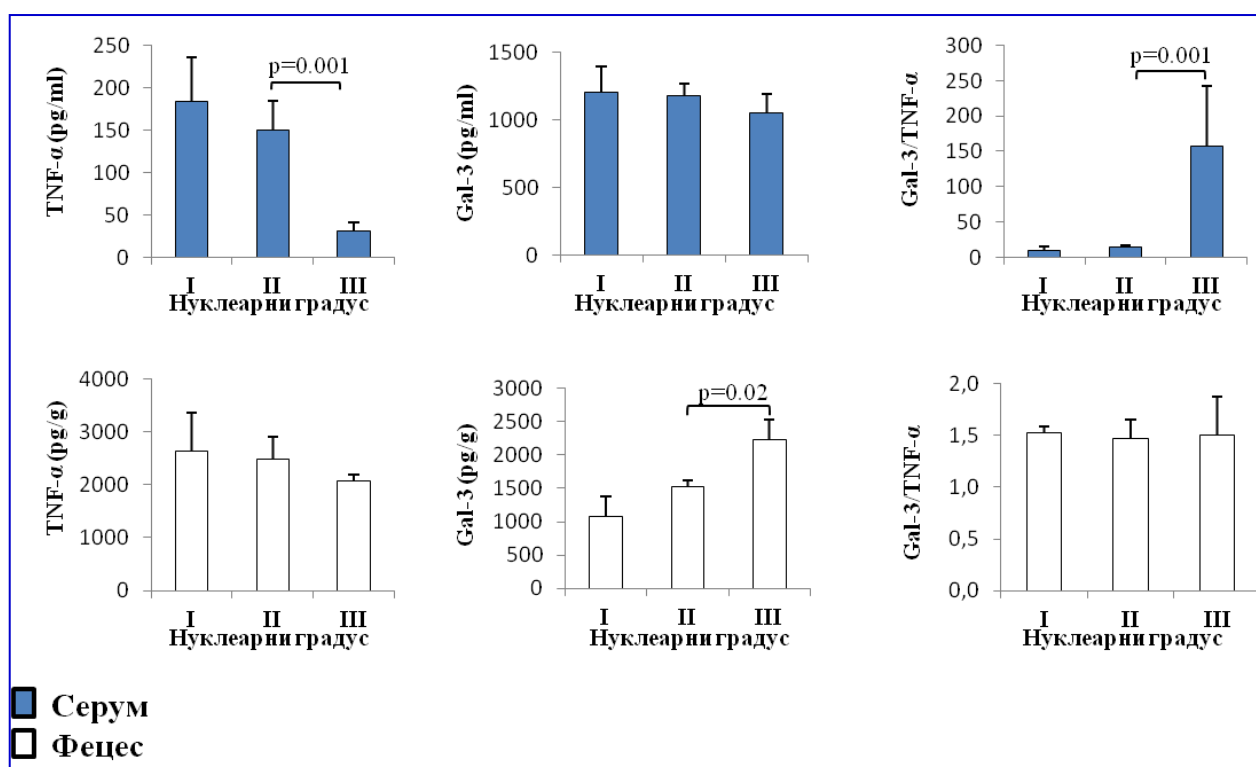
Анализом односа концентрација испитиваних биомаркера у фецесу болесника са CRC-ом у односу на нуклеарни градус, нисмо пронашли статистички значајну разлику односа концентрација наведених биомаркера у односу на различити нуклеарни градус (Табела 5).

Табела 5. Односи концентрација испитиваних биомаркера у фецесу болесника са CRC-ом у односу на нуклеарни градус

Односи цитокина	Нуклеарни градус			p
	I	II	III	
TGF- β /IL-12	18,20 \pm 5,31	28,46 \pm 37,27	9,10 \pm 6,42	p>0.05
TGF- β /TNF- α	9,09 \pm 1,45	7,70 \pm 9,79	4,01 \pm 4,14	p>0.05
TGF- β /IL-1 β	33,15 \pm 26,86	25,44 \pm 37,73	15,22 \pm 21,69	p>0.05
TGF- β /IL-17	3,15 \pm 0,75	2,44 \pm 4,21	1,22 \pm 2,40	p>0.05
TGF- β /IFN- γ	6,45 \pm 3,90	5,18 \pm 5,10	3,80 \pm 1,46	p>0.05
TNF- α /IL-10	58,14 \pm 6,11	76,96 \pm 25,17	94,66 \pm 52,65	p>0.05
IL-1 β /IL-10	42,77 \pm 55,70	118,51 \pm 142,46	43,04 \pm 55,50	p>0.05
IFN- γ /IL-10	101,57 \pm 56,48	94,17 \pm 47,73	70,50 \pm 48,53	p>0.05
IL-17/IL-10	34,07 \pm 9,72	24,49 \pm 20,05	24,02 \pm 12,04	p>0.05
sST2/IL-33	1,36 \pm 0,51	2,42 \pm 1,57	2,23 \pm 0,55	p>0.05

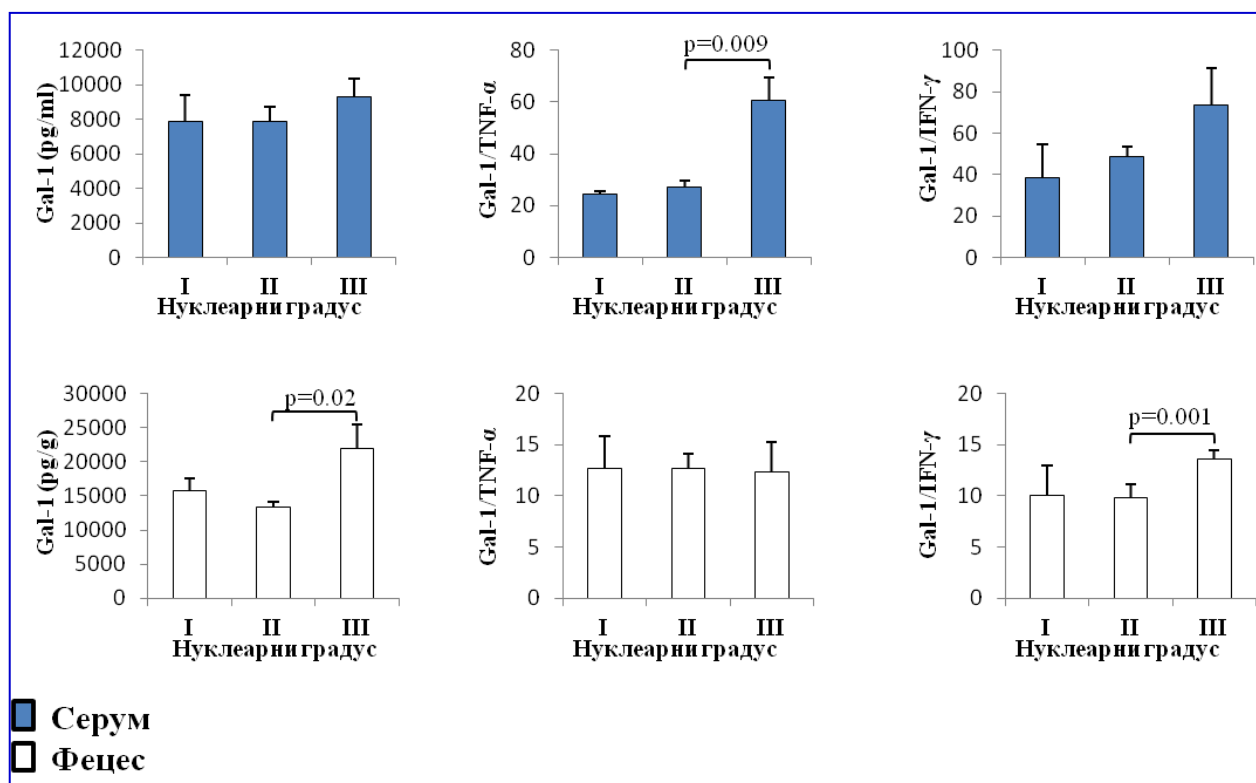
Анализа обухвата 60 испитаника са CRC-ом, који су подељени на три групе: Нуклеарни градус I (n=8), нуклеарни градус II (n=37), нуклеарни градус III (n=15). Анализирани су односи фецесних концентрација испитиваних биомаркера и упоређени између дефинисаних група. Статистичка значајност је тестирана Mann-Whitney-евим тестом. Вредности су приказане као средње вредности \pm стандардна девијација.

Евалуација системских нивоа претходно дефинисаних маркера од интереса показала је значајно нижи ниво TNF- α у групи пацијената са нуклеарним градусом III у односу на пацијенте са градусом I или II ($p = 0,001$; Фигура 1). Није било статистичких разлика у серумском нивоу Gal-3 између дефинисаних група. Међутим, однос Gal-3/TNF- α био је значајно већи код пацијената са нуклеарним градусом III ($p = 0,001$). Није било значајне разлике у фекалном нивоу TNF- α између пацијената са различитим нуклеарним градусима CRC-а. Приметили смо значајан пораст фекалног нивоа Gal-3 у групи пацијената са нуклеарним градусом III у поређењу са градусима I и II ($p = 0,02$), док није било разлике у односу Gal-3/TNF- α (Фигура 1).



Фигура 1. Повећана концентрација Gal-3 у фецесу и однос Gal-3/TNF- α у серуму, код пацијената са већим нуклеарним градусом CRC-а. Пацијенти са CRC-ом су подељени у три групе, на основу нуклеарног градуса (I, II и III). Серумски и фецесни ниво свих поменутих биомаркера одређени су ELISA-ом. Однос Gal-3 /TNF- α је евалуиран за сваког пацијента, посебно.

Као што је приказано на фигури 2, оболели од CRC-а са већим нуклеарним градусом имају веће фецесне вредности Gal-1 (III vs. II: $21936,14 \pm 3601,19$ vs. $13286,97 \pm 782,97$ pg/ml; $p=0.020$; III vs. I: $21936,14 \pm 3601,19$ vs. $15724,30 \pm 1903,49$ pg/ml; $p=0.047$), системске вредности односа Gal-1/TNF- α (III vs. II: $60,46 \pm 9,01$ vs. $27,17 \pm 2,62$; $p=0.009$; III vs. I: $60,46 \pm 9,01$ vs. $24,44 \pm 0,89$; $p=0.032$), као и фецесног односа Gal-1/IFN- γ (III vs. II: $13,64 \pm 0,78$ vs. $9,76 \pm 1,39$; $p=0.001$; III vs. I: $13,64 \pm 0,78$ vs. $10,03 \pm 2,96$; $p=0.048$).



Фигура 2. Повећана концентрација Gal-1 и Gal-1/IFN- γ односа у фецесу и односа Gal-1/TNF- α у серуму, код пацијената са већим нуклеарним градусом CRC-а. Пацијенти са CRC-ом су подељени у три групе, на основу нуклеарног градуса (I, II и III). Серумски и фецесни ниво свих поменутих биомаркера одређени су ELISA-ом. Gal-1/IFN- γ и Gal-1/TNF- α односи су евалуирани за сваког пацијента, посебно.

Анализом концентрација испитиваних биомаркера у серуму болесника са CRC-ом у односу на стадијум диференцијације тумора, нисмо пронашли статистички значајну разлику концентрација наведених биомаркера у односу на различити стадијум диференцијације (Табела 6).

Табела 6. Концентрација испитиваних биомаркера у серуму болесника са CRC-ом у односу на стадијум диференцијације тумора

Концентрација цитокина (pg/ml)	Стадијум диференцијације		p
	Изражена	умерена + одсутна	
IL-17	73,32±7,44	73,04±15,27	p>0.05
IL-33	69,95±42,75	78,40±74,05	p>0.05
sST2	1285,27±856,03	773,88±483,10	p>0.05
IL-4	629,36±93,97	696,05±132,05	p>0.05
IL-6	8,24±2,18	9,16±9,40	p>0.05
IL-1β	10,80±4,46	10,97±8,97	p>0.05
IFN-γ	197,94±101,23	182,59±123,95	p>0.05
IL-12	116,96±23,83	135,91±37,24	p>0.05
IL-13	393,13±87,60	419,57±105,20	p>0.05
TNF-α	293,20±114,96	288,09±162,38	p>0.05

Анализа обухвата 60 испитаника са CRC-ом, који су подељени на две групе: Изражена диференцијација, умерена + одсутна диференцијација. Анализирани су серумске концентрације испитиваних биомаркера и упоређене између дефинисаних група. Статистичка значајност је тестирана Mann-Whitney-евим тестом. Вредности су приказане као средње вредности ± стандардна девијација.

Анализом концентрација испитиваних биомаркера у фецесу болесника са CRC-ом у односу на стадијум диференцијације тумора, показано је да су концентрације IL-17, sST2, IL-4, IL-6, IFN- γ и IL-12 статистички значајно веће у групи болесника са умереном + одсутном диференцијацијом тумора у односу на групу болесника са израженом диференцијацијом тумора (Табела 7).

Табела 7. Концентрација испитиваних биомаркера у фецесу болесника са CRC-ом у односу на стадијум диференцијације тумора

Концентрација цитокина (pg/ml)	Стадијум диференцијације		p
	Изражена	умерена + одсутна	
IL-17	365,85±348,67	473,76±312,82	p=0.018
IL-33	293,22±75,96	399,43±271,47	p>0.05
sST2	449,33±195,65	931,72±684,00	p=0.006
IL-4	1704,21±708,62	2835,52±1464,47	p=0.007
IL-6	28,52±12,26	50,99±25,77	p=0.001
IL-1 β	1481,51±1365,30	1769,25±4520,92	p>0.05
IFN- γ	1016,15±371,41	1970,66±1679,20	p=0.010
IL-12	315,78±220,03	568,73±391,67	p=0.028
IL-13	728,43±612,02	1534,41±1564,34	p>0.05
TNF- α	949,47±608,91	2466,55±1389,08	p>0.05

Анализа обухвата 60 испитаника са CRC-ом, који су подељени на две групе: Изражена диференцијација, умерена + одсутна диференцијација. Анализиране су фецесне концентрације испитиваних биомаркера и упоређене између дефинисаних група. Статистичка значајност је тестирана Mann-Whitney-евим тестом. Вредности су приказане као средње вредности \pm стандардна девијација.

Анализом односа концентрација испитиваних биомаркера у серуму болесника са CRC-ом у односу на стадијум диференцијације тумора, нисмо пронашли статистички значајну разлику односа концентрација наведених биомаркера у односу на различити стадијум диференцијације тумора (Табела 8).

Табела 8. Односи концентрација испитиваних биомаркера у серуму болесника са CRC-ом у односу на стадијум диференцијације тумора

Односи цитокина	Стадијум диференцијације		p
	Изражена	умерена + одсутна	
TGF- β /IL-12	10,35 \pm 5,22	8,98 \pm 5,24	p>0.05
TGF- β /TNF- α	4,45 \pm 2,68	4,84 \pm 2,99	p>0.05
TGF- β /IL-1 β	110,15 \pm 38,37	143,21 \pm 93,56	p>0.05
TGF- β /IL-17	15,59 \pm 6,30	15,66 \pm 7,95	p>0.05
TGF- β /IFN- γ	7,35 \pm 5,44	9,33 \pm 7,56	p>0.05
IL-10/TNF- α	0,53 \pm 0,31	1,76 \pm 5,53	p>0.05
IL-10/IL-1 β	0,47 \pm 0,20	0,48 \pm 0,14	p>0.05
IFN- γ /IL-10	45,79 \pm 18,97	40,31 \pm 16,10	p>0.05
IL-17/IL-10	17,55 \pm 3,54	18,29 \pm 5,69	p>0.05
sST2/IL-33	20,35 \pm 17,28	17,51 \pm 13,64	p>0.05

Анализа обухвата 60 испитаника са CRC-ом, који су подељени на две групе: Изражена диференцијација, умерена + одсутна диференцијација. Анализирани су односи серумских концентрација испитиваних биомаркера и упоређене између дефинисаних група. Статистичка значајност је тестирана Mann-Whitney-евим тестом. Вредности су приказане као средње вредности \pm стандардна девијација.

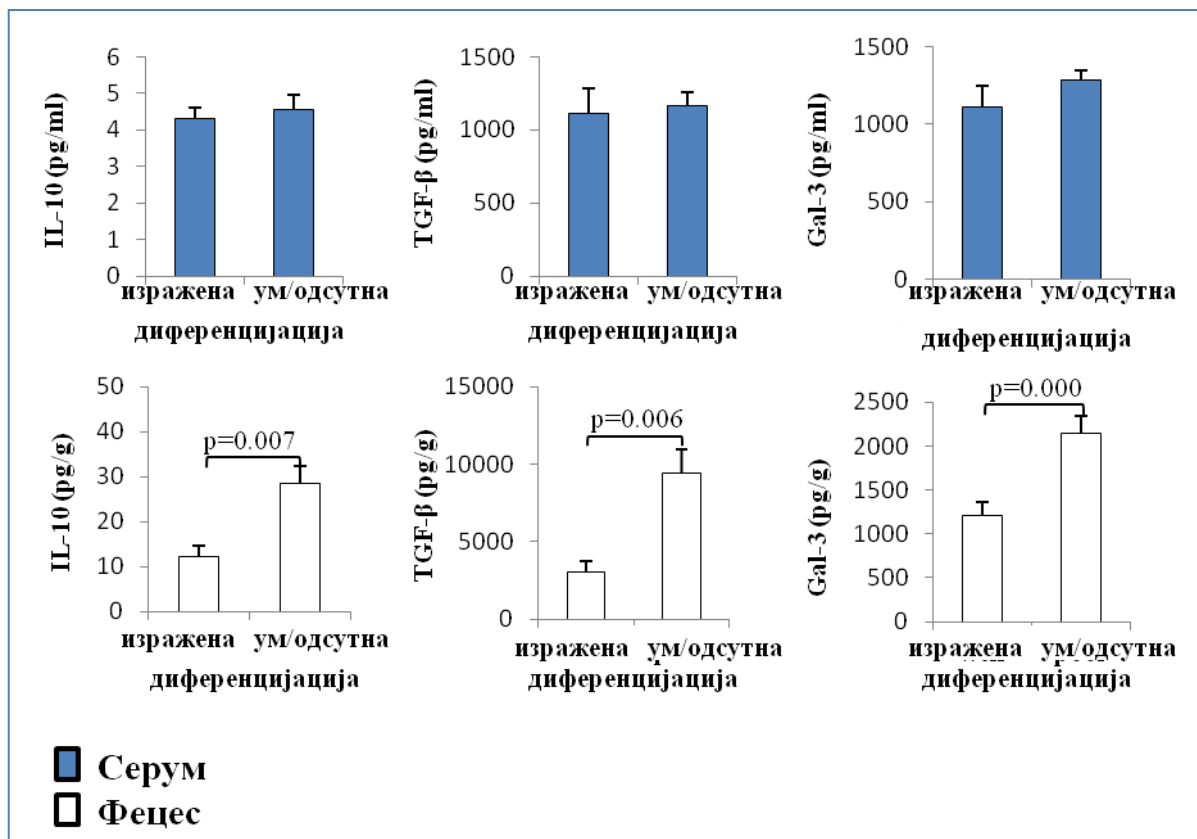
Анализом односа концентрација испитиваних биомаркера у фецесу болесника са CRC-ом у односу на стадијум диференцијације тумора, показано је да је однос концентрација sST2/IL-33 статистички значајно већи у групи болесника са умереном + одсутном диференцијацијом тумора у односу на групу болесника са израженом диференцијацијом тумора (Табела 9).

Табела 9. Односи концентрација испитиваних биомаркера у фецесу болесника са CRC-ом у односу на стадијум диференцијације тумора

Односи цитокина	Стадијум диференцијације		p
	Изражена	умерена + одсутна	
TGF- β /IL-12	14,33 \pm 9,95	26,26 \pm 36,43	p>0.05
TGF- β /TNF- α	4,80 \pm 3,69	7,70 \pm 9,55	p>0.05
TGF- β /IL-1 β	12,78 \pm 19,64	27,43 \pm 36,91	p>0.05
TGF- β /IL-17	1,78 \pm 1,30	2,43 \pm 2,95	p>0.05
TGF- β /IFN- γ	3,40 \pm 2,97	5,49 \pm 4,75	p>0.05
TNF- α /IL-10	79,12 \pm 22,83	79,76 \pm 36,67	p>0.05
IL-1 β /IL-10	145,70 \pm 162,86	77,88 \pm 109,05	p>0.05
IFN- γ /IL-10	109,90 \pm 62,21	82,17 \pm 41,48	p>0.05
IL-17/IL-10	35,49 \pm 27,37	21,54 \pm 11,77	p>0.05
sST2/IL-33	1,56\pm0,69	2,55\pm1,45	p=0.018

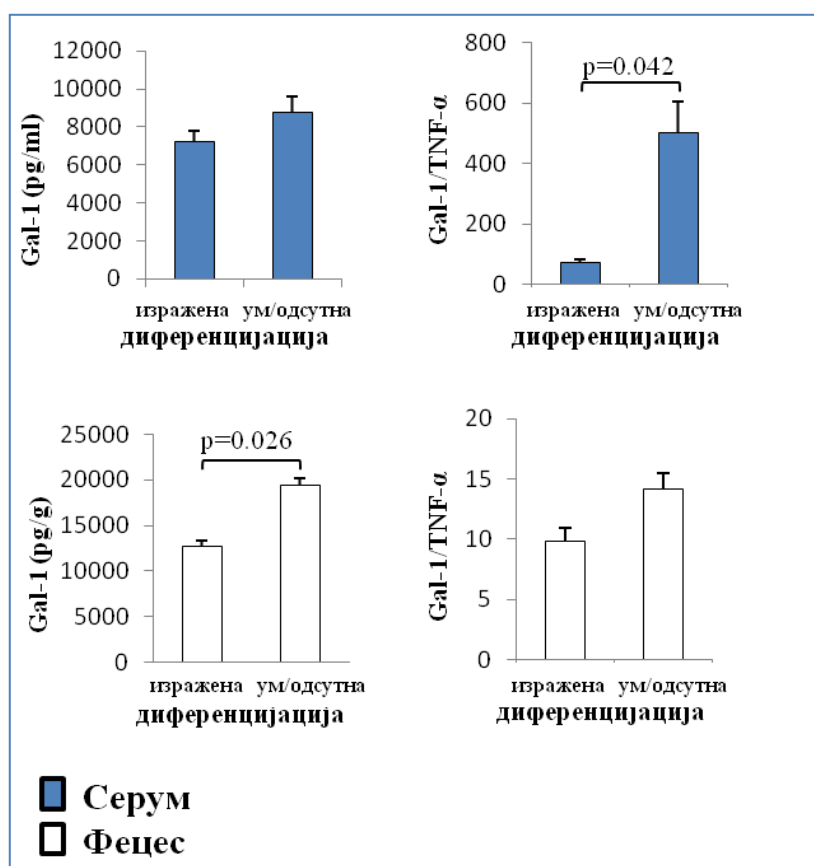
Анализа обухвата 60 испитаника са CRC-ом, који су подељени на две групе: Изражена диференцијација, умерена + одсутна диференцијација. Анализирани су односи фецесних концентрација испитиваних биомаркера и упоређене између дефинисаних група. Статистичка значајност је тестирана Манн-Whitney-евим тестом. Вредности су приказане као средње вредности \pm стандардна девијација.

Нисмо нашли значајне разлике у серумском нивоу IL-10, TGF- β и Gal-3 између дефинисаних група (Фигура 3). Међутим, фекални ниво Gal-3 ($p=0,001$) и антиинфламаторни цитокини IL-10 ($p=0,007$) и TGF- β ($p=0,006$) били су знатно виши код пацијената са слабо диференцираним CRC-ом (Фигура 3).



Фигура 3. Повећане концентрације IL-10, TGF- β и Gal-3 у фецесу пацијената са слабо хистолошком диференцијацијом CRC-а. Пацијенти са CRC били су подељени у две групе, према хистолошкој диференцијацији (добро/умерено и одсутно). Статистичка значајност тестирана је тестом Mann-Whitney Rank Sum.

Код оболелих са мање израженом ткивном диференцијацијом, детектовали смо значајно веће вредности фецесног Gal-1 (умерна+одсутна vs. изражена: $19353,69 \pm 2224,35$ vs. $12757,56 \pm 1207,58$ pg/ml; $p=0.026$) и системског односа Gal-1/TNF- α (умерна+одсутна vs. изражена: $503,57 \pm 100,01$ vs. $69,73 \pm 11,61$; $p=0.042$; Фигура 4).



Фигура 4. Повећана концентрација Gal-1 у фецесу и однос Gal-1/TNF- α у серуму пацијената са мањом хистолошком диференцијацијом CRC. Пацијенти са CRC су подељени у две групе, према хистолошкој диференцијацији (добро и умерено + сиромашно). Статистичка значајност је тестирана помоћу Mann-Whitney Rank Sum-теста или независног т-теста узорака.

Серумске и фецесне вредности Gal-3, Gal-3/TNF- α и Gal-1/TNF- α корелирају са TNM стадијумом и инвазијом лимфних и крвних судова

Пацијенти са CRC су подељени у две категорије на основу TNM стадијума болести: I+II и III+IV. Анализом концентрација испитиваних биомаркера у серуму болесника са CRC-ом у односу на TNM стадијум тумора, нисмо пронашли статистички значајну разлику концентрација наведених биомаркера у односу на различити TNM стадијум тумора (Табела 10).

Табела 10. Концентрација испитиваних биомаркера у серуму болесника са CRC-ом у односу на TNM стадијум тумора

Концентрација цитокина (pg/ml)	TNM стадијум		p
	I + II	III + IV	
IL-17	74,18 \pm 15,02	70,10 \pm 9,04	p>0.05
IL-33	81,68 \pm 70,03	58,67 \pm 42,48	p>0.05
sST2	880,57 \pm 544,70	1092,54 \pm 780,74	p>0.05
IL-4	698,11 \pm 109,02	705,04 \pm 149,31	p>0.05
IL-6	8,71 \pm 7,32	7,75 \pm 2,01	p>0.05
IL-1 β	12,07 \pm 9,04	9,01 \pm 4,00	p>0.05
IFN- γ	184,41 \pm 128,40	194,40 \pm 101,52	p>0.05
IL-10	4,38 \pm 2,32	4,34 \pm 1,18	p>0.05
IL-12	126,40 \pm 32,87	141,01 \pm 40,63	p>0.05
IL-13	393,86 \pm 111,16	379,64 \pm 64,29	p>0.05

Анализа обухвата 60 испитаника са CRC-ом, који су подељени на две групе: TNM I и II (n=32), TNM III и IV (n=28). Анализирани су серумске концентрације испитиваних биомаркера и упоређене између дефинисаних група. Статистичка значајност је тестирана Mann-Whitney-евим тестом. Вредности су приказане као средње вредности \pm стандардна девијација.

Анализом концентрација испитиваних биомаркера у фецесу болесника са CRC-ом у односу на TNM стадијум тумора, нисмо пронашли статистички значајну разлику концентрација наведених биомаркера у односу на различити TNM стадијум тумора (Табела 11).

Табела 11. Концентрација испитиваних биомаркера у фецесу болесника са CRC-ом у односу на TNM стадијум тумора

Концентрација цитокина (pg/ml)	TNM стадијум		p
	I + II	III + IV	
IL-17	354,27±233,97	485,56±403,00	p>0.05
IL-33	320,29±140,20	415,61±344,80	p>0.05
sST2	701,69±421,82	931,90±869,71	p>0.05
IL-4	2156,14±1104,43	2779,01±1799,31	p>0.05
IL-6	39,89±24,53	50,47±33,44	p>0.05
IL-1β	1205,06±1287,13	3050,84±7255,22	p>0.05
IFN-γ	1455,49±840,06	2063,16±2519,74	p>0.05
IL-10	25,18±26,62	21,68±17,62	p>0.05
IL-12	408,99±354,22	434,38±216,09	p>0.05
IL-13	1452,77±1566,82	713,51±719,54	p>0.05

Анализа обухвата 60 испитаника са CRC-ом, који су подељени на две групе: TNM I и II (n=32), TNM III и IV (n=28). Анализирани су фецесне концентрације испитиваних биомаркера и упоређене између дефинисаних група. Статистичка значајност је тестирана Mann-Whitney-евим тестом. Вредности су приказане као средње вредности ± стандардна девијација.

Анализом односа концентрација испитиваних биомаркера у серуму болесника са CRC-ом у односу на TNM стадијум тумора, нисмо пронашли статистички значајну разлику односа концентрација наведених биомаркера у односу на различити TNM стадијум тумора (Табела 12).

Табела 12. Односи концентрација испитиваних биомаркера у серуму болесника са CRC-ом у односу на TNM стадијум тумора

Односи цитокина	TNM стадијум		p
	I + II	III + IV	
TGF- β /IL-12	10,13 \pm 5,03	9,41 \pm 5,71	p>0.05
TGF- β /TNF- α	4,03 \pm 2,53	5,48 \pm 2,71	p>0.05
TGF- β /IL-1 β	138,44 \pm 91,19	144,54 \pm 63,33	p>0.05
TGF- β /IL-17	16,59 \pm 7,61	16,83 \pm 6,96	p>0.05
TGF- β /IFN- γ	10,56 \pm 8,59	7,76 \pm 4,89	p>0.05
IL-10/TNF- α	1,93 \pm 5,58	0,59 \pm 1,05	p>0.05
IL-10/IL-1 β	0,42 \pm 0,16	0,53 \pm 0,16	p>0.05
IFN- γ /IL-10	42,56 \pm 18,23	43,22 \pm 16,74	p>0.05
IL-17/IL-10	19,25 \pm 5,35	17,20 \pm 4,80	p>0.05
sST2/IL-33	16,24 \pm 13,00	23,94 \pm 17,38	p>0.05

Анализа обухвата 60 испитаника са CRC-ом, који су подељени на две групе: Изражена диференцијација, умерена + одсутна диференцијација. Анализирани су односи серумских концентрација испитиваних биомаркера и упоређене између дефинисаних група. Статистичка значајност је тестирана Mann-Whitney-евим тестом. Вредности су приказане као средње вредности \pm стандардна девијација.

Анализом односа концентрација испитиваних биомаркера у фецесу болесника са CRC-ом у односу на TNM стадијум тумора, показано је да је однос концентрација TGF- β /IFN- γ статистички значајно већи у групи болесника са TNM стадијумом III+IV у односу на групу болесника са TNM стадијумом I+II (Табела 13).

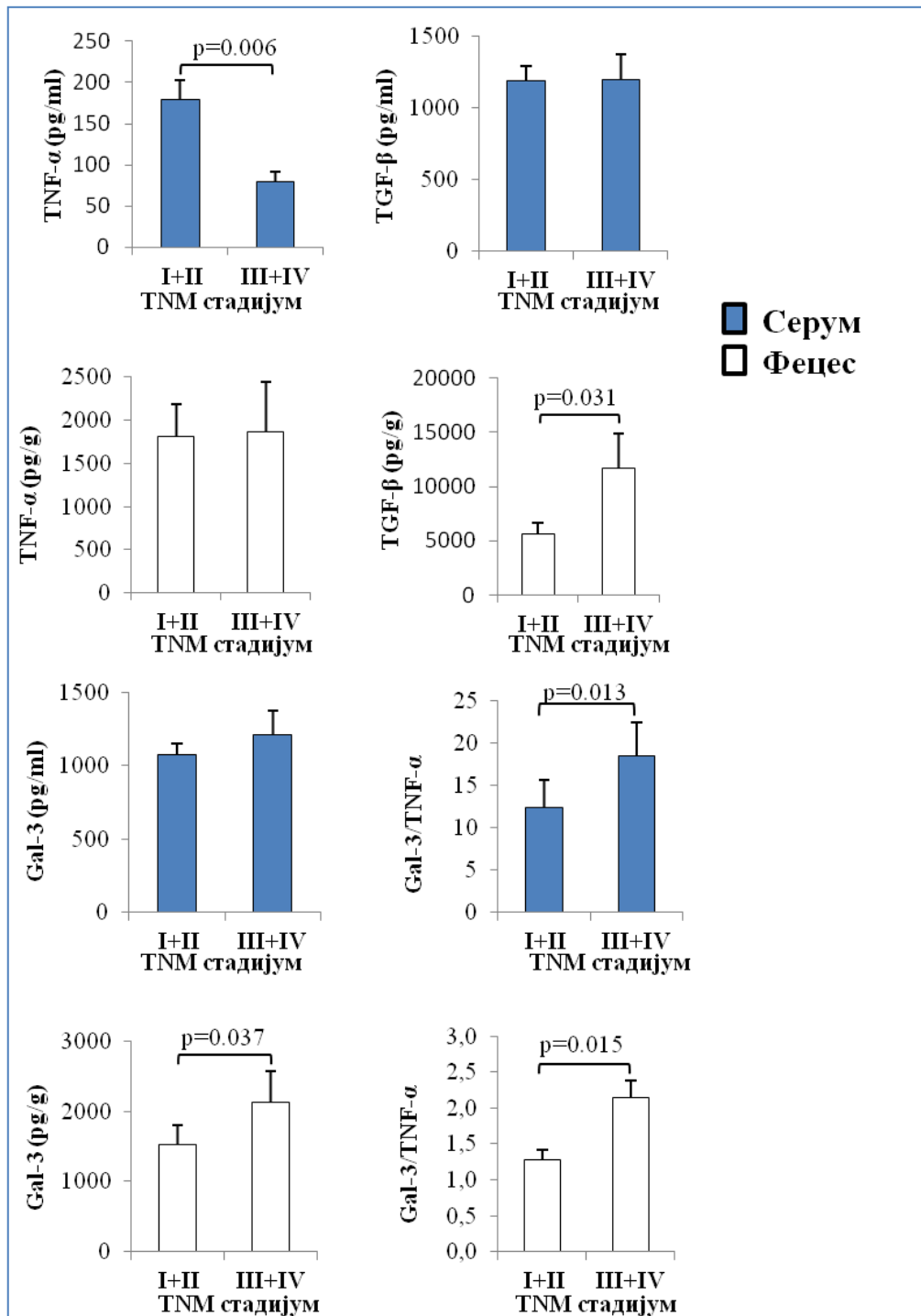
Табела 13. Односи концентрација испитиваних биомаркера у фецесу болесника са CRC-ом у односу на TNM стадијум тумора

Односи цитокина	TNM стадијум		p
	I + II	III + IV	
TGF- β /IL-12	24,22 \pm 34,67	27,49 \pm 22,96	p>0.05
TGF- β /TNF- α	5,55 \pm 6,81	10,64 \pm 10,78	p>0.05
TGF- β /IL-1 β	23,32 \pm 32,65	25,24 \pm 34,07	p>0.05
TGF- β /IL-17	2,59 \pm 2,61	2,83 \pm 2,96	p>0.05
TGF- β /IFN- γ	4,09\pm3,66	7,20\pm5,42	p=0.04
TNF- α /IL-10	77,59 \pm 27,84	77,82 \pm 33,16	p>0.05
IL-1 β /IL-10	104,38 \pm 148,45	100,68 \pm 107,63	p>0.05
IFN- γ /IL-10	99,46 \pm 58,48	91,08 \pm 36,11	p>0.05
IL-17/IL-10	25,16 \pm 19,79	25,19 \pm 9,96	p>0.05
sST2/IL-33	2,42 \pm 1,56	2,23 \pm 0,73	p>0.05

Анализа обухвата 60 испитаника са CRC-ом, који су подељени на две групе: Изражена диференцијација, умерена + одсутна диференцијација. Анализирани су односи фецесних концентрација испитиваних биомаркера и упоређене између дефинисаних група. Статистичка значајност је тестирана Манн-Whitney-евим тестом. Вредности су приказане као средње вредности \pm стандардна девијација.

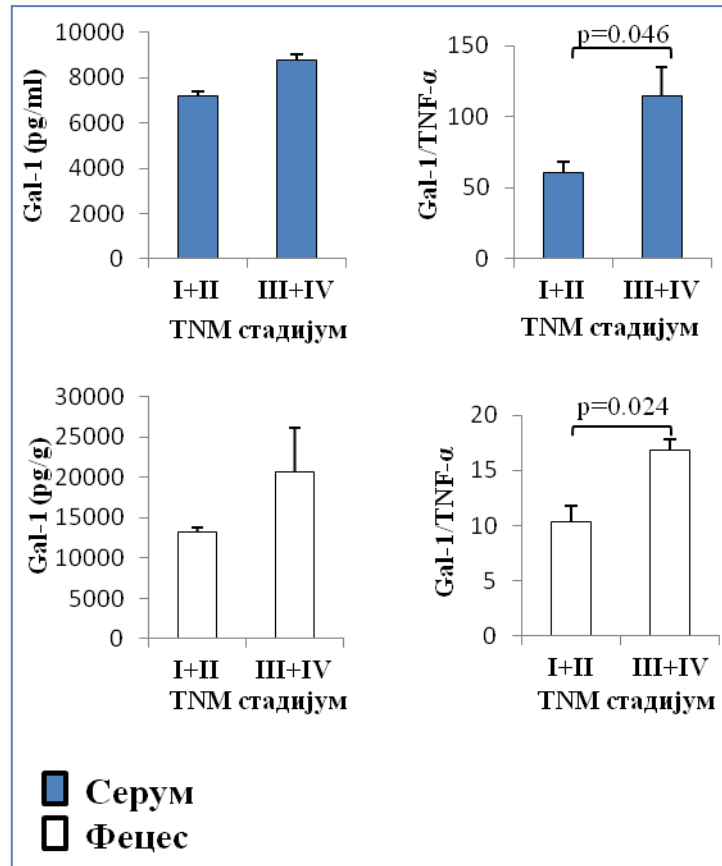
Пацијенти са TNM стадијумима III+IV су имали знатно нижи TNF- α у серуму у поређењу са пацијентима са TNM стадијумима I+II (p=0,006, Фигура 5). Није било разлика у серумском нивоу TGF- β и Gal-3. Однос Gal-3/TNF- α био је већи у серуму пацијената са TNM стадијумима III+IV, али ова разлика није досегла статистичку значајност. Као што је приказано на Фигури 5, пацијенти са CRC-ом са већим TNM стадијумом имају већи фекални ниво TGF- β (p=0.031). Није било разлика у фекалном нивоу TNF- α између дефинисаних група. Приметили смо већи фекални ниво Gal-3

($p=0.037$), као и Gal-3/TNF- α однос ($p=0.015$) код пацијената са TNM стадијумима III+IV.



Фигура 5. Повећана концентрација TGF- β , Gal-3 и Gal-3/TNF- α односа у фецесу код пацијената са већом TNM стадијумом CRC-а. Пацијенти са CRC-ом су подељени у две групе, на основу TNM стадијума (I + II и III + IV). Серумски и фецесни ниво свих поменутих биомаркера одређени су ELISA-ом. Однос Gal-3/TNF- α је процењен за сваког пацијента, посебно.

Оболели у TNM стадијуму III+IV имају значајно веће вредности односа Gal-1/TNF- α у серуму ($115,03 \pm 20,10$ vs. $60,51 \pm 7,95$; $p=0.046$) и фецесу ($16,84 \pm 0,92$ vs. $10,36 \pm 1,36$; $p=0.024$; Фигура 6).



Фигура 6. Повећана вредност Gal-1 /TNF- α односа у серуму и фецесу пацијената са већом TNM стадијумом CRC-а. Пацијенти са CRC-ом су подељени у две групе, на основу TNM стадијума (I + II и III + IV). Серумски и фецесни ниво свих поменутих биомаркера одређени су ELISA. Однос Gal-1 / TNF- α је процењен за сваког пацијента, посебно.

Даље, поделили смо пацијенте на основу инвазије лимфних судова (+ и -) и анализирали нивое биомаркера у серуму и фецесу. Анализом концентрација испитиваних биомаркера у серуму болесника са CRC-ом у односу на инвазију лимфних судова, нисмо пронашли статистички значајну разлику концентрација наведених биомаркера у односу на инвазију лимфних судова (Табела 14).

Табела 14. Концентрација испитиваних биомаркера у серуму болесника са CRC-ом у односу на инвазију лимфних судова

Концентрација цитокина (pg/ml)	Инвазија лимфних судова		p
	+	-	
IL-17	71,62±6,92	73,72±15,20	p>0.05
IL-33	73,38±46,96	77,09±70,50	p>0.05
sST2	1172,05±537,70	881,89±650,22	p>0.05
IL-4	663,61±122,88	714,81±118,67	p>0.05
IL-6	7,63±1,78	8,69±7,11	p>0.05
IL-1β	10,60±3,82	11,50±9,05	p>0.05
TGF-β	1280,92±566,98	1156,95±506,08	p>0.05
IFN-γ	209,52±61,18	192,68±132,10	p>0.05
IL-10	4,75±0,76	4,29±2,30	p>0.05
IL-12	129,46±22,92	130,44±38,10	p>0.05
IL-13	386,15±76,77	400,36±108,67	p>0.05

Анализа обухвата 60 испитаника са CRC-ом, који су подељени на две групе: присутна инвазија лимфних судова (+), одсутна инвазија лимфних судова (-). Анализиране су серумске концентрације испитиваних биомаркера и упоређене између дефинисаних група. Статистичка значајност је тестирана Mann-Whitney-евим тестом. Вредности су приказане као средње вредности ± стандардна девијација.

Анализом концентрација испитиваних биомаркера у фецесу болесника са CRC-ом у односу на инвазију лимфних судова, показано је да је концентрација IL-17 статистички значајно већа у групи болесника са присутном инвазијом лимфних судова у односу на групу болесника без инвазије лимфних судова (Табела 15).

Табела 15. Концентрација испитиваних биомаркера у фецесу болесника са CRC-ом у односу на инвазију лимфних судова

Концентрација цитокина (pg/ml)	Инвазија лимфних судова		p
	+	-	
IL-17	578,72±492,65	361,29±15,20	p=0.032
IL-33	451,82±434,02	324,29±137,14	p>0.05
sST2	1084,00±1079,63	722,16±398,55	p>0.05
IL-4	3109,02±2226,33	2212,18±1013,61	p>0.05
IL-6	56,07±41,70	40,91±22,70	p>0.05
IL-1β	4402,65±9036,16	1165,72±1252,91	p>0.05
TGF-β	6381,56±3048,19	7730,46±8768,32	p>0.05
IFN-γ	2292,07±3215,07	1515,96±796,33	p>0.05
IL-10	23,39±21,86	25,61±25,38	p>0.05
IL-12	442,58±257,37	412,99±342,13	p>0.05
IL-13	829,18±756,64	1404,78±1535,38	p>0.05

Анализа обухвата 60 испитаника са CRC-ом, који су подељени на две групе: присутна инвазија лимфних судова (+), одсутна инвазија лимфних судова (-). Анализиране су фецесне концентрације испитиваних биомаркера и упоређене између дефинисаних група. Статистичка значајност је тестирана Манн-Whitney-евим тестом. Вредности су приказане као средње вредности ± стандардна девијација.

Анализом односа концентрација испитиваних биомаркера у серуму болесника са CRC-ом у односу на инвазију лимфних судова, нисмо пронашли статистички значајну разлику односа концентрација наведених биомаркера у односу на инвазију лимфних судова.

Табела 16. Односи концентрација испитиваних биомаркера у серуму болесника са CRC-ом у односу на инвазију лимфних судова

Однос концентрација цитокина	Инвазија лимфних судова		p
	+	-	
TGF- β /IL-12	28,83 \pm 19,11	27,94 \pm 17,38	p>0.05
TGF- β /TNF- α	21,84 \pm 13,21	15,27 \pm 21,80	p>0.05
TGF- β /IL-1 β	131,29 \pm 73,55	141,48 \pm 89,13	p>0.05
TGF- β /IL-17	17,70 \pm 7,91	16,14 \pm 7,44	p>0.05
TGF- β /IFN- γ	6,88 \pm 4,43	9,83 \pm 8,36	p>0.05
IL-10/TNF- α	0,73 \pm 1,32	1,82 \pm 5,40	p>0.05
IL-10/IL-1 β	0,50 \pm 0,18	0,45 \pm 0,17	p>0.05
IFN- γ /IL-10	43,55 \pm 8,48	44,93 \pm 19,16	p>0.05
IL-17/IL-10	15,59 \pm 3,97	19,54 \pm 5,35	p>0.05
sST2/IL-33	23,00 \pm 16,77	17,29 \pm 14,45	p>0.05

Анализа обухвата 60 испитаника са CRC-ом, који су подељени на две групе: присутна инвазија лимфних судова (+), одсутна инвазија лимфних судова (-). Анализирани су односи серумских концентрација испитиваних биомаркера и упоређене између дефинисаних група. Статистичка значајност је тестирана Mann-Whitney-евим тестом. Вредности су приказане као средње вредности \pm стандардна девијација.

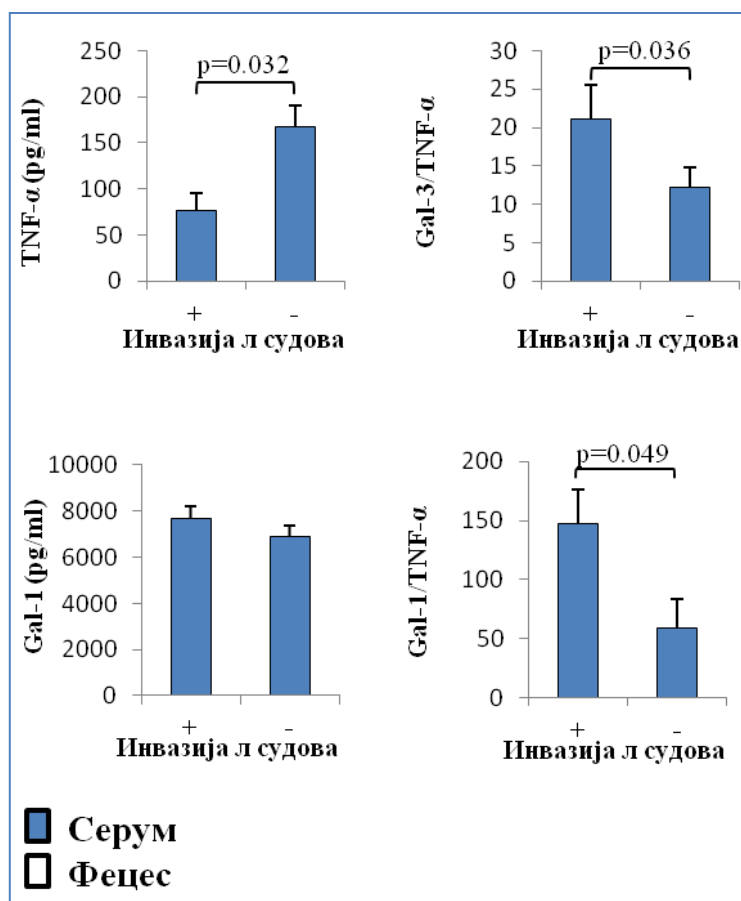
Анализом односа концентрација испитиваних биомаркера у фецесу болесника са CRC-ом у односу на инвазију лимфних судова, нисмо пронашли статистички значајну разлику концентрација наведених биомаркера у односу на инвазију лимфних судова.

Табела 17. Односи концентрација испитиваних биомаркера у фецесу болесника са CRC-ом у односу на инвазију лимфних судова

Однос концентрација цитокина	Инвазија лимфних судова		p
	+	-	
TGF- β /IL-12	16,32 \pm 7,79	27,87 \pm 35,40	p>0.05
TGF- β /TNF- α	4,62 \pm 2,79	7,41 \pm 9,38	p>0.05
TGF- β /IL-1 β	6,67 \pm 6,49	28,32 \pm 35,79	p>0.05
TGF- β /IL-17	1,70 \pm 0,91	1,14 \pm 1,44	p>0.05
TGF- β /IFN- γ	4,52 \pm 2,09	5,11 \pm 4,94	p>0.05
IL-10/TNF- α	88,83 \pm 32,41	76,14 \pm 27,80	p>0.05
IL-10/IL-1 β	117,87 \pm 111,30	101,43 \pm 147,57	p>0.05
IFN- γ /IL-10	83,95 \pm 29,34	95,51 \pm 54,45	p>0.05
IL-17/IL-10	27,13 \pm 6,86	24,40 \pm 19,58	p>0.05
sST2/IL-33	2,37 \pm 0,73	2,48 \pm 1,50	p>0.05

Анализа обухвата 60 испитаника са CRC-ом, који су подељени на две групе: присутна инвазија лимфних судова (+), одсутна инвазија лимфних судова (-). Анализирани су односи фецесних концентрација испитиваних биомаркера и упоређене између дефинисаних група. Статистичка значајност је тестирана Mann-Whitney-евим тестом. Вредности су приказане као средње вредности \pm стандардна девијација.

TNF- α је значајно снижен у серуму оболелих са детектабилном инвазијом лимфних судова ($p=0.032$; Фигура 7). Такође, регистрован је и повећан однос Gal-3/TNF- α у серуму пацијената са лимфном инвазијом ($p=0.036$). Повећан однос Gal-1/TNF- α у серуму детектован је у пацијената са инвазијом лимфних судова ($146,95 \pm 28,91$ vs. $58,53 \pm 24,87$; $p=0.049$).



Фигура 7. Смањен TNF- α и повећани односи Gal-3/TNF- α и Gal-1/TNF- α у серуму пацијената са детектабилном инвазијом лимфних судова. Пацијенти са CRC-ом су подељени у две групе, на основу присуства инвазије лимфних судова (+ и -). Серумски нивои свих поменутих биомаркера одређени су ELISA-ом. Односи Gal-3/TNF- α и Gal-1/TNF- α одређивани су за сваког пацијента, посебно. Статистичка значајност је тестирана помоћу Mann-Whitney Rank Sum-теста или независног T-теста узорака.

Даље, поделили смо пацијенте на основу инвазије крвних судова (+ и -) и анализирали нивое биомаркера у серуму и фецесу. Анализом концентрација испитиваних биомаркера у серуму болесника са CRC-ом у односу на инвазију крвних судова, показано је да је концентрација IL-10 статистички значајно већа у групи болесника са присутном инвазијом крвних судова у односу на групу болесника без инвазије крвних судова (Табела 18).

Табела 18. Концентрација испитиваних биомаркера у серуму болесника са CRC-ом у односу на инвазију крвних судова

Концентрација цитокина (pg/ml)	Инвазија крвних судова		p
	+	-	
IL-17	71,62±6,92	73,48±15,41	p>0.05
IL-33	73,38±46,96	78,78±71,20	p>0.05
sST2	1172,05±537,70	857,69±647,84	p>0.05
IL-4	663,61±122,88	720,20±116,97	p>0.05
IL-6	7,63±1,78	8,73±7,23	p>0.05
IL-1β	10,60±3,82	11,65±9,17	p>0.05
TGF-β	1280,92±566,98	1143,98±509,94	p>0.05
IFN-γ	209,52±61,18	196,25±132,97	p>0.05
IL-10	4,75±0,76	4,24±2,32	p=0.049
IL-12	129,46±22,92	130,32±38,77	p>0.05
IL-13	386,15±76,77	392,00±100,29	p>0.05

Анализа обухвата 60 испитаника са CRC-ом, који су подељени на две групе: присутна инвазија крвних судова (+), одсутна инвазија крвних судова (-). Анализиране су серумске концентрације испитиваних биомаркера и упоређене између дефинисаних група. Статистичка значајност је тестирана Манн-Whitney-евим тестом. Вредности су приказане као средње вредности ± стандардна девијација.

Анализом концентрација испитиваних биомаркера у фецесу болесника са CRC-ом у односу на инвазију крвних судова, показано је да је концентрација IL-17 статистички значајно већа у групи болесника са присутном инвазијом крвних судова у односу на групу болесника без инвазије крвних судова.

Табела 19. Концентрација испитиваних биомаркера у фецесу болесника са CRC-ом у односу на инвазију крвних судова

Концентрација цитокина (pg/ml)	Инвазија крвних судова		p
	+	-	
IL-17	578,72±492,65	364,74±220,56	p=0.040
IL-33	451,82±434,02	328,09±137,94	p>0.05
sST2	1084,00±1079,63	729,23±403,69	p>0.05
IL-4	3109,02±2226,33	2222,77±1029,87	p>0.05
IL-6	56,07±41,70	40,96±23,10	p>0.05
IL-1β	4402,65±9036,16	1184,16±1270,93	p>0.05
TGF-β	6381,56±3048,19	7814,55±8911,20	p>0.05
IFN-γ	2292,07±3215,07	1531,22±805,94	p>0.05
IL-10	23,39±21,86	26,16±25,65	p>0.05
IL-12	442,58±257,37	418,08±347,03	p>0.05
IL-13	829,18±756,64	1440,43±1549,87	p>0.05

Анализа обухвата 60 испитаника са CRC-ом, који су подељени на две групе: присутна инвазија крвних судова (+), одсутна инвазија крвних судова (-). Анализиране су фецесне концентрације испитиваних биомаркера и упоређене између дефинисаних група. Статистичка значајност је тестирана Манн-Whitney-евим тестом. Вредности су приказане као средње вредности ± стандардна девијација.

Колоректални карцином: Значај концентрација цитокина у серуму и фецесу за процену тежине болести

Анализом односа концентрација испитиваних биомаркера у серуму болесника са CRC-ом у односу на инвазију крвних судова, показано је да је однос концентрација IL-17/IL-10 статистички значајно већи у групи болесника без инвазије крвних судова у односу на групу болесника са присутном инвазијом крвних судова (Табела 20).

Табела 20. Односи концентрација испитиваних биомаркера у серуму болесника са CRC-ом у односу на инвазију крвних судова

Однос концентрација цитокина	Инвазија крвних судова		p
	+	-	
TGF- β /IL-12	28,83 \pm 19,11	27,88 \pm 17,69	p>0.05
TGF- β /TNF- α	21,84 \pm 13,21	14,96 \pm 22,11	p>0.05
TGF- β /IL-1 β	131,29 \pm 73,55	139,12 \pm 89,74	p>0.05
TGF- β /IL-17	17,70 \pm 7,91	16,04 \pm 7,55	p>0.05
TGF- β /IFN- γ	6,88 \pm 4,43	9,58 \pm 8,39	p>0.05
IL-10/TNF- α	0,73 \pm 1,32	1,87 \pm 5,49	p>0.05
IL-10/IL-1 β	0,50 \pm 0,18	0,43 \pm 0,16	p>0.05
IFN- γ /IL-10	43,55 \pm 8,48	45,95 \pm 18,65	p>0.05
IL-17/IL-10	15,59\pm3,97	19,73\pm5,34	p=0.049
sST2/IL-33	23,00 \pm 16,77	15,95 \pm 12,64	p>0.05

Анализа обухвата 60 испитаника са CRC-ом, који су подељени на две групе: присутна инвазија крвних судова (+), одсутна инвазија крвних судова (-). Анализирани су односи серумских концентрација испитиваних биомаркера и упоређене између дефинисаних група. Статистичка значајност је тестирана Mann-Whitney-евим тестом. Вредности су приказане као средње вредности \pm стандардна девијација.

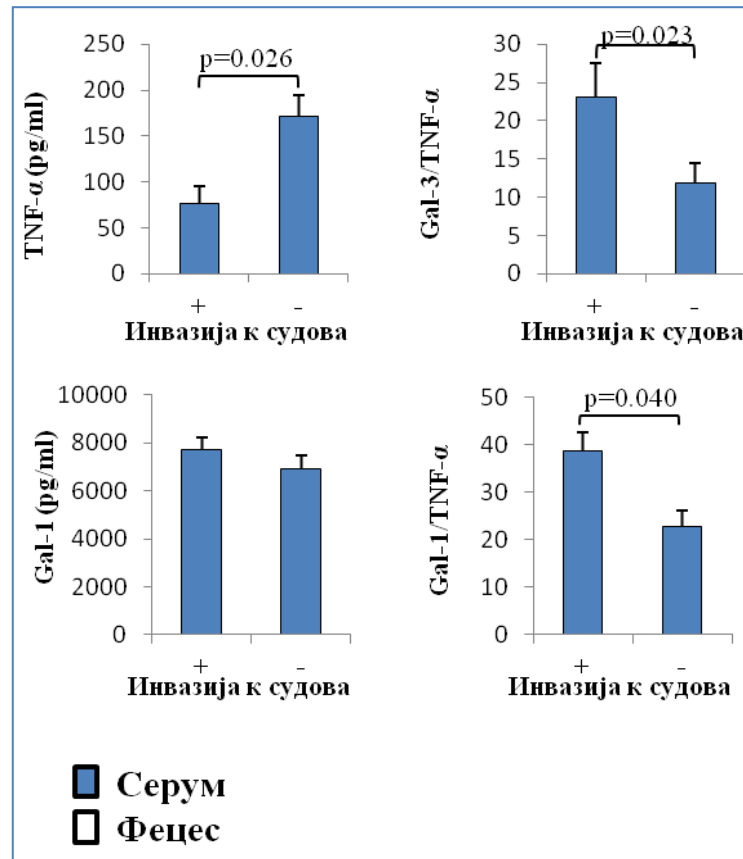
Анализом односа концентрација испитиваних биомаркера у фецесу болесника са CRC-ом у односу на инвазију крвних судова, нисмо пронашли статистички значајну разлику односа концентрација наведених биомаркера у односу на инвазију крвних судова (Табела 21).

Табела 21. Односи концентрација испитиваних биомаркера у фецесу болесника са CRC-ом у односу на инвазију крвних судова

Однос концентрација цитокина	Инвазија крвних судова		p
	+	-	
TGF- β /IL-12	16,32 \pm 7,79	28,14 \pm 35,99	p>0.05
TGF- β /TNF- α	4,62 \pm 2,79	7,35 \pm 9,54	p>0.05
TGF- β /IL-1 β	6,67 \pm 6,49	29,01 \pm 36,22	p>0.05
TGF- β /IL-17	1,70 \pm 0,91	1,43 \pm 1,74	p>0.05
TGF- β /IFN- γ	4,52 \pm 2,09	5,12 \pm 5,03	p>0.05
TNF- α /IL-10	88,83 \pm 32,41	76,69 \pm 28,12	p>0.05
IL-1 β /IL-10	117,87 \pm 111,30	102,66 \pm 150,03	p>0.05
IFN- γ /IL-10	83,95 \pm 29,34	94,95 \pm 55,32	p>0.05
IL-17/IL-10	27,13 \pm 6,86	24,30 \pm 19,92	p>0.05
sST2/IL-33	2,37 \pm 0,73	2,48 \pm 1,53	p>0.05

Анализа обухвата 60 испитаника са CRC-ом, који су подељени на две групе: присутна инвазија крвних судова (+), одсутна инвазија крвних судова (-). Анализирани су односи фецесних концентрација испитиваних биомаркера и упоређене између дефинисаних група. Статистичка значајност је тестирана Mann-Whitney-евим тестом. Вредности су приказане као средње вредности \pm стандардна девијација.

TNF- α је значајно снижен у серуму оболелих са детектабилном инвазијом крвних судова ($p=0.026$; Фигура 8). Такође, регистрован је и повећан однос Gal-3/TNF- α у серуму пацијената са васкуларном инвазијом ($p=0.023$). Повећан однос Gal-1/TNF- α у серуму детектован је у пацијената са инвазијом крвних судова ($38,62 \pm 4,01$ vs. $22,82 \pm 3,25$; $p=0.040$; Фигура 8).



Фигура 8. Смањен TNF- α и повећани односи Gal-3/TNF- α и Gal-1/TNF- α у серуму пацијената са детектабилном инвазијом крвних судова. Пацијенти са CRC-ом су подељени у две групе, на основу присуства инвазије крвних судова (+ и -). Серумски нивои свих поменутих биомаркера одређени су ELISA-ом. Односи Gal-3/TNF- α и Gal-1/TNF- α одређивани су за сваког пацијента, посебно. Статистичка значајност је тестирана помоћу Mann-Whitney Rank Sum-теста или независног T-теста узорака.

Присуство метастаза у јетри, плућима и перитонеалне карциноматозе прате веће вредности Gal-3 и односа Gal-1/TNF- α

У наставку студије, болеснике са CRC-ом смо поделили на две групе, у односу на присуство метастаза у јетри и анализирали вредности Gal-1, Gal-3 и других медијатора од интереса. Анализом концентрација испитиваних биомаркера у серуму болесника са CRC-ом у односу на присуство метастаза у јетри, показано је да је концентрација IL-4 статистички значајно већа у групи болесника без присутних метастаза у јетри у односу на групу болесника са присутним метастазама у јетри. Док је концентрација IL-10 статистички значајно већа у групи болесника са присутним метастазама у јетри у односу на групу болесника без присутних метастаза у јетри (Табела 22).

Табела 22. Концентрација испитиваних биомаркера у серуму болесника са CRC-ом у односу на присуство метастаза у јетри

Концентрација цитокина (pg/ml)	Метастазе у јетри		p
	+	-	
IL-17	73,64±6,59	73,30±14,20	p>0.05
IL-33	81,00±51,79	77,20±66,32	p>0.05
sST2	984,10±588,83	888,82±611,68	p>0.05
IL-4	598,05±71,02	705,24±121,05	p=0.007
IL-6	12,01±13,73	8,46±6,51	p>0.05
TGF- β	1151,21±530,66	1161,05±503,89	p>0.05
IFN- γ	148,80±57,47	188,57±124,80	p>0.05
IL-10	4,64±0,75	4,27±2,11	p=0.041
IL-12	130,47±18,62	130,34±36,64	p>0.05
IL-13	424,92±89,55	399,33±105,12	p>0.05

Анализа обухвата 60 испитаника са CRC-ом, који су подељени на две групе: присутне метастазе у јетри (+), нема детектабилних метастаза у јетри (-). Анализиране су серумске концентрације испитиваних биомаркера и упоређене између дефинисаних група. Статистичка значајност је тестирана Mann-Whitney-евим тестом. Вредности су приказане као средње вредности \pm стандардна девијација.

Анализом концентрација испитиваних биомаркера у фецесу болесника са CRC-ом у односу на присуство метастаза у јетри, показано је да је концентрација IL-17 статистички значајно већа у групи болесника са присутним метастазама у јетри у односу на групу болесника без присутних метастаза у јетри.

Табела 23. Концентрација испитиваних биомаркера у фецесу болесника са CRC-ом у односу на присуство метастаза у јетри

Концентрација цитокина (pg/ml)	Метастазе у јетри		p
	+	-	
IL-17	508,78±275,75	384,41±305,54	p=0.013
IL-33	378,13±211,42	344,66±226,99	p>0.05
sST2	788,46±524,41	767,24±607,56	p>0.05
IL-4	2820,58±1166,73	2286,10±1403,20	p>0.05
IL-6	50,08±17,80	42,19±28,62	p>0.05
TGF-β	6309,95±3570,85	7196,61±8212,94	p>0.05
IFN-γ	1472,45±738,68	1659,39±1555,16	p>0.05
IL-10	19,72±9,34	24,90±25,06	p>0.05
IL-12	603,66±429,01	417,56±333,78	p>0.05
IL-13	892,78±826,24	1316,21±1445,98	p>0.05

Анализа обухвата 60 испитаника са CRC-ом, који су подељени на две групе: присутне метастазе у јетри (+), нема детектабилних метастаза у јетри (-). Анализиране су фецесне концентрације испитиваних биомаркера и упоређене између дефинисаних група. Статистичка значајност је тестирана Манн-Витнеи-евим тестом. Вредности су приказане као средње вредности ± стандардна девијација.

Анализом односа концентрација испитиваних биомаркера у серуму болесника са CRC-ом у односу на присуство метастаза у јетри, показано је да је однос концентрације TGF- β /TNF- α статистички значајно већи у групи болесника са присутним метастазама у јетри у односу на групу болесника без присутних метастаза у јетри. Док је однос концентрација IL-10/TNF- α статистички значајно већи у групи болесника без присутних метастаза у јетри у односу на групу болесника са присутним метастазама у јетри.

Табела 24. Односи концентрација испитиваних биомаркера у серуму болесника са CRC-ом у односу на присуство метастаза у јетри

Однос концентрација цитокина	Метастазе у јетри		p
	+	-	
TGF- β /IL-12	23,59 \pm 11,34	27,98 \pm 17,79	p>0.05
TGF- β /TNF- α	80,61\pm116,94	15,22\pm20,34	p=0.004
TGF- β /IL-1 β	122,64 \pm 59,50	135,96 \pm 85,20	p>0.05
TGF- β /IL-17	15,69 \pm 7,40	16,17 \pm 7,32	p>0.05
TGF- β /IFN- γ	9,81 \pm 6,73	9,70 \pm 8,02	p>0.05
IL-10/TNF- α	0,48\pm0,99	1,59\pm4,95	p=0.015
IL-10/IL-1 β	0,51 \pm 0,13	0,44 \pm 0,17	p>0.05
IFN- γ /IL-10	32,77 \pm 13,18	43,97 \pm 18,44	p>0.05
IL-17/IL-10	16,41 \pm 3,70	19,20 \pm 5,11	p>0.05
sST2/IL-33	20,77 \pm 17,48	16,76 \pm 13,59	p>0.05

Анализа обухвата 60 испитаника са CRC-ом, који су подељени на две групе: присутне метастазе у јетри (+), нема детектабилних метастаза у јетри (-). Анализирани су односи серумских концентрација испитиваних биомаркера и упоређене између дефинисаних група. Статистичка значајност је тестирана Mann-Whitney-евим тестом. Вредности су приказане као средње вредности \pm стандардна девијација.

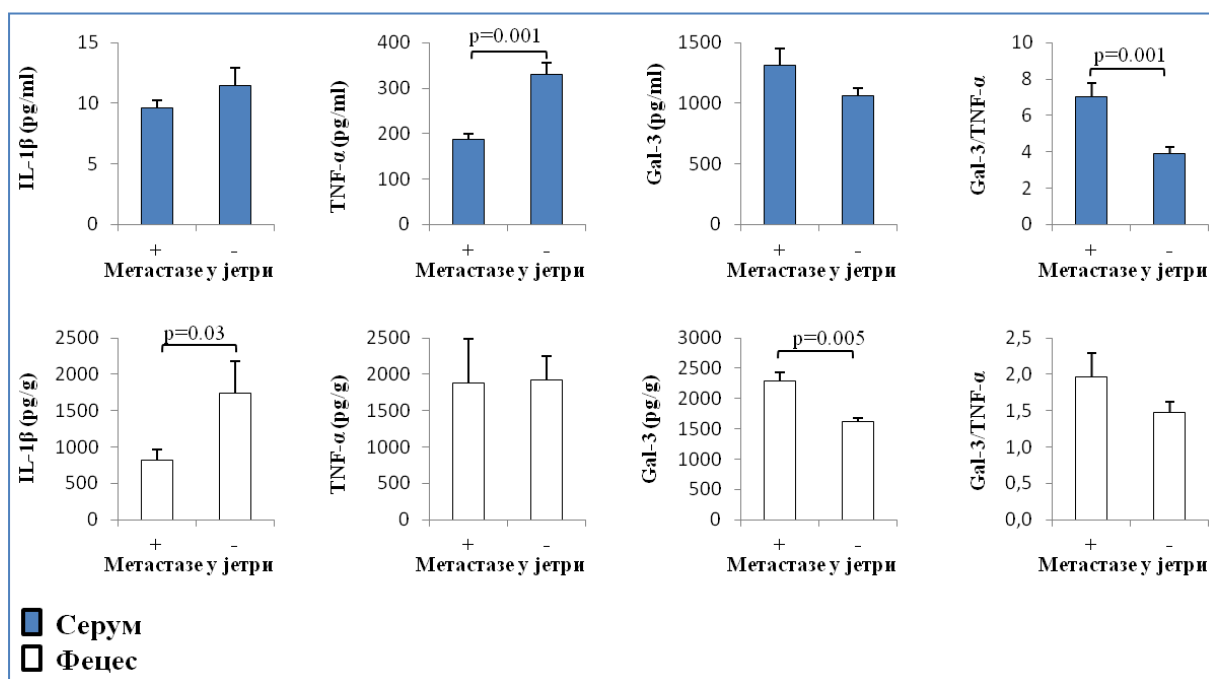
Анализом односа концентрација испитиваних биомаркера у фецесу болесника са CRC-ом у односу на присуство метастаза у јетри, нисмо пронашли статистички значајну разлику односа концентрација наведених биомаркера у односу на присуство метастаза у јетри.

Табела 25. Односи концентрација испитиваних биомаркера у фецесу болесника са CRC-ом у односу на присуство метастаза у јетри

Однос концентрација цитокина	Метастазе у јетри		p
	+	-	
TGF- β /IL-12	12,78 \pm 7,86	25,30 \pm 32,89	p>0.05
TGF- β /TNF- α	5,32 \pm 3,72	6,87 \pm 8,71	p>0.05
TGF- β /IL-1 β	12,78 \pm 18,23	25,37 \pm 33,51	p>0.05
TGF- β /IL-17	1,27 \pm 0,91	1,75 \pm 1,52	p>0.05
TGF- β /IFN- γ	4,29 \pm 1,69	4,75 \pm 4,62	p>0.05
TNF- α /IL-10	86,59 \pm 45,05	78,21 \pm 30,27	p>0.05
IL-1 β /IL-10	61,43 \pm 49,50	101,48 \pm 142,89	p>0.05
IFN- γ /IL-10	84,73 \pm 40,17	97,79 \pm 54,26	p>0.05
IL-17/IL-10	28,49 \pm 11,26	24,49 \pm 18,13	p>0.05
sST2/IL-33	2,03 \pm 0,60	2,39 \pm 1,43	p>0.05

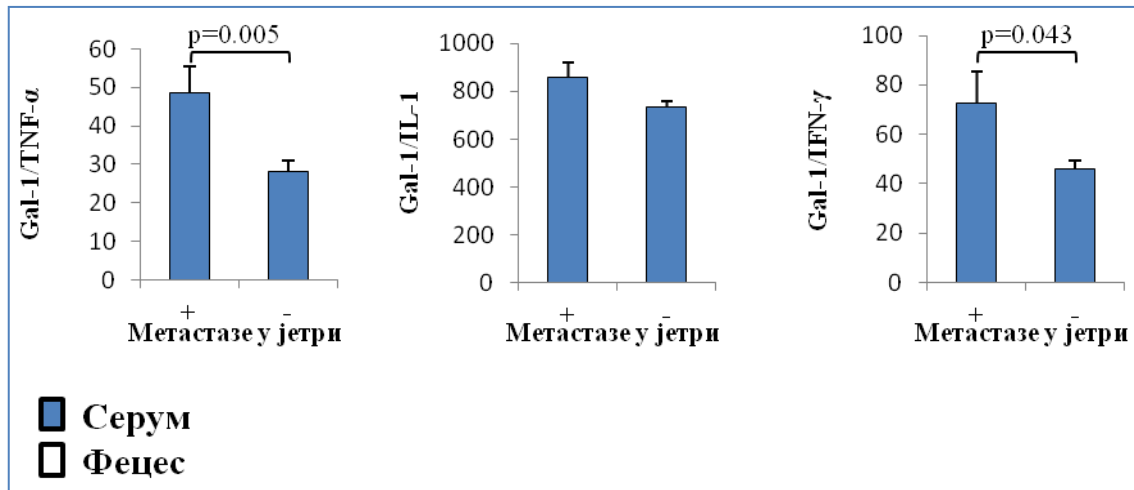
Анализа обухвата 60 испитаника са CRC-ом, који су подељени на две групе: присутне метастазе у јетри (+), нема детектабилних метастаза у јетри (-). Анализирани су односи фецесних концентрација испитиваних биомаркера и упоређене између дефинисаних група. Статистичка значајност је тестирана Mann-Whitney-евим тестом. Вредности су приказане као средње вредности \pm стандардна девијација.

Није било разлике у системским концентрацијама IL-1 β и Gal-3 између пацијената са и без метастаза (Фигура 9). Значајно мање вредности TNF- α , али већи однос Gal-3/TNF- α је пронађен у серуму пацијената са детектабилним метастазама у јетри, у поређењу са пацијентима без метастаза ($p < 0,05$, Фигура 9). Концентрација IL-1 β у фецесу била је значајно нижа, док је ниво Gal-3 био значајно већи код пацијената са метастазама. Није било разлика у вредностима TNF- α , нити у односу Gal-1/TNF- α у фецесу, између дефинисаних група.



Фигура 9. Смањене вредности фекалног IL-1 β и системског TNF- α , док је повећан фекални Gal-3 и системски однос Gal-3/TNF- α код пацијената са детектабилним метастазама у јетри. Пацијенти са CRC су подељени у две групе, на основу присутности метастаза у јетри (+ и -).

Већа вредност односа Gal-1/TNF- α нађена је у серуму болесника са детектабилним метастазама у јетри ($48,53 \pm 6,95$ vs. $28,12 \pm 2,87$; $p=0.005$), у поређењу са оболелим без метастаза/ карциноматозе (Фигура 10). Такође, забележили смо већи однос Gal-1/IFN- γ у серуму болесника са детектабилним метастазама у јетри ($72,68 \pm 12,51$ vs. $46,01 \pm 3,26$; $p=0.043$).



Фигура 10. Повећане вредности односа Gal-1/TNF- α и Gal-1/IFN- γ у фецесу пацијената са детектабилним метастазама у јетри. Пацијенти са CRC су подељени у две групе, на основу присутности метастаза у јетри (+ и -).

У наставку студије, болеснике са CRC-ом смо поделили на две групе, у односу на присуство метастаза у плућима, и анализирали вредности Gal-1, Gal-3 и других медијатора од интереса. Анализом концентрација испитиваних биомаркера у серуму болесника са CRC-ом у односу на присуство метастаза у плућима, нисмо пронашли статистички значајну разлику концентрација наведених биомаркера у односу на присуство метастаза у плућима (Табела 26).

Табела 26. Концентрација испитиваних биомаркера у серуму болесника са CRC-ом у односу на присуство метастаза у плућима

Концентрација цитокина (pg/ml)	Метастазе у плућима		p
	+	-	
IL-17	74,03±6,11	73,31±13,30	p>0.05
IL-33	107,80±67,92	74,70±62,28	p>0.05
sST2	693,36±457,51	938,14±621,67	p>0.05
IL-4	597,56±82,75	687,85±120,80	p>0.05
IL-6	6,89±1,34	9,63±9,53	p>0.05
TGF-β	1110,73±490,27	1164,15±518,52	p>0.05
IFN-γ	125,58±61,81	184,80±116,29	p>0.05
IL-10	4,25±0,62	4,37±1,96	p>0.05
IL-12	140,85±22,80	129,16±33,97	p>0.05
IL-13	467,35±100,80	398,56±100,84	p>0.05

Анализа обухвата 60 испитаника са CRC-ом, који су подељени на две групе: присутне метастазе у плућима (+), нема детектабилних метастаза у плућима (-). Анализиране су серумске концентрације испитиваних биомаркера и упоређене између дефинисаних група. Статистичка значајност је тестирана Mann-Whitney-евим тестом. Вредности су приказане као средње вредности ± стандардна девијација.

Анализом концентрација испитиваних биомаркера у фецесу болесника са CRC-ом у односу на присуство метастаза у плућима, показано је да је концентрација IL-12 статистички значајно већа у групи болесника са присутним метастазама у плућима, у односу на групу болесника без присутних метастаза у плућима (Табела 27).

Табела 27. Концентрација испитиваних биомаркера у фецесу болесника са CRC-ом у односу на присуство метастаза у плућима

Концентрација цитокина (pg/ml)	Метастазе у плућима		p
	+	-	
IL-17	470,34±132,89	409,13±314,55	p>0.05
IL-33	343,95±104,08	354,08±232,03	p>0.05
sST2	693,93±380,09	781,69±604,27	p>0.05
IL-4	2912,96±937,38	2362,37±1393,74	p>0.05
IL-6	54,87±15,61	42,92±27,21	p>0.05
TGF-β	4766,15±3163,39	7231,78±7623,45	p>0.05
IFN-γ	1515,19±735,46	1623,99±1453,64	p>0.05
IL-10	24,58±7,79	23,49±23,36	p>0.05
IL-12	641,83±119,16	443,41±378,05	p=0.025
IL-13	1037,26±824,08	1230,48±1375,11	p>0.05

Анализа обухвата 60 испитаника са CRC-ом, који су подељени на две групе: присутне метастазе у плућима (+), нема детектабилних метастаза у плућима (-). Анализиране су фецесне концентрације испитиваних биомаркера и упоређене између дефинисаних група. Статистичка значајност је тестирана Mann-Whitney-евим тестом. Вредности су приказане као средње вредности ± стандардна девијација.

Анализом односа концентрација испитиваних биомаркера у серуму болесника са CRC-ом у односу на присуство метастаза у плућима, однос концентрација TGF- β /TNF- α је статистички значајно већи у групи болесника са присутним метастазама у плућима у односу на групу болесника без присутних метастаза у плућима. Док је однос концентрација IL-10/TNF- α статистички значајно већи у групи болесника без присутних метастаза у плућима у односу на групу болесника са присутним метастазама у плућима (Табела 28).

Табела 28. Односи концентрација испитиваних биомаркера у серуму болесника са CRC-ом у односу на присуство метастаза у плућима

Однос концентрација цитокина	Метастазе у плућима		p
	+	-	
TGF- β /IL-12	21,04 \pm 11,32	27,56 \pm 16,97	p>0.05
TGF- β /TNF- α	165,93\pm158,70	15,94\pm19,26	p=0.001
TGF- β /IL-1 β	109,85 \pm 47,79	135,28 \pm 82,54	p>0.05
TGF- β /IL-17	15,01 \pm 6,66	16,17 \pm 7,48	p>0.05
TGF- β /IFN- γ	12,38 \pm 9,04	9,42 \pm 7,61	p>0.05
IL-10/TNF- α	0,07\pm0,06	1,45\pm4,55	p=0.001
IL-10/IL-1 β	0,43 \pm 0,10	0,46 \pm 0,17	p>0.05
IFN- γ /IL-10	30,80 \pm 18,14	42,37 \pm 17,72	p>0.05
IL-17/IL-10	17,78 \pm 3,48	18,58 \pm 5,11	p>0.05
sST2/IL-33	14,17 \pm 16,26	18,18 \pm 14,76	p>0.05

Анализа обухвата 60 испитаника са CRC-ом, који су подељени на две групе: присутне метастазе у плућима (+), нема детектабилних метастаза у плућима (-). Анализирани су односи серумских концентрација испитиваних биомаркера и упоређене између дефинисаних група. Статистичка значајност је тестирана Mann-Whitney-евим тестом. Вредности су приказане као средње вредности \pm стандардна девијација.

Колоректални карцином: Значај концентрација цитокина у серуму и фецесу за процену тежине болести

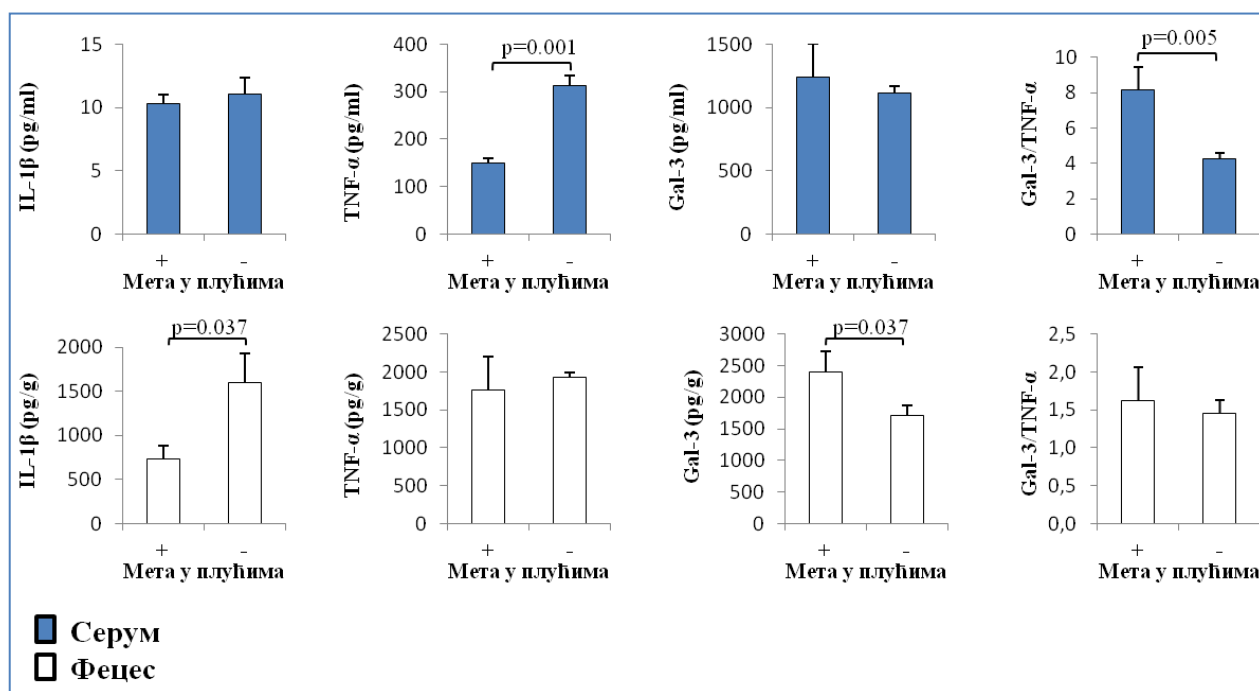
Анализом односа концентрација испитиваних биомаркера у фецесу болесника са CRC-ом у односу на присуство метастаза у плућима, однос концентрација TGF- β /IL-12 је статистички значајно већи у групи болесника без присутних метастаза у плућима у односу на групу болесника са присутним метастазама у плућима (Табела 29).

Табела 29. Односи концентрација испитиваних биомаркера у фецесу болесника са CRC-ом у односу на присуство метастаза у плућима

Однос концентрација цитокина	Метастазе у плућима		p
	+	-	
TGF- β /IL-12	7,22\pm4,33	23,91\pm30,35	p=0.025
TGF- β /TNF- α	2,35 \pm 2,23	6,96 \pm 8,06	p>0.05
TGF- β /IL-1 β	6,69 \pm 3,01	24,03 \pm 32,12	p>0.05
TGF- β /IL-17	1,69 \pm 0,91	1,43 \pm 0,74	p>0.05
TGF- β /IFN- γ	2,96 \pm 1,32	4,83 \pm 4,25	p>0.05
TNF- α /IL-10	106,57 \pm 67,73	77,25 \pm 28,81	p>0.05
IL-1 β /IL-10	36,43 \pm 38,39	97,86 \pm 132,35	p>0.05
IFN- γ /IL-10	64,69 \pm 32,12	97,99 \pm 52,29	p>0.05
IL-17/IL-10	19,98 \pm 5,72	26,13 \pm 17,50	p>0.05
sST2/IL-33	1,92 \pm 0,70	2,34 \pm 1,33	p>0.05

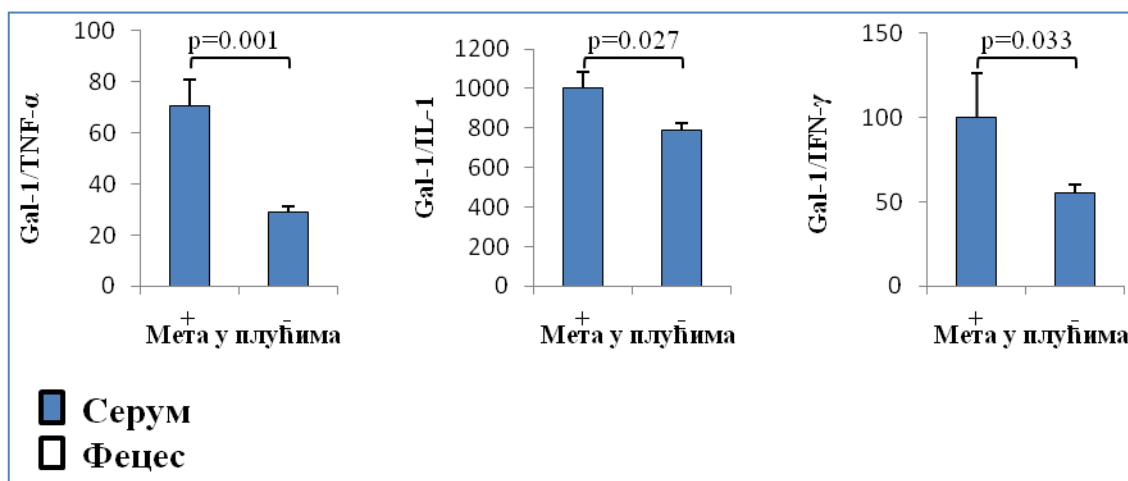
Анализа обухвата 60 испитаника са CRC-ом, који су подељени на две групе: присутне метастазе у плућима (+), нема детектабилних метастаза у плућима (-). Анализирани су односи фецесних концентрација испитиваних биомаркера и упоређене између дефинисаних група. Статистичка значајност је тестирана Mann-Whitney-евим тестом. Вредности су приказане као средње вредности \pm стандардна девијација.

Није било разлике у системским концентрацијама IL-1 β и Gal-3 између пацијената са и без метастаза (Фигура 11). Значајно мање вредности TNF- α , али већи однос Gal-3/TNF- α је пронађен у серуму пацијената са детектабилним метастазама у плућима, у поређењу са пацијентима без метастаза ($p < 0,05$, Фигура 11). Концентрација IL-1 β у фецесу била је значајно нижа, док је ниво Gal-3 био значајно већи код пацијената са метастазама. Није било разлика у вредностима TNF- α , нити у односу Gal-1/TNF- α у фецесу, између дефинисаних група.



Фигура 11. Смањене вредности фекалног IL-1 β и системског TNF- α , док је повећан фекални Gal-3 и системски однос Gal-3/TNF- α код пацијената са детектабилним метастазама у плућима. Пацијенти са CRC су подељени у две групе, на основу присуства метастаза у плућима (+ и -).

Већа вредност односа Gal-1/TNF- α нађена је у серуму болесника са детектабилним метастазама у плућима ($70,61 \pm 10,09$ vs. $28,87 \pm 2,51$; $p=0.001$), у поређењу са оболелим без метастаза (Фигура 12). Такође, забележили смо већи однос Gal-1/IFN- γ у серуму болесника са детектабилним метастазама у плућима ($100,34 \pm 25,82$ vs. $55,02 \pm 5,25$; $p=0.033$). Повећан однос Gal-1/IL-1 детектован је у серуму испитаника са метастазама у плућима ($1001,91 \pm 82,09$ vs. $791,65 \pm 31,63$; $p=0.027$).



Фигура 12. Повећане вредности односа Gal-1/TNF- α , Gal-1/IL-1 и Gal-1/IFN- γ у фецесу пацијената са детектабилним метастазама у плућима. Пацијенти са CRC су подељени у две групе, на основу присуства метастаза у плућима (+ и -).

У наставку студије, болеснике са CRC-ом смо поделили на две групе, у односу на присуство перитонеалне кацриноматозе, и анализирали вредности Gal-1, Gal-3 и других медијатора од интереса. Анализом концентрација испитиваних биомаркера у серуму болесника са CRC-ом у односу на присуство карциноматозе перитонеума, доказано је да је концентрација IFN- γ статистички значајно већа у групи болесника без карциноматозе перитонеума у односу на групу болесника са карциноматозом перитонеума (Табела 30).

Табела 30. Концентрација испитиваних биомаркера у серуму болесника са CRC-ом у односу на присуство карциноматозе перитонеума

Концентрација цитокина (pg/ml)	Карциноматоза		p
	+	-	
IL-17	76,54 \pm 6,97	72,85 \pm 13,42	p>0.05
IL-33	95,59 \pm 58,36	75,17 \pm 63,90	p>0.05
sST2	818,99 \pm 583,51	928,63 \pm 616,91	p>0.05
IL-4	605,64 \pm 75,23	690,87 \pm 122,41	p>0.05
IL-6	14,93 \pm 18,73	8,39 \pm 6,12	p>0.05
TGF- β	1207,29 \pm 488,54	1150,27 \pm 519,98	p>0.05
IFN- γ	110,60\pm40,75	190,24\pm117,38	p=0.042
IL-10	4,66 \pm 0,76	4,31 \pm 2,00	p>0.05
IL-12	131,78 \pm 24,80	130,14 \pm 34,44	p>0.05
IL-13	444,23 \pm 93,63	399,16 \pm 102,98	p>0.05

Анализа обухвата 60 испитаника са CRC-ом, који су подељени на две групе: присутна карциноматоза (+), нема детектабилне карциноматозе (-). Анализиране су серумске концентрације испитиваних биомаркера и упоређене између дефинисаних група. Статистичка значајност је тестирана Манн-Витнеу-евим тестом. Вредности су приказане као средње вредности \pm стандардна девијација.

Анализом концентрација испитиваних биомаркера у фецесу болесника са CRC-ом у односу на присуство карциноматозе перитонеума, доказано је да је концентрација IL-12 статистички значајно већа у групи болесника са карциноматозом перитонеума у односу на групу болесника без карциноматозе перитонеума (Табела 31).

Табела 31. Концентрација испитиваних биомаркера у фецесу болесника са CRC-ом у односу на присуство карциноматозе перитонеума

Концентрација цитокина (pg/ml)	Карциноматоза		p
	+	-	
IL-17	588,40±344,95	385,98±286,53	p=0.020
IL-33	432,45±267,90	339,47±213,47	p>0.05
sST2	879,64±666,10	754,26±574,29	p>0.05
IL-4	3020,25±1382,23	2317,19±1342,01	p>0.05
IL-6	53,29±17,84	42,61±27,45	p>0.05
TGF-β	7126,72±4189,61	6949,04±7750,27	p>0.05
IFN-γ	1735,31±888,09	1591,71±1467,22	p>0.05
IL-10	21,90±10,86	23,89±23,69	p>0.05
IL-12	758,86±505,06	413,75±315,95	p=0.017
IL-13	773,93±812,80	1284,86±1385,44	p>0.05

Анализа обухвата 60 испитаника са CRC-ом, који су подељени на две групе: присутна карциноматоза (+), нема детектабилне карциноматозе (-). Анализиране су фецесне концентрације испитиваних биомаркера и упоређене између дефинисаних група. Статистичка значајност је тестирана Mann-Whitney-евим тестом. Вредности су приказане као средње вредности ± стандардна девијација.

Анализом односа концентрација испитиваних биомаркера у серуму болесника са CRC-ом у односу на присуство карциноматозе перитонеума, доказано је да је однос концентрација TGF- β /TNF- α статистички значајно већи у групи болесника са карциноматозом перитонеума у односу на групу болесника без карциноматозе перитонеума. Док је однос концентрација IL-10/TNF- α и IFN- γ /IL-10 статистички значајно већи у групи болесника без карциноматозе перитонеума у односу на групу болесника са карциноматозом перитонеума (Табела 32).

Табела 32. Односи концентрација испитиваних биомаркера у серуму болесника са CRC-ом у односу на присуство карциноматозе перитонеума

Однос концентрација цитокина	Карциноматоза		p
	+	-	
TGF- β /IL-12	25,16 \pm 11,80	27,18 \pm 17,27	p>0.05
TGF- β /TNF- α	71,04\pm96,17	24,83\pm60,99	p=0.012
TGF- β /IL-1 β	124,22 \pm 55,72	134,07 \pm 83,51	p>0.05
TGF- β /IL-17	16,00 \pm 6,69	16,06 \pm 7,52	p>0.05
TGF- β /IFN- γ	12,99 \pm 7,36	9,17 \pm 7,72	p>0.05
IL-10/TNF- α	0,21\pm0,21	1,50\pm4,66	p=0.033
IL-10/IL-1 β	0,49 \pm 0,14	0,45 \pm 0,17	p>0.05
IFN- γ /IL-10	24,43\pm10,98	44,03\pm17,39	p=0.011
IL-17/IL-10	16,92 \pm 3,97	18,77 \pm 5,08	p>0.05
sST2/IL-33	15,06 \pm 16,83	18,22 \pm 14,59	p>0.05

Анализа обухвата 60 испитаника са CRC-ом, који су подељени на две групе: присутна карциноматоза (+), нема детектабилне карциноматозе (-).Анализирани су односи серумских концентрација испитиваних биомаркера и упоређене између дефинисаних група.Статистичка значајност је тестирана Mann- Whitney-евим тестом.Вредности су приказане као средње вредности \pm стандардна девијација.

Колоректални карцином: Значај концентрација цитокина у серуму и фецесу за процену тежине болести

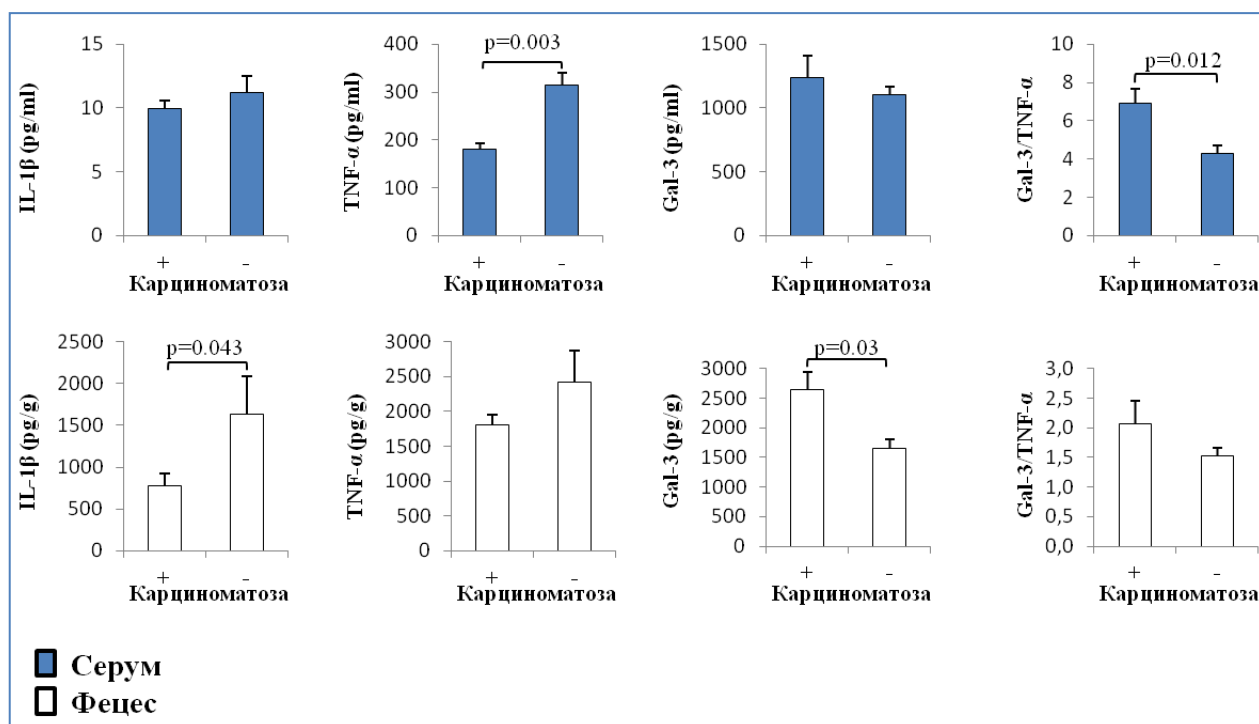
Анализом односа концентрација испитиваних биомаркера у фецесу болесника са CRC-ом у односу на присуство карциноматозе перитонеуманисмо пронашли статистички значајну разлику односа концентрација наведених биомаркера у односу на присуство карциноматозе перитонеума (Табела 33).

Табела 33. Односи концентрација испитиваних биомаркера у фецесу болесника са CRC-ом у односу на присуство карциноматозе перитонеума

Однос концентрација цитокина	Карциноматоза		p
	+	-	
TGF- β /IL-12	10,68 \pm 6,60	24,13 \pm 31,10	p>0.05
TGF- β /TNF- α	5,67 \pm 4,81	6,62 \pm 8,21	p>0.05
TGF- β /IL-1 β	16,25 \pm 24,46	23,24 \pm 31,95	p>0.05
TGF- β /IL-17	1,75 \pm 0,81	1,63 \pm 0,74	p>0.05
TGF- β /IFN- γ	3,99 \pm 1,54	4,74 \pm 4,37	p>0.05
TNF- α /IL-10	95,85 \pm 58,11	77,65 \pm 29,51	p>0.05
IL-1 β /IL-10	56,15 \pm 56,33	97,49 \pm 135,02	p>0.05
IFN- γ /IL-10	92,83 \pm 51,30	94,82 \pm 51,99	p>0.05
IL-17/IL-10	30,32 \pm 14,58	24,67 \pm 17,11	p>0.05
sST2/IL-33	1,93 \pm 0,60	2,36 \pm 1,36	p>0.05

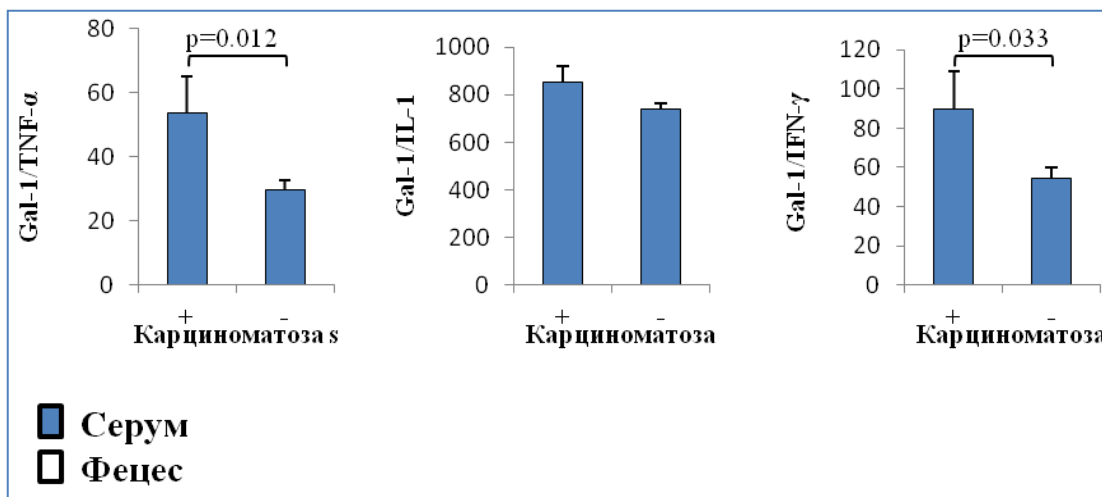
Анализа обухвата 60 испитаника са CRC-ом, који су подељени на две групе: присутна карциноматоза (+), нема детектабилне карциноматозе (-).Анализирани су односи фецесних концентрација испитиваних биомаркера и упоређене између дефинисаних група.Статистичка значајност је тестирана Mann-Whitney-евим тестом.Вредности су приказане као средње вредности \pm стандардна девијација.

Није било разлике у системским концентрацијама IL-1 β и Gal-3 између пацијената са и без карциноматозе (Фигура 13). Значајно мање вредности TNF- α , али већи однос Gal-3/TNF- α је пронађен у серуму пацијената са детектабилном перитонеалном карциноматозом, у поређењу са пацијентима без карциноматозе ($p < 0,05$, Фигура 13). Концентрација IL-1 β у фецесу била је значајно нижа, док је ниво Gal-3 био значајно већи код пацијената са карциноматозом. Није било разлика у вредностима TNF- α , нити у односу Gal-1/TNF- α у фецесу, између дефинисаних група.



Фигура 13. Смањене вредности фекалног IL-1 β и системског TNF- α , док је повећан фекални Gal-3 и системски однос Gal-3/TNF- α код пацијената са детектабилном перитонеалном карциноматозом. Пацијенти са CRC су подељени у две групе, на основу присуства карциноматозе у перитонеуму (+ и -).

Већа вредност односа Gal-1/TNF- α нађена је у серуму болесника са детектабилном перитонеалном карциноматозом ($53,79 \pm 11,42$ vs. $29,71 \pm 2,72$; $p=0.012$), у поређењу са оболелим без карциноматозе (Фигура 14). Такође, забележили смо већи однос Gal-1/IFN- γ у серуму болесника са детектабилном перитонеалном карциноматозом ($89,57 \pm 19,57$ vs. $54,65 \pm 5,46$; $p=0.033$).



Фигура 14. Повећане вредности односа Gal-1/TNF- α и Gal-1/IFN- γ у фецесу пацијената са детектабилном перитонеалном карциноматозом. Пацијенти са CRC су подељени у две групе, на основу присуства перитонеалне карциноматозе (+ и -).

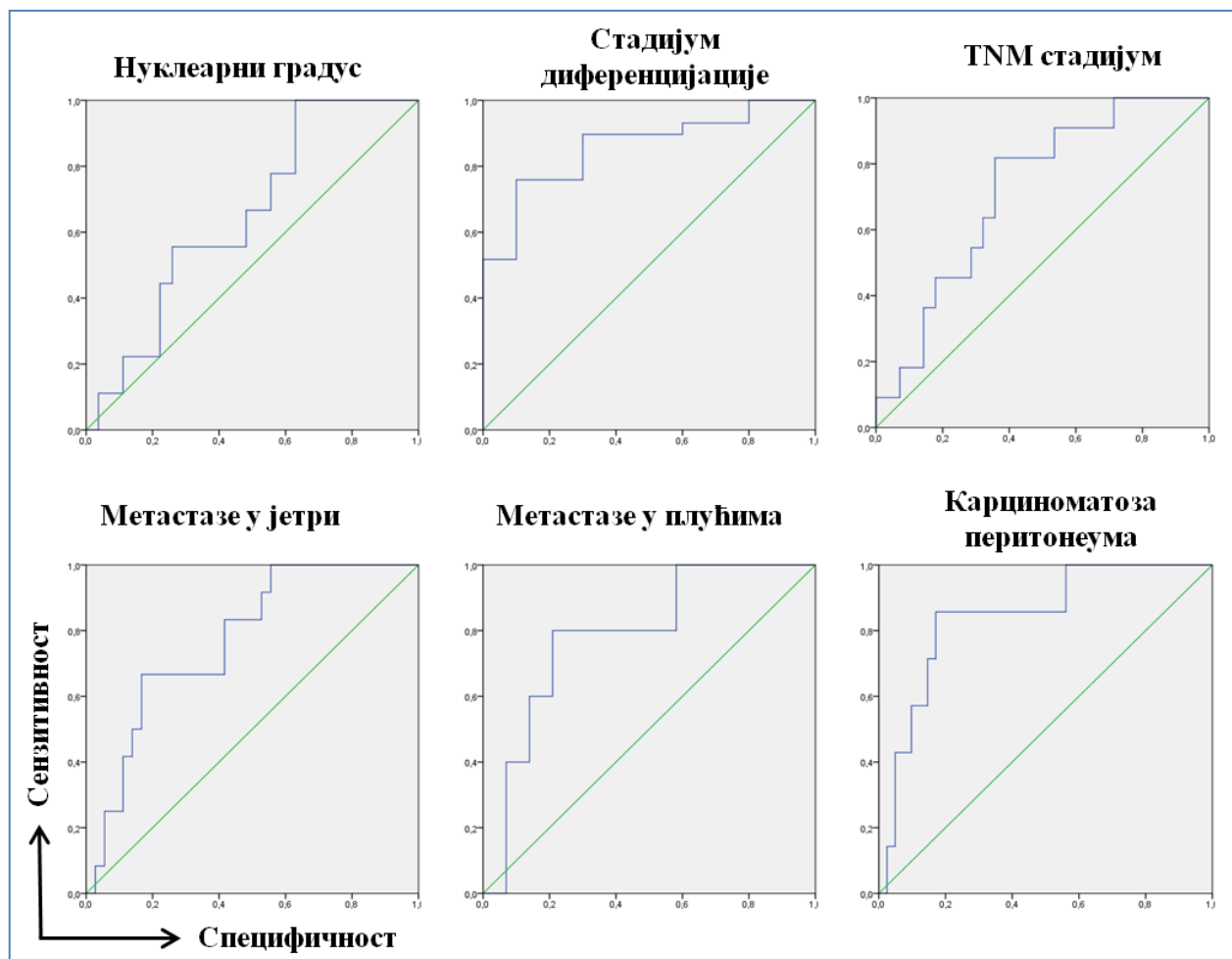
Фецесне вредности Gal-3 и Gal-1 значајно корелирају са параметрима тежине болести

Однос између фекалног Gal-3 и клиничко-патолошких параметара пацијената са CRC-ом су резимирани у Табели 34. Анализа је показала позитивну корелацију између фекалног галектина-3 и параметара и маркера тежине болести и прогресије. Постоји умерена позитивна корелација између фекалног галектина-3 и Нуклеарног градуса ($r=0.358$; $p=0.025$), Степена диференцијације ($r=0.543$; $p=0.001$), TNM стадијума ($r=0.339$; $p=0.035$), присуства метастаза у јетри ($r=0.406$; $p=0.004$), присуства метастаза у плућима ($r=0.303$; $p=0.036$), присуства перитонеалне карциноматозе ($r=0.420$; $p=0.003$), и туморских маркера AFP ($r=0.438$; $p=0.002$) и CEA ($r=0.308$; $p=0.049$). Нисмо нашли корелацију између системских вредности Gal-3 и истих параметара (резултати нису приказани). Анализа (ROC) криве фекалног галектина-3 за различите стадијуме и параметре CRC-а показала је да фецесни Gal-3 може бити предиктор тежине болести. Анализа је показала да Gal-3 може бити маркер за разликовање нуклеарног градуса

(sensitivity 88.7%, specificity 83.8%) степена диференцијације CRC-а (sensitivity 88.7%, specificity 83.8%), TNM стадијума (sensitivity 88.7%, specificity 83.8%), присуства метастаза у јетри (sensitivity 88.7%, specificity 83.8%), присуства метастаза у плућима (sensitivity 88.7%, specificity 83.8%), присуства перитонеалне карциноматозе (sensitivity 88.7%, specificity 83.8%) (Фигура 15). Оптимална гранична вредност (cut off) за Gal-3 која оногућава разликовање стадијума прогресије CRC-а је 1958,82 pg/g. За ову вредност, сензитивност разликовања је 81,8% а специфичност 60,7%.

Табела 34. Корелација концентрације Gal-3 у фецесу и параметара тежине и прогресије болести, код оболелих од CRC. Статистичка значајност је тестирана Spearman-овим коефицијентом корелације.

Варијабле	Gal-3	
	Spearman`s rho	p
Нуклеарни градус	0,358	0.025
Степен диференцијације	0,543	0.001
TNM стадијум	0,339	0.035
Метастазе у јетри	0,406	0.004
Метастазе у плућима	0,303	0.036
Перитонеална карциноматоза	0,420	0.003
AFP	0,438	0.002
СЕА	0,308	0.049
СА 19-9	0,254	0.088



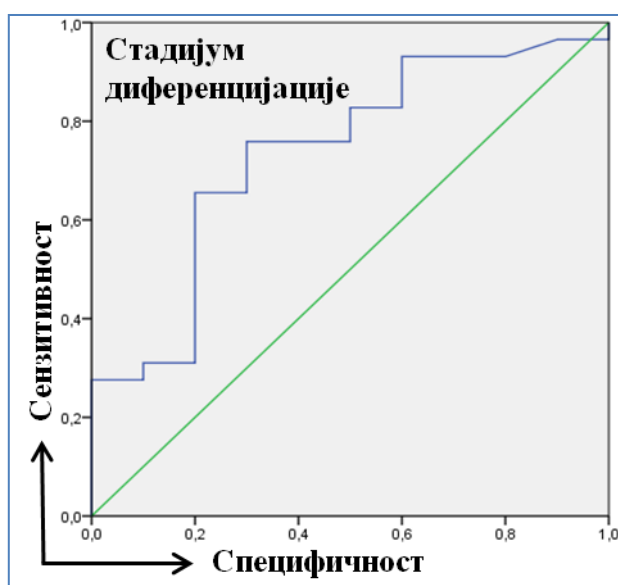
Фигура 15. Специфичност и сензитивност фекалног Gal-3. ROC криве илуструју специфичност и сензитивност фекалног Gal-3 у односу на нуклеарни градус, хистолошки тип туморског ткива (добро/умерено и лоше диференцирано), TNM стадијум (I-II vs. III-IV), присуство метастаза у јетри (+ vs. -), метастаза плућа (+ vs. -), перитонеалну карциноматозу (+ vs. -).

Spearman-овим коефицијентом корелације показано је да постоји позитивна корелација концентрације Gal-1 у фецесу и параметара тежине и прогресије болести наведених у табели код болесника са CRC-ом: стадијум хистолошке диференцијације ($r=0.357$; $P=0.025$). Показано је и да фецесни Gal-1 значајно корелира са нивоом AFP ($r=0.317$; $P=0.028$), СА 19-9 ($r=0.296$; $P=0.049$), али није нађена значајна корелација са СЕА (Табела 35).

Анализа је показала да Gal-1 може бити маркер за разликовање хистолошке диференцијације туморско ткива (Фигура 16). Оптимална гранична вредност (cut off) за Gal-1 која омогућава разликовање стадијума диференцијације CRC-а је 13708,29 pg/g. За ову вредност, сензитивност разликовања је 73,6% а специфичност 60,0%.

Табела 35. Корелација концентрације Gal-1 у фецесу и параметара тежине и прогресије болести, код оболелих од CRC. Статистичка значајност је тестирана Spearman-овим коефицијентом корелације.

Варијабле	фецесни Gal-1	
	Spearman`s rho	p
Диференцијација	0,357	0.025
AFP	0,317	0.028
CEA	0,230	0.115
CA 19-9	0,296	0.049



Фигура 16. ROC крива илуструје специфичност и сензитивност фекалног Gal-1 у покушају да се диференцира стадијум хистолошке диференцијације туморског ткива: добро/умерено vs. лоше диферентовано.

5. ДИСКУСИЈА

У овој студији испитивана је повезаност вредности цитокина у серуму и фецесу са стадијумом болести и клиничко-патолошким карактеристикама, код пацијената са колоректалним карциномом.

Показали смо значајно већу фецесну концентрацију Gal-3 код пацијената са CRC-ом са већом нуклеарним градусом, слабом диференцијацијом туморског ткива, већим TNM стадијумом и метастатском болешћу, док је преминација Gal-3 над проинфламаторним цитокинима забележена код пацијената са унапредовалим TNM стадијумом и метастатском болести. Фецесни Gal-3 позитивно корелира с тежином болести (већи TNM стадијум, већи нуклеарни градус и слаба диференцијација туморског ткива) и прогресијом (присуство метастаза у плућима/јетри или перитонеалне карциноматозе) и системских биомаркера AFP и CEA. Ови налази указују на Gal 3 као потенцијални маркер тежине и прогресије CRC-а.

Такође смо показали повећану концентрацију Gal-1 у фецесу пацијената са CRC-ом и већим нуклеарним градусом и слабом диференцијацијом туморског ткива, док је преминација Gal-1 у односу на проинфламацијске цитокине детектована код пацијената са унапредовалим TNM стадијумом и метастатском болешћу.

Тежина болести зависи од цитокинског миљеа који је најзаступљенији у окружењу тумора. Претходне студије утврдиле су да присуство $CD4^+Th1$ лимфоцита и цитотоксичких $CD8^+$ Т лимфоцита у туморској микросредини представља позитиван прогностички знак. Док присуство Tregs и Th2/Th17 лимфоцита указује на смањено преживљавање пацијената са колоректалним карциномом, с обзиром да су они представници имуносупресивног одговора, који иначе има улогу у спречавању настанка аутоимуних болести, али у овом случају, они супримирају и антитуморски одговор и омогућавају бржи раст туморских ћелија (121,122). Преминација проинфламацијских Th1 лимфоцита који продукују TNF- α /IFN- γ , осим што повећавају активност цитотоксичких ћелија, такође појачавају урођене антитуморске механизме и доводе се у везу са одсуством метастатске инвазије, рецидива и повећаним преживљавањем пацијената са колоректалним карциномом (123,124). Посебно се истичу меморијски $CD8^+$ Т лимфоцити ($CD45RO^+$), који спадају у групу лимфоцита који инфилтришу тумор (енгл. Tumor-infiltrating lymphocytes, TILs), и повезани су са бољом прогнозом болести, повећаном стопом преживљавања и смањеним ризиком од рецидива (123). Доказано је да су TILs значајно повећани код CRC-а са MSI (енгл. Microsatellite instability, MSI) и да ти пацијенти имају много бољу прогнозу болести (123). Напротив, поларизација ка Th2 лимфоцитима и продукцији IL-4, IL-10 и IL-13 олакшава развој локалног хуморалног имунског одговора и супресију Th1 имунског одговора (121). У складу са овим феноменом, претходне студије су показале да болесници са карциномом мокраћне бешике и колоректалним карциномом имају смањен проценат Th1 лимфоцита које продукују IFN- γ /IL-2, док имају повећан проценат Th2 лимфоцита које продукују IL-4/IL-10 у периферној циркулацији (125,126). У том својству говоре и бројне студије које су спроведене на имунокомпетентним и имунокомпромитујућим мишевима, тако да је доказана спонтана појава карцинома колоне и плућа, без повезаности са инфективним агенсом, код имунодефицијентних мишева што указује на битан значај имунског одговора у антитуморској одбрани организма (123). Осим ћелија имунског система, битни су и антигени које експримирају туморске ћелије (енгл. Tumor-associated antigens, TAAs) и који покрећу имунски одговор посредством хуморалног и ћелијског имунитета. Код CRC-а, TAAs су сопствени ћелијски антигени који су слабо експримирани у нормалним и ембрионским ћелијама, али у туморским ћелијама су повишени. У овом случају је то СЕА за који се сматра да може изазвати специфичан цитотоксични

одговор, али у новијим студијама показано је да у *in vitro* условима овај антиген може имати чак имуносупресивно дејство и да активација Т лимфоцита може изостати (123). Присуство имуносупресивних урођених/стечених ћелија које луче TGF- β /IL-10 корелира са узнапредовалом болешћу и лошом прогнозом (121). У овој студији анализирали смо про и антиинфламацијске цитокине у серуму и фецесу пацијената са колоректалним карциномом. Системске вредности проинфламацијског цитокина TNF- α биле су значајно ниже код пацијената са тежом болешћу (TNM стадијум III и IV, лоша хистолошка диференцијација, нуклеарни градус III) (Фигуре 1-6). Штавише, системски TNF- α био је значајно нижи код пацијената са прогресивнијом болешћу (инвазија лимфних и крвних судова, присуство метастаза у јетри, плућима, перитонеална карциноматоза (Фигуре 7-12). Локалне вредности цитокина у течној фракцији фецеса показале су преминацију антиинфламацијских цитокина TGF- β и IL-10 код пацијената са тежим стадијумом колоректалног карцинома (TNM стадијум III и IV, лоша хистолошка диференцијација) као и нижи ниво проинфламацијског IL-1 β код испитаника са већом прогресијом болести, присуством метастаза у јетри, плућима, перитонеалном карциноматозом (Фигуре 7-12). Ови резултати су у складу са нашим и другим претходним студијама тврдећи да су серумске концентрације IL-10 и TGF- β повећане код пацијената са колоректалним карциномом у поређењу са здравом контролном групом и да ови пацијенти са лошијом прогнозом имају повећану системску концентрацију IL-10 у поређењу са пацијентима са бољом прогнозом, мада постоје и студије у којима је концентрација IL-10 мања код пацијената са CRC-ом у односу на контролну групу здравих испитаника, али је ипак већа концентрација код пацијената са лошијом прогнозом болести у односу на групу пацијената са бољом прогнозом (127,88). У одређеним студијама показано је да СЕА индукује повећање IL-10, па се то додатно доводи у везу са лошијом прогнозом болести, већим бројем захваћених лимфних чворова, већом пенетрацијом кроз зид црева, перфорацијом црева и васкуларном инвазијом (88). Повишене вредности TGF- β у серуму пацијената са CRC-ом у корелацији су са лошијом прогнозом болести према многим студијама, међутим постоје и студије које указују на двојаку улогу овог цитокина и показују да може имати снажан антитуморски ефекат. На то указују студије спроведене на мишевима које показују да губитак TGF- β сигналног пута доводи до већег броја тумора код групе третиране АОМ, а такође и хетерозиготни губитак Smad4 узрокује веће и инвазивније карциноме интестиналног тракта, што заједно указује на антитуморску

активност TGF- β . Супротно, доказано је да TGF- β поспешује EMT (енгл. Epithelial to mesenchymal transition, EMT) и метастазе CRC-a *in vivo* преко механизма SOX4 и miR-1269a (128).

Познато је да Gal-3 игра битну улогу у различитим биолошким и патолошким процесима, као што су ћелијски раст и диференцијација, интеракције целуларног и екстрацелуларног матрикса, метастазе, регулација апоптозе (129,130). Он је изразито експримиран у људском интестиналном тракту, укључујући колон и ректум (131). Нормална мукоза колоне показује снажну нуклеарну експресију Gal-3, с тим што је у бази крипти слабије експримиран, док се нуклеарна експресија све више повећава идући према површини слузнице (131). Раније студије су истраживале могућу повезаност Gal-3 и колоректалног карцинома. Имунохистохемијским бојењем потврђено је да су колоректални карциноми са експресијом Gal-3 значајно већи, са дубљом инвазијом зида колоне и лошијом хистолошком диференцијацијом (132,133). Друге су показале да појачана експресија Gal-3 колерира са прогресијом тумора и представља предиктор краћег преживљавања пацијената са колоректалним карциномом (134). Доказано је да постоји промена субцелуларне локализације Gal-3 из нуклеуса у цитоплазму код CRC-a током прогресије аденома у карцином (131). Познато је да је цитоплазматски Gal-3 одговоран за инхибицију апоптозе, па се тиме објашњава преживљавање туморских ћелија. Такође, сматра се врло битним промотером туморске ангиогенезе што остварује бројним интеракцијама са рецепторима на површини ендотелних рецептора (131). А осим тога, учествује и у ширењу тумора са једног на друго место и доказано је да у Gal-3 посредованој адхезији туморских ћелија учествују ћелијски површински лиганди попут ламинина, CEA и Lamps (енгл. Lysosome-associated membrane glycoproteins, Lamps) (131). На супрот томе, неке студије су показале смањену експресију Gal-3 код прогресије колоректалног карцинома и да није било значајне корелације између Gal-3 и стадијума колоректалног карцинома (135,136).

Недавне студије наглашавају значајност мерења биомаркера у фецесу (137,138). На овај начин, протеини и молекули који се стварају у интестиналној мукози могу бити мерени и најбоље осликати стање унутар црева (139). Недавна студија показала је повишене фекалне вредности M2 пируват киназе, фекалног калпротектина и iFOBТ код колоректалног карцинома и наведени маркери су предложени за скрининг високоризичне групе пацијената за ову болест (140). Данас, истраживачи тестирају

дијагностичку прецизност различитих фекалних маркера у откривању канцерогених лезија у дебелом цреву, како би се пронашли најтачнији за скрининг на колоректални карцином. Према нашим сазнањима, ово је прва студија која тестира фекални Gal-3 као маркер за детекцију тешких и прогресивних облика колоректалног карцинома. Ми нисмо пронашли разлике у системском нивоу Gal-3 између различитих фаза колоректалног карцинома. Међутим, знатно повећан фекални нивоа Gal-3 је детектован код пацијената са тежим стадијумом болести (лоша хистолошка диференцијација, већи нуклеарни градус и TNM стадијуми III и IV; Фигуре 1-6). Штавише, фекални Gal-3 је значајно повећан код пацијената са инвазијом лимфних и крвних судова и присуством метастаза у јетри, плућима или перитонеалном карциноматозом (Фигуре 7-14).

Као што је добро познато, контрарегулаторни цитокини су поуздан маркер болести, и ми смо анализирали однос Gal-3 и про и антиинфламаторних цитокина. Није било разлике у односу Gal-3 и TGF- β , IL-10 и IL-1 β . Међутим, приметили смо преминацију Gal-3 над проинфламацијским цитокином TNF- α у серуму и фецесу код пацијената са тежим и прогресивним стадијумом колоректалног карцинома (Фигуре 1, 3, 5). На основу ових налаза, верујемо да Gal-3/TNF- α однос може бити предиктор за унапредовање стадијум колоректалног карцинома. Постоји неколико могућих механизма који могу да објасне потенцијалну улогу Gal-3 у прогресији колоректалног карцинома. Прво, Gal-3 може деловати директно анти-инфламацијски. Улога Gal-3 у почетку, прогресији и смањењу инфламације је добро утврђена (141). Познато је да се током запаљења, реактивне врсте кисеоника и друге токсичне супстанце акумулирају у ћелији и индукују продукцију AGEs (142). Надаље, AGEs се везује за рецептор RAGE како би олакшао локалну инфламацију (143). Gal-3 инхибира AGE-RAGE сигнални пут и потом супримира RAGE-индуковану инфламацију у ткиву (144). Други могући механизам деловања Gal-3 је директна инхибиција ћелијског имунског одговора, инхибицијом интеракције Т лимфоцита и антиген презентујућих ћелија (145). Друге студије показују да екстрацелуларни галектин-3 индукује апоптозу CD4 или CD8 Т лимфоцита у туморима и да то супримира секрецију IFN- γ у цитотоксичких Т лимфоцита у тумору (146). Ми смо први описали преминацију Gal-3 над TNF- α у столици пацијената са тешким и прогресивним облицима колоректалног карцинома (Фигуре 1, 3, 5, 7).

Поред ових улога у имуномодулацији, Gal-3 може да олакша миграцију ћелија карцинома дебелог црева помоћу K-Ras-Raf-Erk1/2 сигнализације (147). Gal-3 може индуковати груписање интегрина, изазивајући ћелијску покретљивост, док везивање за муцин-1, молекула који доминира у гастроинтестиналном окружењу, олакшава трансендотелну инвазију (148). Даље у овој студији смо претпоставили могућу улогу фекалног галектина-3 као биомаркера у предикцији тежине болести и прогресије. Добили смо позитивну корелацију између фекалног Gal-3 и тежине болести (узнапредовали TNM стадијум, виши нуклеарни градус, лоша туморска диференцијација; Табела 34 и Фигура 15). Штавише, фекални ниво Gal-3 је у позитивној корелацији са прогресивнијим стадијумом колоректалног карцинома (метастазе у јетри и плућима, перитонеална карциноматоза; Фигура 15). Такође смо показали јаку корелацију између фекалног Gal-3 и биомаркера AFP и CEA (Табела 34). Занимљиво је да нисмо нашли корелацију између серумског Gal-3 са истим параметрима и маркерима тежине болести. Такође, вредности Gal-3 у фецесу су око два до три пута веће него у серуму, што чини мерења у фецесу много сензитивнијом методом. Код колоректалног карцинома, AFP и CEA су коришћени као поуздани маркери за праћење прогресије тумора. Недавне студије су показале да Gal-3 интерагује са CEA поспешујући миграцију туморских ћелија, адхезију и касније метастазирање (149,150). Анализирањем ROC кривуље Gal-3 и параметара и маркера болести за колоректални карцином показују да би Gal-3 могао бити предиктор узнапредовалог TNM стадијума, већег нуклеарног градуса и лошије диференцијације тумора као и присуства метастаза у плућима или јетри или перитонеалне карциноматозе, са добром специфичношћу и сензитивношћу. Према нашим резултатима, фекални Gal-3 може бити користан маркер за тежину колоректалног карцинома и прогресију.

Повећане локалне вредности Gal-3, које се огледају кроз већу фекалну концентрацију, код пацијената са CRC са већим нуклеарним градусом, лошом диференцијацијом туморског ткива и напредним TNM стадијумом болести, може се сматрати знаком малигног прогреса тумора и лоше прогнозе за пацијенте. Преминација Gal-3 у односу на проинфламаторни цитокин TNF- α , код испитаника са напредном и прогресивном болешћу, може указати на имуномодулаторну улогу Gal-3 у ограничавању континуираних проинфламаторних процеса и спречавању снажног

антитуморског имунског одговора. Овај феномен фаворизује избегавање потентног антитуморског имунског одговора и дисеминацију туморских ћелија (метастазе). Штавише, фекалне вредности Gal-3 могу се користити као значајан маркер за тежину и прогресију CRC-а. Ови налази указују да Gal-3 може допринети имунолошкој привилегији тумора модулацијом локалног имунског одговора и указују на могућу улогу фекалног Gal-3 као маркера прогресије CRC-а и његову потенцијалну употребу као терапеутску мету.

Gal-1 је слабо експримиран у нормалним епителним ћелијама колона, али је експресија повећана код упалних процеса и тумора. Имунохистохемијски је доказана експресија Gal-1 у 12% нормалних ћелија мукозе колона, 40% аденома и 84% карцинома. Док његова експресија није доказана у епителним ћелијама, иако је у 91% аденокарцинома и 33% муцинозних аденокарцинома доказана експресија (131). Доказано је да Gal-1 поспешује апоптозу тако што долази до интеракције између Gal-1 на површини туморских ћелија или екстрацелуларно са T ћелијама и тако доводи до T ћелијске апоптозе што директно омогућује туморским ћелијама да избегну T ћелијски имуни одговор као један од најважнијих антитуморских одговора (131). Улога у ангиогенези је доказана на основу прекомерне експресије у везивном ткиву које окружује туморске ћелије. А повећана адхезија туморских ћелија колона, које имају експримиран Gal-1 на површини, са екстрацелуларним компонентама (фибронектин и ламинин) указује на битну улогу Gal-1 у дисеминацији туморских ћелија (131). Биолошка улога Gal-1 је добро позната у пролиферацији туморских ћелија, инвазији, апоптози, метастази, имуносупресији и ангиогенези тумор (151-158), тако да се он доводи у корелацију са лошом прогнозом и метастатским фенотипом (154,155). Галектин-1 након секреције делује како интрацелуларно, тако и екстрацелуларно (159). Излучен Gal-1 може интераговати са протеинима на ћелијској површини као што су фибронектин, интегрин, ламинин и VEGFR2, и потом утицати на пролиферацију, адхезију, миграцију и ангиогенезу (160,161). Ови налази истичу важност екстрацелуларног Gal-1 у биологији тумора. У овој студији смо анализирали системски и фекални ниво Gal-1 и његов однос са неколико проинфламацијских цитокина, у различитим фазама колоректалног карцинома. Нашли смо повећану концентрацију Gal-1 у столицама пацијената са колоректалним карциномом већег нуклеарног градуса (III насупрот II и III насупрот I) и лошом диференцијацијом тумора (Фигуре 2 и 4).

Претходне студије су показале да је Gal-1 као протеин обично повишен у серуму пацијената са туморима (162-164). Такође, серумске вредности Gal-1 су значајно повећане код пацијената са метастатском болешћу у поређењу са пацијентима са локализованим туморима (165). Нисмо пронашли да је средња вредност серумске концентрације Gal-1 значајно другачија код облелих у односу на патохистолошке карактеристике тумора, док је фекална концентрација Gal-1 значајно измењена у односу на патохистолошке карактеристике (Фигуре 2, 4 и 6). Заиста, у недавним студијама, фецес се користио као узорак за тестирање различитих биомаркера (143,144). На пример, фекални калпротектин (енгл. Fecal calprotectin, FCP), биомаркер интестиналне инфламације који је у клиничкој употреби већ годинама (166,167), такође је повишен код пацијената са колоректалним карциномом и предлаже се као скрининг код ризичних група за колоректални карцином (168). Према доступној литератури, ово је прва студија која тестира и фекални Gal-1 (пored Gal-3) за детекцију знапредовалих и прогресивних облика колоректалног карцинома.

Како је однос контрарегулаторних цитокина поуздан маркер прогресије болести (169), анализирали смо однос Gal-1 и проинфламаторних цитокина и показали преминацију Gal-1 над проинфламаторним цитокинима TNF- α , IL-1 β и IFN- γ код пацијената са прогресивним колоректалним карциномом. Однос Gal-1 и TNF- α у серуму и фецесу је значајно већи код пацијената са напредним TNM стадијумом (III+IV), као и детектабилном инвазијом лимфних и крвних судова (Фигуре 6, 7 и 8). У складу са овим налазима, повећан однос Gal-1/TNF- α и Gal-1/IFN- γ детектован је у серуму пацијената са метастатским промената у плућима или јетри или са перитонеалном карциноматозом, док је повећан однос Gal-1/IL-1 детектован само у серуму пацијената са метастатским променама у плућима (Фигуре 10, 12 и 14). На основу ових налаза, верујемо да однос Gal-1/TNF- α може бити предиктор напредног стадијума колоректалног карцинома.

Улога Gal-1 у настанку, прогресији и смањењу инфламације је добро утврђена (170). Раније студије су откриле да Gal-1 инхибира раст ћелија и индукује апоптозу активираних имунских ћелија (171,172). Показано је да Gal-1 преусмерава баланс према типу 2 имунског одговора, истовремено инхибирајући продукцију IFN γ , TNF α , IL-2 и IL-12 и олакшавајући секрецију IL-5 *in vitro* и *in vivo* (173,174). Неке студије сугеришу да Gal-1 може инхибирати Т-ћелијску ефекторску функцију или индуковати смрт

тумор инфилтришућих леукоцита и накнадно супримирају јак имуни одговор изазван проинфламаторним цитокинима (175-178). Ми смо први описали преминање Gal-1 над TNF- α , IL-1 β и IFN- γ у столици пацијената са тешким и прогресивним облицима колоректалног карцинома (Фигуре 6, 7, 8, 10, 12 и 14).

У складу са нашим налазима Sambu и сарадници закључили су да ћелије тумора могу умањити T-ћелијску ефекторску функцију секрецијом Gal-1, који фаворизује настанак имуносупресивног окружења на месту тумора (178).

Даље у овој студији, испитали смо могућу улогу фекалног Gal-1 као биомаркера у предикцији тежине болести. Нашли смо позитивну корелацију између вредности Gal-1 у фецесу и стадијума хистолошке диференцијације тумора и биомаркера AFP и CA19-9 (Табела 33 и Фигура 16). Занимљиво је да нисмо нашли корелацију серумског Gal-1 са истим параметрима и маркерима тежине болести. Такође, вредности Gal-1 у фецесу су око два до три пута веће него у серуму, што чини мерења у фецесу много сензитивнијим методом. Анализирањем ROC криве Gal-1 и параметара и маркера болести за колоректални карцином показано је да би Gal-1 могао предвидети слабо диферентовани тип тумора, са добром сензитивношћу и специфичношћу. Према нашим резултатима, фекални Gal-1 може бити користан маркер за тежину колоректалног карцинома.

Повећане локалне вредности Gal-1, које се огледају кроз вишу фекалну концентрацију, код пацијената са CRC-ом са већим нуклеарним градусом и слабом диференцијацијом туморског ткива могу се сматрати знацима прогресије тумора и, с тога, лоше прогнозе за пацијенте. Преминање Gal-1 у над проинфламацијским цитокинима TNF- α , IL-1 β и IFN- γ код пацијената са унапредовалом и прогресивном болешћу указује на имуномодулаторну улогу Gal-1 у ограничавању проинфламацијских процеса и спречавању снажног антитуморског имуноског одговора. Штавише, фецесне вредности Gal-1 могу се користити као вредан маркер за тежину CRC-а. Ова запажања упућују на могућу улогу фекалног Gal-1 као маркера CRC-а и његове потенцијалне употребе као терапеутске мете.

6. ЗАКЉУЧЦИ

Резултати приказани у овом раду по први пут указују на повећане локалне вредности Gal-1 и Gal-3 код пацијената са CRC-ом и већим нуклеарним градусом, лошом диференцијацијом туморског ткива и напредним TNM стадијумом болести. Преминација Gal-1 и Gal-3 у односу на проинфламацијске цитокине, код испитаника са напредном и прогресивном болешћу, може указати на имуномодулаторну улогу галектина у ограничавању континуираних проинфламацијских процеса и спречавању снажног антитуморског имунског одговора. Фекалне вредности Gal-1 и Gal-3 могу се користити као значајан маркер за тежину и прогресију CRC-а. Ови налази указују да Gal-1 и Gal-3 могу допринети имунолошкој привилегији тумора модулацијом локалног имунског одговора и указују на њихову потенцијалну употребу као терапеутских мета.

Закључак је изведен на основу следећих доказа:

1. Однос Gal-3/TNF- α у серуму као и фекални ниво Gal-3 били су значајно већи код пацијената са нуклеарним градусом III у односу на пацијенте са градусом I или II;
2. Оболели од CRC-а са већим нуклеарним градусом имају веће фецесне вредности Gal-1, системске вредности односа Gal-1/TNF- α као и фецесног односа Gal-1/IFN- γ ;
3. Фекални нивои Gal-3, Gal-1 и антиинфламацијских цитокина IL-10 и TGF- β били су знатно виши код пацијената са слабо диференцираним CRC-ом;
4. Мање системске вредности TNF- α , а веће односа Gal-3/TNF- α и Gal-1/TNF- α у серуму, као и веће вредности TGF- β , Gal-3 и односа Gal-3/TNF- α и Gal-1/TNF- α у фецесу оболелих са TNM стадијумима III+IV у поређењу са испитаницима са TNM стадијумима I+II;
5. Мање системске вредности TNF- α , а веће односа Gal-3/TNF- α и Gal-1/TNF- α детектоване су у оболелих од CRC-а са инвазијом лимфних, односно крвних судова;
6. Мање системске вредности TNF- α , а веће односа Gal-3/TNF- α , Gal-1/TNF- α и Gal-1/IFN- γ , уз мање фецесне вредности IL-1 β и веће Gal-3 регистроване су у

оболелих од CRC-а са детектибилним метастазама у јетри, односно плућима, односно перитонеалном карциноматозом;

7. Фецесне вредности Gal-3 позитивно корелирају са нуклеарним градусом, степеном диференцијације тумора, TNM стадијумом, присуством метастаза у јетри, присуством метастаза у плућима, присуством перитонеалне карциноматозе и туморским маркерима AFP и CEA;
8. Фецесне вредности Gal-1 позитивно корелирају са стадијумом хистолошке диференцијације и туморским маркерима AFP и CA 19-9.

7. СКРАЋЕНИЦЕ

CRC	(енгл. Colorectal cancer)
NIH	(енгл. National Institutes of Health)
UICC	(енгл. Union for International Cancer Control)
APC	(енгл. Adenomatous Polyposis Coli)
FAP	(енгл. Familial adenomatous polyposis)
HNPCC	(енгл. Hereditary nonpolyposis colon cancer syndrome)
BMI	(енгл. Body Mass Index)
CIMP	(енгл. CpG island methylator phenotype)
Th	(енгл. T helper)
NK	(енгл. Natural killer cell)
IFN-γ	(енгл. Interferon gamma)
TNF-α	(енгл. Tumor necrosis factor alpha)
IL	(енгл. Interleukin)
TGF-β	(енгл. Transforming growth factor-beta)
NLRs	(енгл. NOD-like receptors)
CAC	(енгл. Colitis associated cancer)
IBD	(енгл. Inflammatory bowel disease)
VEGF	(енгл. Vascular endothelial growth factor)
Gal-1	(енгл. Galectin-1)
Gal-3	(енгл. Galectin-3)
CEA	(енгл. Carcinoembryonic antigen)
MSI-H	(енгл. High microsatellite instability)
MCC	(енгл. Mucinous colorectal carcinoma)
SRCC	(енгл. Signet ring cell carcinoma)
TNM	(енгл. Tumor, Nodes, Metastases)
R	(енгл. Residual)
UICC/AJCC	(енгл. International Union Against Cancer/American Joint Committee on Cancer)
Tis	(енгл. Carcinoma in situ)
GITSG	(енгл. Gastrointestinal Tumor Study Group)
CT	(енгл. Computerized Tomography)
PET scan	(енгл. Positron emission tomography scanning)
FOBT	(енгл. Guaiac-based fecal occult blood test)
FIT	(енгл. Fecal immunochemical test)
MSDT	(енгл. Multitarget stool DNA test)
GCP	(енгл. Good Clinical Practice)

CRP	(енгл. C-reactive protein)
AFP	(енгл. Alpha-fetoprotein)
CA19-9	(енгл. Carbohydrate antigen 19-9)
sST2	(енгл. Soluble suppression of tumorigenicity-2)
WHO	(енгл. World Health Organization)
MTP	(енгл. Microtiter-plate)
Streptavidin-HRP	(енгл. Streptavidin horseradish peroxidase)
Tregs	(енгл. Regulatory T cells)
AGEs	(енгл. Advanced glycation end products)
RAGE	(енгл. Receptor for advanced glycation end products)
VEGF	(енг. Vascular endothelial growth factor)
VEGFR2	(енгл. Vascular endothelial growth factor receptor 2)
FCP	(енгл. Fecal calprotectin)
DCs	(енгл. Dendritic cells)
NF-κB	(енгл. Nuclear factor κB)
DNA	(енгл. Deoxyribonucleic acid)
ROS	(енгл. Reactive oxygen species)
IFNGR	(енгл. Interferon gamma receptor)
IRF2	(енгл. Interferon regulatory factor)
COX-2	(енгл. Cyclooxygenase-2)
PGE2	(енгл. Prostaglandin E2)
LPS	(енгл. Lipopolysaccharides)
IL-1R	(енгл. Interleukin receptor)
NOD2	(енгл. Nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 2)
STAT1	(енгл. Signal transducer and activator of transcription)
AOM	(енгл. Azoxymethane)
TLR	(енгл. Toll-like receptor)
TGF-βR	(енгл. Transforming growth factor-beta receptor)
DSS	(енгл. Dextran sodium sulphate)
TAA_s	(енгл. Tumor-associated antigens)
TIL_s	(енгл. Tumor-infiltrating lymphocytes)
Lamp_s	(енгл. Lysosome-associated membrane glycoproteins)

8. РЕФЕРЕНЦЕ

1. Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2013. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2013;63(1):11–30.
2. National Cancer Institute. Surveillance, Epidemiology, and End Results Program. SEER Stat Fact Sheets: Colon and Rectum Cancer. Available at <http://seer.cancer.gov/statfacts/html/colorect.html>. Accessed: January 30, 2018.
3. Siegel RL, Fedewa SA, Anderson WF, Miller KD, Ma J, Rosenberg PS, et al. Colorectal Cancer Incidence Patterns in the United States, 1974–2013. *J Natl Cancer Inst*. 28 February 2017. 109
4. Tomislav Dragovich, MD. Colon Cancer. Section of Hematology and Oncology. Jan 30, 2018. <https://emedicine.medscape.com/article/277496-overview>
5. Aune D, Chan DS, Lau R, et al. Dietary fibre, whole grains, and risk of colorectal cancer: systematic review and dose-response meta-analysis of prospective studies. *BMJ*. 2011 Nov 10. 343:d6617.
6. Harrison P. Proinflammatory Diet Contributes to CRC Risk in Both Sexes. *Medscape Medical News*. Available at <https://www.medscape.com/viewarticle/891665>. January 23, 2018; Accessed: January 30, 2018.
7. Tsoi KK, Pau CY, Wu WK, Chan FK, Griffiths S, Sung JJ. Cigarette smoking and the risk of colorectal cancer: a meta-analysis of prospective cohort studies. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2009 Jun. 7(6):682-688.e1-5.
8. Cho E, Lee JE, Rimm EB, Fuchs CS, Giovannucci EL. Alcohol consumption and the risk of colon cancer by family history of colorectal cancer. *Am J Clin Nutr*. 2012 Feb. 95(2):413-9.
9. Yuhara H, Steinmaus C, Cohen SE, Corley DA, Tei Y, Buffler PA. Is diabetes mellitus an independent risk factor for colon cancer and rectal cancer?. *Am J Gastroenterol*. 2011 Nov. 106(11):1911-21; quiz 1922.
10. Jacobs ET, Ahnen DJ, Ashbeck EL, Baron JA, Greenberg ER, Lance P, et al. Association between body mass index and colorectal neoplasia at follow-up colonoscopy: a pooling study. *Am J Epidemiol*. 2009 Mar 15. 169(6):657-66.
11. Morikawa T, Kuchiba A, Lochhead P, et al. Prospective Analysis of Body Mass Index, Physical Activity, and Colorectal Cancer Risk Associated with β -Catenin (CTNNB1) Status. *Cancer Res*. 2013 Mar 1. 73(5):1600-10.

12. De la Chapelle A. Genetic predisposition to colorectal cancer. *Nat Rev Cancer* (2004) 4:769–80.
13. Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, et al. Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med*. 1988 Sep 1. 319(9):525-32.
14. Vasovcak P, Pavlikova K, Sedlacek Z, Skapa P, Kouda M, Hoch J, et al. Molecular genetic analysis of 103 sporadic colorectal tumours in Czech patients. *PLoSOne* (2011) 6:e24114.10.1371/journal.pone.0024114
15. 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.
16. Jass JR, Whitehall VL, Young J, Leggett BA. Emerging concepts in colorectal neoplasia. *Gastroenterology* 2002; 123: 862-76.
17. Perea J, Lomas M, Hidalgo M. Molecular basis of colorectal cancer: Towards an individualized management? *Rev Esp Enferm Dig* 2011; 103: 29-35.
18. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990; 61: 759.
19. Worthley DL, Leggett BA. Colorectal cancer: Molecular features and clinical opportunities. *Clin Biochem Rev* 2010; 31: 31-8.
20. Markowitz SD, Bertagnolli MM. Molecular Basis of Colorectal Cancer. *N Engl J Med* 2009; 361: 2449-2460.
21. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Cellular and molecular immunology. Seventh edition, Elsevier 2012; 225-243.
22. 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.
23. Müller H and Schwarz MJ. Immune System and Schizophrenia. *Curr Immunol Rev* 2010; 6: 213–220.
24. 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.
25. 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.
26. 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.
 27. 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.
 28. 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.
 29. 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.
 30. Miossec P, Korn T, Kuchroo V. Interleukin-17 and type 17 helper T cells. *N Engl J Med* 2009; 361: 888–898.
 31. 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.
 32. Elaraj DM, Weinreich DM, Varghese S, Puhlmann M, Hewitt SM, Carroll NM, et al. The role of interleukin 1 in growth and metastasis of human cancer xenografts. *Clin Cancer Res* (2006) 12:1088–96.10.1158/1078-0432.CCR-05-1603
 33. Viet HT, Wagsater D, Hugander A, Dimberg J. Interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphism in human colorectal cancer. *Oncol Rep* (2005) 14:915–8.10.3892/or.14.4.915
 34. Marszalek A, Szyberg L, Wisniewska E, Janiczek M. Impact of COX-2, IL-1beta, TNF-alpha, IL-4 and IL-10 on the process of carcinogenesis in the large bowel. *Pol J Pathol* (2012) 63:221–7.10.5114/pjp.2012.32768
 35. Kantola T, Klintrup K, Vayrynen JP, Vornanen J, Bloigu R, Karhu T, et al. Stage-dependent alterations of the serum cytokine pattern in colorectal carcinoma. *Br J Cancer* (2012) 107:1729–36.10.1038/bjc.2012.456
 36. Waldner MJ, Foersch S, Neurath MF. Interleukin-6 – a key regulator of colorectal cancer development. *Int J Biol Sci* (2012) 8:1248–53.10.7150/ijbs.4614
 37. Komoda H, Tanaka Y, Honda M, Matsuo Y, Hazama K, Takao T. Interleukin-6 levels

- in colorectal cancer tissues. *World J Surg* (1998) 22:895–8.10.1007/s002689900489
38. Maihofner C, Charalambous MP, Bhambra U, Lightfoot T, Geisslinger G, Gooderham NJ, et al. Expression of cyclooxygenase-2 parallels expression of interleukin-1beta, interleukin-6 and NF-kappaB in human colorectal cancer. *Carcinogenesis*
 39. Chung YC, Chang YF. Serum interleukin-6 levels reflect the disease status of colorectal cancer. *J Surg Oncol* (2003) 83:222–6.
 40. Belluco C, Nitti D, Frantz M, Toppan P, Basso D, Plebani M, et al. Interleukin-6 blood level is associated with circulating carcinoembryonic antigen and prognosis in patients with colorectal cancer. *Ann Surg Oncol* (2000) 7:133–8.
 41. Heits F, Stahl M, Ludwig D, Stange EF, Jelkmann W. Elevated serum thrombopoietin and interleukin-6 concentrations in thrombocytosis associated with inflammatory bowel disease. *J Interferon Cytokine Res* (1999) 19:757–60.
 42. Atreya R, Mudter J, Finotto S, Mullberg J, Jostock T, Wirtz 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) 6:583–8.
 43. Asfaha S, Dubeykovskiy AN, Tomita H, Yang X, Stokes S, Shibata W, et al. Mice that express human interleukin-8 have increased mobilization of immature myeloid cells, which exacerbates inflammation and accelerates colon carcinogenesis. *Gastroenterology* (2013) 144:155–66.
 44. Lurje G, Zhang W, Schultheis AM, Yang D, Groshen S, Hendifar AE, et al. Polymorphisms in VEGF and IL-8 predict tumor recurrence in stage III colon cancer. *Ann Oncol* (2008) 19:1734–41.
 45. Lv X, Wang X. The role of interleukin-9 in lymphoma. *Leuk Lymphoma* (2013) 54:1367–72.10.3109/10428194.2012.745072
 46. Purwar R, Schlapbach C, Xiao S, Kang HS, Elyaman W, Jiang X, et al. Robust tumor immunity to melanoma mediated by interleukin-9-producing T cells. *Nat Med* (2012) 18:1248–53.10.1038/nm.2856
 47. Fang Y, Chen X, Bai Q, Qin C, Mohamud AO, Zhu Z, et al. IL-9 inhibits HTB-72 melanoma cell growth through upregulation of p21 and TRAIL. *J Surg Oncol* (2015) 111:969–74.10.1002/jso.23930
 48. Huang Y, Cao Y, Zhang S, Gao F. Association between low expression levels of interleukin-9 and colon cancer progression. *Exp Ther Med* (2015) 10:942–

6.10.3892/etm.2015.2588

49. Kim HJ, Jeon HK, Cho YJ, Park YA, Choi JJ, Do IG, et al. High galectin-1 expression correlates with poor prognosis and is involved in epithelial ovarian cancer proliferation and invasion. *Eur J Cancer*. 2012; 48:1914-21
50. Zhang P, Zhang P, Shi B, Zhou M, Jiang H, Zhang H, et al. galectin-1 overexpression promotes progression and chemoresistance to cisplatin in epithelial ovarian cancer. *Cell Death Dis*. 2014; 5: e991
51. Ouyang J, Plütschow A, Pogge von Strandmann E, Reiners KS, Ponader S, Rabinovich GA, et al. Galectin-1 serum levels reflect tumor burden and adverse clinical features in classical Hodgkin lymphoma. *Blood*. 2013; 121: 3431-3
52. Chen L, Yao Y, Sun L, Zhou J, Liu J, Wang J, et al. Clinical implication of the serum galectin-1 expression in epithelial ovarian cancer patients. *J Ovarian Res*. 2015; 8: 78
53. Al-Salam S, Hashmi S. Galectin-1 in early acute myocardial infarction. *PLoS One*. 2014; 9: e86994. doi: 10.1371/journal.pone.0086994.
54. Nakahara S, Raz A. Biological modulation by lectins and their ligands in tumor progression and metastasis. *Anticancer Agents Med Chem*. 2008; 8: 22-36
55. Camby I, Le Mercier M, Lefranc F, Kiss R. Galectin-1: a small protein with major functions. *Glycobiology*. 2006; 16: 137-157
56. Spano D, Russo R, Di Maso V, Rosso N, Terracciano LM, Roncalli M, et al. Galectin-1 and its involvement in hepatocellular carcinoma aggressiveness. *Mol Med*. 2010; 16: 102-15
57. Almkvist, J. and Karlsson, A. Galectins as inflammatory mediators. *Glycoconj. J*. 2004; 19: 575-581
58. Blaser, C, Kaufmann, M, Muller, C, Zimmermann, C, Wells, V, Mallucci, L, et al. Beta-galactoside-binding protein secreted by activated T cells inhibits antigen-induced proliferation of T cells. *Eur. J. Immunol*. 1998; 28: 2311-2319
59. He, J. and Baum, L.G. Presentation of galectin-1 by extracellular matrix triggers T cell death. *J. Biol. Chem*. 2004; 279: 4705-4712
60. Allione, A, Wells, V, Forni, G, Mallucci, L, and Novelli, F. Betagalactoside-binding protein (beta GBP) alters the cell cycle, upregulates expression of the alpha- and beta-chains of the IFN-gamma receptor, and triggers IFN-gamma-mediated apoptosis of activated human T lymphocytes. *J. Immunol*. 1998; 161: 2114-2119
61. Baum L.G, Blackall DP, Arias-Magallano S, Nanigian D, Uh SY, Browne JM, et al.

- Amelioration of graft versus host disease by galectin-1. *Clin. Immunol.* 2003; 109: 295-307
62. Santucci, L, Fiorucci, S, Rubinstein, N, Mencarelli, A, Palazzetti, B, Federici, B, et al. Galectin-1 suppresses experimental colitis in mice. *Gastroenterology.* 2003; 124: 1381-1394
63. Van der Leij, J, van den Berg, A, Blokzijl, T, Harms, G, van Goor, H, Zwiers, P, van Weeghel, R, Poppema, S, and Visser, L. Dimeric galectin-1 induces IL-10 production in T-lymphocytes: an important tool in the regulation of the immune response. *J. Pathol.* 2004; 204: 511-518
64. Van den Brule, FA, Waltregny, D, and Castronovo, V. Increased expression of galectin-1 in carcinoma-associated stroma predicts poor outcome in prostate carcinoma patients. *J. Pathol* 2001; 193: 80-87.
65. Camby I, Le Mercier M, Lefranc F, Kiss R. Galectin-1: a small protein with major functions. *Glycobiology.* 2006; 16: 137-157.
66. Larsen L, Chen HY, Saegusa J, et al.: Galectin-3 and the skin. *J Dermatol Sci* 2011;64:85-91.
67. Chen HY, Liu FT, Yang RY: Roles of galectin-3 in immune responses. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2005;53:497-504.
68. Desmedt V, Desmedt S, Delanghe JR, et al.: Galectin-3 in Renal Pathology: More Than Just an Innocent Bystander. *Am J Nephrol* 2016;43:305-17.
69. Lukic R, Gajovic N, Jovanovic I, et al.: Potential Hepatoprotective Role of Galectin-3 during HCV Infection in End-Stage Renal Disease Patients. *Dis Markers* 2017;2017:6275987.
70. Endo K, Kohnoe S, Tsujita E, et al.: Galectin-3 expression is a potent prognostic marker in colorectal cancer. *Anticancer Res* 2005;25:3117-21.
71. Wu KL, Huang EY, Yeh WL, et al.: Synergistic interaction between galectin-3 and carcinoembryonic antigen promotes colorectal cancer metastasis. *Oncotarget* 2017;8:61935-61943.
72. Johnson KD, Glinskii OV, Mossine VV, et al.: Galectin-3 as a potential therapeutic target in tumors arising from malignant endothelia. *Neoplasia* 2007;9:662-70.
73. Nangia-Makker P, Balan V, Raz A.: Regulation of tumor progression by extracellular galectin-3. *Cancer Microenviron* 2008;1:43-51.
74. Zidi I, Mestiri S, Bartegi A, Amor NB. TNF-alpha and its inhibitors in cancer. *Med*

Oncol. 2010;27:185–198.

75. Yan B, Wang H, Rabbani ZN, Zhao Y, Li W, Yuan Y, Li F, Dewhirst MW, Li CY. Tumor necrosis factor-alpha is a potent endogenous mutagen that promotes cellular transformation. *Cancer Res.* 2006;66:11565–11570.
76. Klampfer L. CYTOKINES, INFLAMMATION AND COLON CANCER. *Current cancer drug targets.* 2011;11(4):451-464.
77. Balkwill F. Tumour necrosis factor and cancer. *Nat Rev Cancer.* 2009;9:361–371.
78. Grimm M, Lazariotou M, Kircher S, Höfelmayr A, Germer CT, von Rahden BH, Waaga-Gasser AM, Gasser M. Tumor necrosis factor- α is associated with positive lymph node status in patients with recurrence of colorectal cancer-indications for anti-TNF- α agents in cancer treatment. *Cell Oncol (Dordr)* 2011;34:315–326.
79. Slattery, Martha L. et al. “Interferon-Signaling Pathway: Associations with Colon and Rectal Cancer Risk and Subsequent Survival.” *Carcinogenesis* 32.11 (2011): 1660–1667. PMC. Web. 6 Apr. 2018.
80. Talseth BA, et al. Lack of association between genetic polymorphisms in cytokine genes and disease expression in patients with hereditary non-polyposis colorectal cancer. *Scand. J. Gastroenterol.* 2007;42:628–632.
81. Lee YS, et al. Association between interleukin-4R and TGF-beta1 gene polymorphisms and the risk of colorectal cancer in a Korean population. *Colorectal Dis.* 2010;12:1208–1212.
82. Thornberry NA, Bull HG, Calaycay JR, Chapman KT, Howard AD, Kostura MJ, Miller DK, Molineaux SM, Weidner JR, Aunins J. A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta processing in monocytes. *Nature.* 1992;356:768–774.
83. Hsu LC, Ali SR, McGillivray S, Tseng PH, Mariathasan S, Humke EW, Eckmann L, Powell JJ, Nizet V, Dixit VM, Karin M. A NOD2-NALP1 complex mediates caspase-1-dependent IL-1beta secretion in response to *Bacillus anthracis* infection and muramyl dipeptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2008;105:7803–7808.
84. Kumar A, Commane M, Flickinger TW, Horvath CM, Stark GR. Defective TNF-alpha-induced apoptosis in STAT1-null cells due to low constitutive levels of caspases. *Science.* 1997;278:1630–1632.
85. Joshi VD, Kalvakolanu DV, Chen W, Zhang L, Kang TJ, Thomas KE, Vogel SN, Cross AS. A role for Stat1 in the regulation of lipopolysaccharide-induced interleukin-

- 1beta expression. *J. Interferon Cytokine Res.* 2006;26:739–747.
86. Kaler P, Augenlicht L, Klampfer L. Macrophage-derived IL-1beta stimulates Wnt signaling and growth of colon cancer cells: a crosstalk interrupted by vitamin D(3) *Oncogene.* 2009
87. Uronis JM, Muhlbauer M, Herfarth HH, Rubinas TC, Jones GS, Jobin C. Modulation of the intestinal microbiota alters colitis-associated colorectal cancer susceptibility. *PLoS ONE.* 2009;4:e6026.
88. Abtahi S, Davani F, Mojtahedi Z, et al. Dual association of serum interleukin-10 levels with colorectal cancer. *J Cancer Res Ther* 2017;13:252-256.
89. Ikushima H, Miyazono K. TGFbeta signalling: a complex web in cancer progression. *Nat Rev Cancer.* 10:415–424.
90. Becker C, Fantini MC, Schramm C, Lehr HA, Wirtz S, Nikolaev A, Burg J, Strand S, Kiesslich R, Huber S, Ito H, Nishimoto N, Yoshizaki K, Kishimoto T, Galle PR, Blessing M, Rose-John S, Neurath MF. TGF-beta suppresses tumor progression in colon cancer by inhibition of IL-6 trans-signaling. *Immunity.* 2004;21:491–501.
91. Hugen N, Brown G, Glynn-Jones R, et al. Advances in the care of patients with mucinous colorectal cancer. *Nature Reviews Clinical Oncology* 2015.
92. Matthew Fleming, Sreelakshmi Ravula, Sergei F. Tatishchev, and Hanlin L. Wang Colorectal carcinoma: Pathologic aspects *J Gastrointest Oncol.* 2012; 3(3): 153–173
93. Sedat Belli, Huseyin Ozgur Aytac, Erdal Karagulle, Hakan Yabanoglu, Fazilet Kayaselcuk, and Sedat Yildirim. Outcomes of Surgical Treatment of Primary Signet Ring Cell Carcinoma of the Colon and Rectum: 22 Cases Reviewed With Literature *Int Surg.* 2014; 99(6).
94. Compton C, Fenoglio-Preiser CM, Pettigrew N, Fielding LP. American joint committee on cancer prognostic factors consensus conference: colorectal working group. *Cancer* 2000; 88(7): 1739–57.
95. Jass JR, O'Brien J, Riddell RH, Snover DC. Recommendations for the reporting of surgically resected specimens of colorectal carcinoma: association of directors of anatomic and surgical pathology. *Am J Clin Pathol* 2008;129(1):13–23.
96. Sobin LH, Wittekind C. TNM classification of malignant tumors. 6th ed. New York: WileyLiss;2003.
97. Kjellmo A, Drolsum A. Diagnosis and staging of colorectal cancer. *Tidsskr Nor Laegeforen* 2007;127(21):2824–8.
98. Compton CC, Fielding LP, Burgart LJ, Conley B, Cooper HS, Hamilton SR, et al.

- Prognostic factor in colorectal cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999. *Arch Pathol Lab Med* 2000; 124(7):979–94.
99. Jass JR. Classification of colorectal cancer based on correlation of clinical, morphological and molecular features. *Histopathology* 2007;50(1):113-30.
100. Bajwa A, Blunt N, Suliman I, Bridgewater J, Hochhauser D, et al. Primary tumour resection and survival in the palliative management of metastatic colorectal cancer. *Eur J Surg Oncol* 2009; 35(2):164–7.
101. Allen DC. *Histopathology reporting. Guidelines for surgical cancer*. 2nd ed. London: Springer-Verlag; 2006. p. 14–28.
102. Republička stručna komisija za izradu i implementaciju vodiča dobre kliničke prakse. Vodič za dijagnostikovanje i lečenje raka kolona i rektuma [Internet]. 2013 [cited 2016 May 16]; Available from: http://www.zdravlje.gov.rs/downloads/2013/Novembar/Vodic_Za_Dijagnostikovanje_I_Le_cenje_Raka_Kolona_I_Rektuma.pdf
103. Zlobec I, Lugli A. Prognostic and predictive factors in colorectal cancer. *J Clin Pathol* 2008 May;61(5):561-9.
104. Thirunavukarasu P, Sukumar S, Sathaiyah M, Mahan M, Pragatheeshwar KD, Pingpank JF, et al. C-stage in Colon Cancer: Implications of Carcinoembryonic Antigen Biomarker in Staging, Prognosis, and Management. *J Natl Cancer Inst.* 2011 Apr 20. 103(8):689-97.
105. [Guideline] Sepulveda AR, Hamilton SR, Allegra CJ, Grody W, Cushman-Vokoun AM, Funkhouser WK, et al. Molecular Biomarkers for the Evaluation of Colorectal Cancer: Guideline From the American Society for Clinical Pathology, College of American Pathologists, Association for Molecular Pathology, and the American Society of Clinical Oncology. *J Clin Oncol.* 2017 May 1. 35 (13):1453-1486.
106. Tournigand C, Andre T, Achille E, et al. FOLFIRI followed by FOLFOX6 or the reverse sequence in advanced colorectal cancer: a randomized GERCOR study. *J Clin Oncol.* 2004 Jan 15. 22(2):229-37.
107. Lieberman DA, Rex DK, Winawer SJ, Giardiello FM, Johnson DA, Levin TR. Guidelines for colonoscopy surveillance after screening and polypectomy: a consensus update by the US Multi-Society Task Force on Colorectal Cancer. *Gastroenterology.* 2012 Sep. 143(3):844-57.
108. Heidenhain M. Noch einmal über die darstellung der centralkörper durch

eisnamatoxylin nebst einigen allgemeinen bemerkungen uber die hamatoxylinfarben.
Z Wiss Mikrosk 1896; 13: 186.

109. Gurr AB. Biological staining methods. Hopkin and Williams Chadowell Heath 1976.
110. 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. 110–111.
111. 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.
112. Understanding Your Pathology Report: Colon Cancer. Vachani C, Di Lullo G, and Giantonio BJ. Abramson Cancer Center of the University of Pennsylvania Last Modified: June 26, 2013.
113. Heilmann RM, Cranford SM, Ambrus A, et al. Validation of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the measurement of canine S100A12. Vet Clin Pathol. 2016; 45: 135-47.
114. Prakash N, Stumbles P, Mansfield C. Initial Validation of Cytokine Measurement by ELISA in Canine Feces. Open Journal of Veterinary Medicine, 2013; 3: 282-288.
115. Jovanovic M, Zdravkovic N, Jovanovic I, Radosavljevic G, Gajovic N, Zdravkovic N, Maric V, Arsenijevic N. TGF- β as a marker of ulcerative colitis and disease severity. Ser J Exp Clin Res DOI: 10.1515/sjecr-2017-0019
116. Zdravkovic N, Pavlovic M, Radosavljevic G, Jovanovic M, Arsenijevic A, Zdravkovic N, Maric V, Loncarevic S, Srzentic Z, Jovanovic I. Serum levels of immunosuppressive cytokines and tumor markers in metastatic colorectal carcinoma. JBUON 2017; 22: 1-8.
117. Wu J, Cai Q, Li H, et al. Circulating C-reactive protein and colorectal cancer risk: a report from the Shanghai Men's Health Study. Carcinogenesis. 2013;34(12):2799-2803. doi:10.1093/carcin/bgt288.
118. Fu K, Kobayashi A, Saito N, et al. Alpha-fetoprotein-producing colon cancer with atypical bulky lymph node metastasis. World Journal of Gastroenterology : WJG. 2006;12(47):7715-7716. doi:10.3748/wjg.v12.i47.7715.
119. Marwan G. Fakh, MD, Aruna Padmanabhan, MD. CEA Monitoring in Colorectal Cancer. Oncology Journal, Colorectal Cancer, Gastrointestinal Cancer. May 1, 2006.
120. Vukobrat-Bijedic Z, Husic-Selimovic A, Sofic A, et al. Cancer Antigens (CEA and

- CA 19-9) as Markers of Advanced Stage of Colorectal Carcinoma. *Medical Archives*. 2013;67(6):397-401. doi:10.5455/medarh.2013.67.397-401.
121. Formica V, Cereda V, Nardecchia A, et al.: Immune reaction and colorectal cancer: friends or foes? *World J Gastroenterol* 2014;20:12407-19.
122. Johansson M, Denardo DG, Coussens LM.: Polarized immune responses differentially regulate cancer development. *Immunol Rev* 2008;222:145-54.
123. Pernot S, Terme M, Voron T, et al.: Colorectal cancer and immunity: what we know and perspectives. *World J Gastroenterol* 2014;20:3738-50.
124. Kitajima M, Ito T, Tumes DJ, et al: Memory type 2 helper T cells induce long-lasting antitumor immunity by activating natural killer cells. *Cancer Res* 2011;71:4790-8.
125. Kanazawa M, Yoshihara K, Abe H, et al.: Effects of PSK on T and dendritic cells differentiation in gastric or colorectal cancer patients. *Anticancer Res* 2005;25:443-9.
126. Agarwal A, Verma S, Burra U, et al.: Flow cytometric analysis of Th1 and Th2 cytokines in PBMCs as a parameter of immunological dysfunction in patients of superficial transitional cell carcinoma of bladder. *Cancer Immunol Immunother* 2006;55:734-43.
127. Zdravkovic N, Pavlovic M, Radosavljevic G, et al. Serum levels of immunosuppressive cytokines and tumor markers in metastatic colorectal carcinoma. *JBUON* 2017; 22: 1-8.
128. Mager LF, Wasmer M-H, Rau TT, Krebs P. Cytokine-Induced Modulation of Colorectal Cancer. *Frontiers in Oncology*. 2016;6:96. doi:10.3389/fonc.2016.00096.
129. Johnson KD, Glinskii OV, Mossine VV, et al.: Galectin-3 as a potential therapeutic target in tumors arising from malignant endothelia. *Neoplasia* 2007;9:662-70.
130. Nangia-Makker P, Balan V, Raz A.: Regulation of tumor progression by extracellular galectin-3. *Cancer Microenviron* 2008;1:43-51.
131. Hannah Barrow, Jonathan M. Rhodes and Lu-Gang Yu. The role of galectins in colorectal cancer progression. *International Journal of Cancer*: 129, 1–8 (2011).
132. Endo K, Kohnoe S, Tsujita E, et al.: Galectin-3 expression is a potent prognostic marker in colorectal cancer. *Anticancer Res* 2005;25:3117-21.
133. Tao L, Jin L, Dechun L, et al.: Galectin-3 Expression in Colorectal Cancer and its Correlation with Clinical Pathological Characteristics and Prognosis. *Open Med (Wars)* 2017;12:226-230.
134. Lu W, Wang J, Yang G, et al.: Posttranscriptional regulation of Galectin-3 by miR-

- 128 contributes to colorectal cancer progression. *Oncotarget* 2017;8:15242-15251.
135. Heilmann RM, Cranford SM, Ambrus A, et al (2016) Validation of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the measurement of canine S100A12. *Vet Clin Pathol* 45: 135-47
136. Tsuboi K, Shimura T, Masuda N, et al.: Galectin-3 expression in colorectal cancer: relation to invasion and metastasis. *Anticancer Res* 2007;27:2289-96.
137. Wagner M, Peterson CG, Ridefelt P, et al.: Fecal markers of inflammation used as surrogate markers for treatment outcome in relapsing inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2008;14:5584-9.
138. Tibble JA, Sigthorsson G, Bridger S, et al.: Surrogate markers of intestinal inflammation are predictive of relapse in patients with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2000;119:15-22.
139. Assche GV.: Fecal biomarkers for the diagnosis and management of inflammatory bowel disease. *Gastroenterol Hepatol (N Y)* 2011;7:396-8.
140. Rutka M, Bor R, Bálint A, et al: Diagnostic Accuracy of Five Different Fecal Markers for the Detection of Precancerous and Cancerous Lesions of the Colorectum. *Mediators Inflamm* 2016;2016:2492081.
141. Desmedt V, Desmedt S, Delanghe JR, et al.: Galectin-3 in Renal Pathology: More Than Just an Innocent Bystander. *Am J Nephrol* 2016;43:305-17.
142. Krane V, Wanner C.: The metabolic burden of diabetes and dyslipidaemia in chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant* 2002;17 Suppl 11:23-7.
143. Goldin A, Beckman JA, Schmidt AM, et al.: Advanced glycation end products: sparking the development of diabetic vascular injury. *Circulation* 2006;114:597-605.
144. Nomoto K, Tsuneyama K, Abdel Aziz HO, et al.: Disrupted galectin-3 causes non-alcoholic fatty liver disease in male mice. *J Pathol.* 2006;210(4):469-77.
145. Chen HY, Fermin A, Vardhana S, et al: Galectin-3 negatively regulates TCR-mediated CD4+ T-cell activation at the immunological synapse. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(34):14496-501.
146. Peng W, Wang HY, Miyahara Y, et al.: Tumor-associated galectin-3 modulates the function of tumor-reactive T cells. *Cancer Res.* 2008;68:7228-36.
147. Wu KL, Huang EY, Jhu EW, et al.: Overexpression of galectin-3 enhances migration of colon cancer cells related to activation of the K-Ras-Raf-Erk1/2 pathway. *J Gastroenterol.* 2013;48:350-9.

148. Fortuna-Costa A, Gomes AM, Kozlowski EO, et al.: Extracellular galectin-3 in tumor progression and metastasis. *Front Oncol.* 2014;16;4:138.
149. Wu KL, Huang EY, Yeh WL, Hsiao CC, Kuo CM.: Synergistic interaction between galectin-3 and carcinoembryonic antigen promotes colorectal cancer metastasis. *Oncotarget* 2017; 8: 61935-61943.
150. Cvejic D, Savin S, Golubovic S, Paunovic I, Tatic S et al.: Galectin-3 and carcinoembryonic antigen expression in medullary thyroid carcinoma: possible relation to tumour progression. *Histopathology* 2000; 37: 530-5.
151. Wu MH, Hong TM, Cheng HW, Pan SH, Liang YR, Hong HC, et al. Galectin-1-mediated tumor invasion and metastasis, up-regulated matrix metalloproteinase expression, and reorganized actin cytoskeletons. *Mol Cancer Res* 2009; 7: 311-318.
152. Thijssen VL, Postel R, Brandwijk RJ, Dings RP, Nesmelova I, Satijn S, et al. Galectin-1 is essential in tumor angiogenesis and is a target for antiangiogenesis therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103: 15975-15980
153. Tang D, Gao J, Wang S, Yuan Z, Ye N, Chong Y, et al. Apoptosis and anergy of T cell induced by pancreatic stellate cells-derived galectin-1 in pancreatic cancer. *Tumour Biol* 2015; 36: 5617-5626
154. Grosset AA, Labrie M, Vladoiu MC, Yousef EM, Gaboury L, St-Pierre Y. Galectin signatures contribute to the heterogeneity of breast cancer and provide new prognostic information and therapeutic targets. *Oncotarget.* 2016; 7: 18183-203. doi: 10.18632/oncotarget.7784.
155. Astorgues-Xerri L, Riveiro ME, Tijeras-Raballand A, Serova M, Rabinovich GA, Bieche I, et al. OTX008, a selective small-molecule inhibitor of galectin-1, downregulates cancer cell proliferation, invasion and tumour angiogenesis. *Eur J Cancer.* 2014; 50: 2463-77
156. Jung EJ, Moon HG, Cho BI, Jeong CY, Joo YT, Lee YJ, et al. Galectin-1 expression in cancer-associated stromal cells correlates tumor invasiveness and tumor progression in breast cancer. *Int J Cancer.* 2007 Jun 1;120(11):2331-8.
157. Croci DO, Salatino M, Rubinstein N, Cerliani JP, Cavallin LE, Leung HJ, et al. Disrupting galectin-1 interactions with N-glycans suppresses hypoxia-driven angiogenesis and tumorigenesis in Kaposi's sarcoma. *J Exp Med* 2012; 209: 1985-2000
158. Brandt B, Abou-Eladab EF, Tiedge M and Walzel H. Role of the JNK/c-Jun/AP-1

- signaling pathway in galectin-1-induced T-cell death. *Cell Death Dis* 2010; 1: e23
159. Barondes SH, Castronovo V, Cooper DN, Cummings RD, Drickamer K, Feizi T, et al. Galectins: a family of animal beta-galactoside-binding lectins. *Cell* 1994; 76: 597-598
160. D'Haene N, Sauvage S, Maris C, Adanja I, Le Mercier M, Decaestecker C, et al. VEGFR1 and VEGFR2 involvement in extracellular galectin-1- and galectin-3-induced angiogenesis. *PLoS One* 2013; 8: e67029
161. Suzuki O and Abe M. Galectin-1-mediated cell adhesion, invasion and cell death in human anaplastic large cell lymphoma: regulatory roles of cell surface glycans. *Int J Oncol* 2014; 44: 1433-1442.
162. Kim HJ, Jeon HK, Cho YJ, Park YA, Choi JJ, Do IG, et al. High galectin-1 expression correlates with poor prognosis and is involved in epithelial ovarian cancer proliferation and invasion. *Eur J Cancer*. 2012; 48:1914-21.
163. Zhang P, Zhang P, Shi B, Zhou M, Jiang H, Zhang H, et al. galectin-1 overexpression promotes progression and chemoresistance to cisplatin in epithelial ovarian cancer. *Cell Death Dis*. 2014; 5: e991
164. Ouyang J, Plütschow A, Pogge von Strandmann E, Reiners KS, Ponader S, Rabinovich GA, et al. Galectin-1 serum levels reflect tumor burden and adverse clinical features in classical Hodgkin lymphoma. *Blood*. 2013; 121: 3431-3
165. Chen L, Yao Y, Sun L, Zhou J, Liu J, Wang J, et al. Clinical implication of the serum galectin-1 expression in epithelial ovarian cancer patients. *J Ovarian Res*. 2015; 8: 78
166. Wagner M, Peterson CG, Ridefelt P, Sangfelt P, Carlson M. Fecal markers of inflammation used as surrogate markers for treatment outcome in relapsing inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*. 2008 Sep 28;14(36):5584-9; discussion 5588.
167. Tibble J. A., Sigthorsson G., Bridger S., Fagerhol M. K., Bjarnason I. Surrogate markers of intestinal inflammation are predictive of relapse in patients with inflammatory bowel disease *Gastroenterology* 2000; 119: 15-22.
168. Johne B, Kronborg O, Tøn HI, Kristinsson J, Fuglerud P. A new fecal calprotectin test for colorectal neoplasia. Clinical results and comparison with previous method. *Scand J Gastroenterol*. 2001;36(3):291-6.
169. Borovcanin M, Jovanovic I, Radosavljevic G, Djukic Dejanovic S, Stefanovic V, Arsenijevic N, Lukic ML. Antipsychotics can modulate the cytokine profile in schizophrenia: attenuation of the type-2 inflammatory response. *Schizophr*

Res.2013;147(1):103-9.

170. Almkvist, J. and Karlsson, A. Galectins as inflammatory mediators. *Glycoconj. J.* 2004; 19: 575-81.
171. Blaser, C, Kaufmann, M, Muller, C, Zimmermann, C, Wells, V, Mallucci, L, et al. Beta-galactoside-binding protein secreted by activated T cells inhibits antigen-induced proliferation of T cells. *Eur. J. Immunol.* 1998; 28: 2311-19.
172. He, J. and Baum, L.G. Presentation of galectin-1 by extracellular matrix triggers T cell death. *J. Biol. Chem.* 2004; 279: 4705-12.
173. Allione, A, Wells, V, Forni, G, Mallucci, L, and Novelli, F. Betagalactoside-binding protein (beta GBP) alters the cell cycle, upregulates expression of the alpha- and beta-chains of the IFN-gamma receptor, and triggers IFN-gamma-mediated apoptosis of activated human T lymphocytes. *J. Immunol.* 1998; 161: 2114-2119
174. Baum L.G, Blackall DP, Arias-Magallano S, Nanigian D, Uh SY, Browne JM, et al. Amelioration of graft versus host disease by galectin-1. *Clin. Immunol.* 2003; 109: 295-307
175. Santucci, L, Fiorucci, S, Rubinstein, N, Mencarelli, A, Palazzetti, B, Federici, B, et al. Galectin-1 suppresses experimental colitis in mice. *Gastroenterology.* 2003; 124: 1381-94.
176. van der Leij, J, van den Berg, A, Blokzijl, T, Harms, G, van Goor, H, Zwiers, P, van Weeghel, R, Poppema, S, and Visser, L. Dimeric galectin-1 induces IL-10 production in T-lymphocytes: an important tool in the regulation of the immune response. *J. Pathol.* 2004; 204: 511-518
177. van den Brule, FA, Waltregny, D, and Castronovo, V. Increased expression of galectin-1 in carcinoma-associated stroma predicts poor outcome in prostate carcinoma patients. *J. Pathol* 2001; 193: 80-87.
178. Camby I, Le Mercier M, Lefranc F, Kiss R. Galectin-1: a small protein with major functions. *Glycobiology.* 2006; 16: 137-157.

9. ПРИЛОГ

9.1. 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:

Милан М. Јовановић

АУ

Ментор/коментор

Проф. др Дарко Мирковић

Наслов рада:

Колоректални карцином: Значај концентрација цитокина у серуму и фецесу за процену тежине болести

Језик публикације:

Српски (ћирилица)

ЈП

Језик извода: ЈИ	Српски/енглески
Земља публикавања: ЗП	Србија
Уже географско подручје: УГП	Србија
Година: ГО	2018.
Издавач: ИЗ	Ауторски репринт
Место и адреса: МС	34000 Крагујевац, Србија Светозара Марковића 69
Физички опис рада: ФО	Дисертација има 128 страна, 8 поглавља, 35 табела, 16 фигура и 178 референци
Научна област:	Медицина
Научна дисциплина: ДИ	Клиничка и експериментална хирургија
Предметна одредница/кључне речи:	Колоректални карцином, тежина болести, имунски одговор

УДК:

Чува се:

ЧУ

У Библиотеци Факултета медицинских наука у
Крагујевцу, 34000 Кагујевац Србија, Светозара
Марковића 69

Важна напомена:

МН

Извод:

ИД

Колоректални карцином (engl. Colorectal carcinoma- CRC) је један од најчесталијих карцинома на свету. CRC се често дијагностикује у узрадовалим стадијумима са лошом прогнозом, указујући на потребу за новим дијагностичким и прогностичким маркерима.

Циљ студије био је да се испита повезаност вредности цитокина у серуму и фецесу са стадијумом болести и клиничко-патолошким карактеристикама, код пацијената са колоректалним карциномом.

Детектована је значајно већа фецесна концентрација Gal-3 код пацијената са CRC-ом са већом нуклеарним градусом, слабом диференцијацијом туморског ткива, већим TNM стадијумом и метастатском болешћу, док је преминација Gal-3 над проинфламацијским цитокинима забележена код пацијената са узрадовалим TNM стадијумом и метастатском болести. Фецесни Gal-3 позитивно корелира с тежином болести (већи TNM стадијум, већи нуклеарни градус и слаба диференцијација туморског ткива) и

прогресијом (присуство метастаза у плућима/јетри или перитонеалне карциноматозе) и системских биомаркера AFP и СЕА. Ови налази указују на Gal 3 као потенцијални маркер тежине и прогресије CRC-а.

Такође је показана повећана концентрација Gal-1 у фецесу пацијената са CRC-ом и већим нуклеарним градусом и слабом диференцијацијом туморског ткива, док је преминација Gal-1 у односу на проинфламацијске цитокине детектована код пацијената са унапредоваим TNM стадијумом и метастатском болешћу.

Преминација Gal-1 и Gal-3 у односу на проинфламацијске цитокине, код испитаника са напредном и прогресивном болешћу, може указати на имуномодулаторну улогу галектина у ограничавању континуираних проинфламацијских процеса и спречавању снажног антитуморског имунског одговора. Фекалне вредности Gal-1 и Gal-3 могу се користити као значајан маркер за тежину и прогресију CRC-а. Ови налази указују да Gal-1 и Gal-3 могу допринети имунолошкој привилегији тумора модулацијом локалног имунског одговора и указују на њихову потенцијалну употребу као терапеутских мета.

Датум прихватања теме од стране **09.11.2016.**

ННВ:

ДП

Датум одбране:

ДО

Чланови комисије:

КО

Председник:

Проф. Др Драгче Радовановић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Хирургија

Ментор:

Проф. др Дарко Мирковић, редовни професор Медицинског факултета Универзитета одбране у Београду за ужу научну област Хирургија

Члан:

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

Члан:

проф. др Братислав Трифуновић, ванредни професор Медицинског факултета Универзитета одбране у Београду за ужу научну област Хирургија

9.2. KEYWORDS DOCUMENTATION

UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC
FACULTY OF MEDICAL SCIENCES

Accession number:
ANO

Identification number:
INO

Documentation type: Monographic publication
DT

Type of record: Textual printed material
TR

Contents code: PhD thesis
CC

Author: Milan M. Jovanović
AU

Menthor/co-mentor: Darko Mirković, MD PhD
MN

Title: Colorectal carcinoma: The importance of cytokines
in the serum and stools for disease assessment
TI

Language of text: Serbian (Cyrillic)
LT

Language of abstract: CP	Serbian/English
Country of publication: CP	Serbia
Locality of publication: LP	Serbia
Publication year: PY	2018.
Publisher: PU	Author reprint
Publication place: PP	34000 Kragujevac, Serbia Svetozara Markovića 69
Physical description:	Thesis contains 128 pages, 8 chapters, 35 tables, 16 figures and 178 citations
Scientific field: SF	Medicine
Scientific discipline: SD	Clinical and Experimental surgery
Subject/key words: SKW	Colorectal carcinoma, disease severity, immune response

UDC:

Holding data:

Library of Faculty of medical sciences Kragujevac,
34000 Kragujevac Serbia, Svetozara Markovića 69

Note:

N

Colorectal cancer (CRC) represents one of the most common cancers worldwide. CRC is frequently diagnosed at advanced stages with poor prognosis, indicating on need for new diagnostic and prognostic markers.

The aim of the study was to investigate the correlation between the level of cytokines in serum and faeces with the stage of the disease and the clinical and pathological characteristics in patients with colorectal carcinoma.

Significantly higher fecal Gal-3 was observed in patients with CRC with higher nuclear grade, poor tumor differentiation, higher TNM stage and metastatic disease, while Gal-3 predominance over proinflammatory cytokines was observed in patients with advanced TNM and metastatic diseases. Fecal Gal-3 positively correlates with the severity of the disease (higher TNM stage, higher nuclear grade and poor tumor tissue differentiation) and progression (presence of lung/liver metastasis or peritoneal carcinomatosis) and systemic biomarkers AFP and CEA. These findings indicate Gal 3 as a potential marker of the severity and progression of CRC.

An increased Gal-1 concentration in feces of patients with CRC and a higher nuclear grade and a poorly differentiated tumor tissue was observed,

while Gal-1 prevalence over proinflammatory cytokines was detected in patients with advanced TNM and metastatic disease.

The prevalence of Gal-1 and Gal-3 over proinflammatory cytokines, in subjects with advanced and progressive disease, may indicate the immunomodulatory role of galectins in limiting ongoing proinflammatory processes and thus preventing a strong antitumor immune response. The fecal values of Gal-1 and Gal-3 can be used as a significant marker for severity and progression of the CRC. These findings indicate that Gal-1 and Gal-3 can contribute to the immune privileges of the tumor by modulating the local immune response and point to their potential use as therapeutic targets.

Accepted by the Scientific Boardon: 09.11.2016.

ASB

Defended on:

DE

Thesis defended board

(Degree/name/surname/title/faculty)

DB

President:

Dragče Radovanović MD PhD, Associate Professor of Surgery, Faculty of Medical sciences, University of Kragujevac

Menthor:

Darko Mirković MD PhD, Professor of Surgery, Medical faculty, University of Defense, Belgrade

Member:

Nebojša Arsenijević MD PhD, Professor of Microbiology and Immunology and Oncology, Faculty of Medical sciences, University of Kragujevac

Member:

Bratislav Trifunović MD PhD, Associate Professor of Surgery, Medical faculty, University of Defense, Belgrade

9.3. БИОГРАФСКИ ПОДАЦИ АУТОРА

Милан Јовановић, рођен је 08.11.1976. године у Крагујевцу, где је завршио основну школу и Средњу медицинску школу „Сестре Нинковић“ као Ученик генерације. Интегрисане академске студије на Медицинском факултету у Крагујевцу уписао је школске 1995/1996. године, а завршио их је на истом факултету 26. јула 2002. године, са просечном оценом 9,97. Више пута је у току студија проглашаван за најбољег студента године, а добио је и неколико пута награду Универзитета за одличан успех у току студија. У току студија стипендиран је од стране Републичке фондације за развој научног и уметничког подмлатка Републике Србије, Фонда младих Србије, добитник је стипендије Краљевине Норвешке, а од треће године студија има војну стипендију.

По завршетку основних студија обавио је лекарски стаж у КЦ Крагујевац и ДЗ Крагујевац у трајању од 9 месеци, и положио стручни испит за доктора медицине. На одслужењу војног рока био је у Школи резервних официра коју је завршио 2003. године као Први у рангу са просечном оценом 9,86. Од 01.12.2003. године са чином потпоручника започео је да ради као Управник гарнизонске амбуланте у Ћуприји. Након годину дана добио је специјализацију из опште хирургије и са оценом 5,00 из трупе одлази на специјализацију на ВМА коју започиње 06.07.2005. године у Клиници за абдоминалну и ендокрину хирургију ВМА. У току специјализације положио је све предвиђене колоквијуме са оценом 10. Положио је специјалистички испит 29.07.2010. године са одличном оценом и стекао звање специјалисте опште хирургије након чега је запослен у Клиници за општу хирургију ВМА као хирург.

Докторске академске студије на Факултету медицинских наука у Крагујевцу, изборно подручје Клиничка и експериментална хирургија, уписао је школске 2005/2006. године. Усмени докторски испит је положио 26.06. 2015. године са оценом 10 (десет).

Од 2010. године запослен је у Војномедицинској академији, у Клиници за општу хирургију као хирург. Од јуна 2015. Године ангажован је као асистент на Медицинском факултету Универзитета одбране и секретар је Катедре за хируршке науке I ВМА МФ. Говори енглески и руски језик и познаје рад на рачунару.

BIOGRAPHY

Author Biography

Milan Jovanovic was born 08.11.1976. in Kragujevac, where he completed his primary and secondary medical school "Sestre Ninkovic" as a student of generation. He enrolled integrated academic studies of medicine at the Medical Faculty in Kragujevac in the academic year 1995/1996. and graduated at the same faculty on 26.07.2002. with an average grade of 9.97 (nine and 97/100). Several times in the course of the study he was named the best student of the year, and received the University Award several times for great success in studies. During the study he received scholarship by the Republic Foundation for Development of Scientific and Artistic Youth of the Republic of Serbia, Serbian Youth Fund, the scholarship of the Kingdom of Norway, and from third year of study he received military scholarship. Upon completion of basic studies, he completed doctor's internship in Clinical center for 9 months, and passed the professional examination for the doctor of medicine. He attended Military service in the reserve officers' school from which he graduated in 2002 as the first in the ranking with an average score of 9.86. From 01.12.2003. with the rank of lieutenant he began to work as a manager garrison clinic in Cuprija. After a year he received a residency in general surgery and with a score of 5.00 troops went on specialist internship in MMA, starting from 06.07.2005. at the Clinic for Abdominal and Endocrine Surgery VMA. During specialist internship he passed all anticipated colloquiums with a grade 10. He passed the specialist exam 29.07.2010. with the excellent grade and became a specialist in general surgery, after which he worked in the Department of General Surgery VMA as a surgeon. He enrolled Doctoral academic studies at the Faculty of Medical Sciences in Kragujevac, the elective area of clinical and experimental surgery, in 2005/2006. school year. He passed the oral doctoral examination in June 2015 with a grade of 10 (ten). Since June 2015, he has been employed as an assistant at the Medical Faculty of the University of Defense as the Secretary of the Department of Surgical Science. He speaks English and Russian and is familiar with the work on the computer.

9.4. СПИСАК ОБЈАВЉЕНИХ РАДОВА

Научни радови објављени у целини у часописима међународног значаја:

1. **Jovanovic M**, Gajovic N, Zdravkovic N, Jovanovic M, Jurisevic M, Vojvodic D, Maric V, Arsenijevic A and Jovanovic I. Fecal galectin-3: A new promising biomarker for severity and progression of colorectal carcinoma. *Mediators of Inflammation* 2018; DOI: 10.1155/2018/8031328
2. **Jovanovic M**, Gajovic N, Zdravkovic N, Jovanovic M, Jurisevic M, Vojvodic D, Mirkovic D, Milev B, Maric V, Arsenijevic N. Fecal galectin-1 as a potential marker for colorectal cancer and disease severity. *Vojnosanit Pregl.* (2018); DOI: 10.2298/VSP171201007J
3. **Jovanovic M**, Janjusevic N, Mirkovic D, Vulovic M, Milev B, Mitrovic M, Trifunovic B. Giant primary retroperitoneal seminoma: A case report. *Vojnosanit Pregl.* 2016; 73: 205-207.
4. Parezanovic-Ilic K, Mladenovic-Segedi Lj, Jurisic-Skevin A, Zivanovic-Macuzic I, Grbovic V, Nurkovic J, **Jovanovic M**, Jeremic D. The influence of various risk factors on the strength of pelvic floor muscle in women. *Vojnosanit Pregl.* 2017; 74: 556-562.
5. Milev B, Milev B, Kostic Z, Mirkovic D, Perisic N, Tasic O, Elez M, Radunovic A, **Jovanovic M**, Maric P, Daisevic S, Prelevic R, Vulovic M. Abdominal localization of unicentric form of Castleman disease A case report. *Vojnosanit Pregl.* 2017; 74: 367-370.
6. Trifunovic B, Delic J, Mirkovic D, **Jovanovic M**, Krsic J, Zaric Z. Colorectal anastomosis dehiscence following radical surgical operation for rectal carcinoma. *Vojnosanit Pregl.* 2011; 68: 856-860.
7. Mickovic S, Mitrovic M, Stankovic N, Bezmarevic M, **Jovanovic M**, Mirkovic D, Tufegdžic I, Nikolic-Mickovic I. Splenic artery pseudoaneurysm as a complication of pancreatic pseudocyst. *Vojnosanit Pregl.* 2011; 68: 602-606.
8. Milev B, Mirkovic D, Bezmarevic M, Misovic S, Mitrovic M, **Jovanovic M**, Mirkovic Lj, Milev B, Radenkovic D. Intra-abdominal hypertension and abdominal compartment syndrome. *Vojnosanit Pregl.* 2010; 67: 674-680.
9. Marjanovic I, Jevtic M, Misovic S, Colic M, Zoranovic U, Sarac M, Rusovic S, **Jovanovic M**. Morbidity and mortality in the early postoperative course following elective reconstruction of abdominal aorta aneurysm using endovascular and open surgical techniques. *Vojnosanit Pregl.* 2010; 67: 665-673.
10. Mirkovic D, Mitrovic M, **Jovanovic M**. Portosystemic shunt in the treatment of portal hypertension. *Vojnosanit Pregl.* 2010; 67: 321-328.
11. Zoranovic U, Jevtic M, **Jovanovic M**, Pucar D, Cizmic M. Hyperbaric oxygenation effects determination in the therapy of chronic occlusive lower extremities arteries disease by the use of perfusion scintigraphy. *Vojnosanit Pregl.* 2010; 67: 279-285.

12. Zoranovic U, Jevtic M, **Jovanovic M**, Pucar D, Cizmic M. Comparative analysis of lower extremities tissue perfusion by the use of perfusion scintigraphy method after hyperbaric oxygenation and lumbar sympathectomy. *Vojnosanit Pregl.* 2009; 66: 563-569.
13. Mirkovic D, Stankovic N, Jevtic M, Mitrovic M, **Jovanovic M**. Mesoatrial shunt in Budd-Chiari syndrome. *Vojnosanit Pregl.* 2009; 66: 69-73.
14. Jovanovic M, Gajovic N, Jurisevic M, Simovic-Markovic B, Maric V, **Jovanovic M**, Arsenijevic N, Zdravkovic N. Fecal sST2 correlates with disease severity of ulcerative colitis. *Vojnosanitetskipregled 2018 OnLine-First Issue 00*, Pages: 26-26
<https://doi.org/10.2298/VSP171225026J>
15. Vulović M, Živanović-Mačuzić I, Jeremić D, Đonović N, Radunović A, **Jovanović M**, Milošević B, Aleksić Z, Stanković I, Vojinović R. MDCT estimation of prevalence and anatomic characteristics of sternal body foramen in population of central Serbia. *Vojnosanitetski pregled 2018 OnLine-First Issue 00*, Pages: 84-84
<https://doi.org/10.2298/VSP170321084V>
16. Pavlović M, Milošević B, Radovanović D, Cvetković A, Čanović D, Mitrović S, **Jovanović M**, Spasić M, Vulović M, Stojanović B, Jeremić D, Jevđić J. Malignant fibrous histiocytoma of the right upper leg: A case report. *Vojnosanitetski pregled 2018 Volume 75, Issue 3*, Pages: 320-325
<https://doi.org/10.2298/VSP160512237P>
17. Živanović-Mačuzić I, Vulović M, Vojinović R, **Jovanović M**, Radunović A, Milev B, Cvetković A, Stojiljković M, Milošević B, Ivošević A, Aksić M, Simović A, Jeremić D. The Böhler's angle in population of central Serbia - a radiological study. *Vojnosanitetski pregled 2018 Volume 75, Issue 3*, Pages: 241-245
<https://doi.org/10.2298/VSP160419209Z>

9.5. THE LIST OF PUBLISHED PAPERS

The published paper in extenso in international journals

1. **Jovanovic M**, Gajovic N, Zdravkovic N, Jovanovic M, Jurisevic M, Vojvodic D, Maric V, Arsenijevic A and Jovanovic I. Fecal galectin-3: A new promising biomarker for severity and progression of colorectal carcinoma. *Mediators of Inflammation* 2018; DOI: 10.1155/2018/8031328
2. **Jovanovic M**, Gajovic N, Zdravkovic N, Jovanovic M, Jurisevic M, Vojvodic D, Mirkovic D, Milev B, Maric V, Arsenijevic N. Fecal galectin-1 as a potential marker for colorectal cancer and disease severity. *Vojnosanit Pregl.* (2018); DOI: 10.2298/VSP171201007J
3. **Jovanovic M**, Janjusevic N, Mirkovic D, Vulovic M, Milev B, Mitrovic M, Trifunovic B. Giant primary retroperitoneal seminoma: A case report. *Vojnosanit Pregl.* 2016; 73: 205-207.
4. Parezanovic-Ilic K, Mladenovic-Segedi Lj, Jurisic-Skevin A, Zivanovic-Macuzic I, Grbovic V, Nurkovic J, **Jovanovic M**, Jeremic D. The influence of various risk factors on the strength of pelvic floor muscle in women. *Vojnosanit Pregl.* 2017; 74: 556-562.
5. Milev B, Milev B, Kostic Z, Mirkovic D, Perisic N, Tasic O, Elez M, Radunovic A, **Jovanovic M**, Maric P, Daisevic S, Prelevic R, Vulovic M. Abdominal localization of unicentric form of Castleman disease A case report. *Vojnosanit Pregl.* 2017; 74: 367-370.
6. Trifunovic B, Delic J, Mirkovic D, **Jovanovic M**, Krsic J, Zaric Z. Colorectal anastomosis dehiscence following radical surgical operation for rectal carcinoma. *Vojnosanit Pregl.* 2011; 68: 856-860.
7. Mickovic S, Mitrovic M, Stankovic N, Bezmarevic M, **Jovanovic M**, Mirkovic D, Tufegdžic I, Nikolic-Mickovic I. Splenic artery pseudoaneurysm as a complication of pancreatic pseudocyst. *Vojnosanit Pregl.* 2011; 68: 602-606.
8. Milev B, Mirkovic D, Bezmarevic M, Misovic S, Mitrovic M, **Jovanovic M**, Mirkovic Lj, Milev B, Radenkovic D. Intra-abdominal hypertension and abdominal compartment syndrome. *Vojnosanit Pregl.* 2010; 67: 674-680.
9. Marjanovic I, Jevtic M, Misovic S, Colic M, Zoranovic U, Sarac M, Rusovic S, **Jovanovic M**. Morbidity and mortality in the early postoperative course following elective reconstruction of abdominal aorta aneurysm using endovascular and open surgical techniques. *Vojnosanit Pregl.* 2010; 67: 665-673.
10. Mirkovic D, Mitrovic M, **Jovanovic M**. Portosystemic shunt in the treatment of portal hypertension. *Vojnosanit Pregl.* 2010; 67: 321-328.
11. Zoranovic U, Jevtic M, **Jovanovic M**, Pucar D, Cizmic M. Hyperbaric oxygenation effects determination in the therapy of chronic occlusive lower extremities arteries disease by the use of perfusion scintigraphy. *Vojnosanit Pregl.* 2010; 67: 279-285.

12. Zoranovic U, Jevtic M, **Jovanovic M**, Pucar D, Cizmic M. Comparative analysis of lower extremities tissue perfusion by the use of perfusion scintigraphy method after hyperbaric oxygenation and lumbar sympathectomy. *Vojnosanit Pregl.* 2009; 66: 563-569.
13. Mirkovic D, Stankovic N, Jevtic M, Mitrovic M, **Jovanovic M**. Mesoatrial shunt in Budd-Chiari syndrome. *Vojnosanit Pregl.* 2009; 66: 69-73.
14. Jovanovic M, Gajovic N, Jurisevic M, Simovic-Markovic B, Maric V, **Jovanovic M**, Arsenijevic N, Zdravkovic N. Fecal sST2 correlates with disease severity of ulcerative colitis. *Vojnosanitetskipregled 2018 OnLine-First Issue 00*, Pages: 26-26
<https://doi.org/10.2298/VSP171225026J>
15. Vulović M, Živanović-Mačuzić I, Jeremić D, Đonović N, Radunović A, **Jovanović M**, Milošević B, Aleksić Z, Stanković I, Vojinović R. MDCT estimation of prevalence and anatomic characteristics of sternal body foramen in population of central Serbia. *Vojnosanitetski pregled 2018 OnLine-First Issue 00*, Pages: 84-84
<https://doi.org/10.2298/VSP170321084V>
16. Pavlović M, Milošević B, Radovanović D, Cvetković A, Čanović D, Mitrović S, **Jovanović M**, Spasić M, Vulović M, Stojanović B, Jeremić D, Jevđić J. Malignant fibrous histiocytoma of the right upper leg: A case report. *Vojnosanitetski pregled 2018 Volume 75, Issue 3*, Pages: 320-325
<https://doi.org/10.2298/VSP160512237P>
17. Živanović-Mačuzić I, Vulović M, Vojinović R, **Jovanović M**, Radunović A, Milev B, Cvetković A, Stojiljković M, Milošević B, Ivošević A, Aksić M, Simović A, Jeremić D. The Böhler's angle in population of central Serbia - a radiological study. *Vojnosanitetski pregled 2018 Volume 75, Issue 3*, Pages: 241-245
<https://doi.org/10.2298/VSP160419209Z>

ИЗЈАВА АУТОРА О ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, _____, изјављујем да докторска дисертација под насловом:

која је одбрањена на _____
Универзитета у Крагујевцу представља *оригинално ауторско дело* настало као резултат *сопственог истраживачког рада*.

Овом Изјавом такође потврђујем:

- да сам *једини аутор* наведене докторске дисертације,
- да у наведеној докторској дисертацији *нисам извршио/ла повреду* ауторског нити другог права интелектуалне својине других лица,
- да умножени примерак докторске дисертације у штампаној и електронској форми у чијем се прилогу налази ова Изјава садржи докторску дисертацију истоветну одбрањеној докторској дисертацији.

У _____, _____ године,

потпис аутора

ИЗЈАВА АУТОРА О ИСКОРИШЋАВАЊУ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, _____,

дозвољавам

не дозвољавам

Универзитетској библиотеци у Крагујевцу да начини два трајна умножена примерка у електронској форми докторске дисертације под насловом:

која је одбрањена на _____

Универзитета у Крагујевцу, и то у целини, као и да по један примерак тако умножене докторске дисертације учини трајно доступним јавности путем дигиталног репозиторијума Универзитета у Крагујевцу и централног репозиторијума надлежног министарства, тако да припадници јавности могу начинити трајне умножене примерке у електронској форми наведене докторске дисертације путем *преузимања*.

Овом Изјавом такође

дозвољавам

не дозвољавам¹

¹ Уколико аутор изабере да не дозволи припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци, то не искључује право припадника јавности да наведену докторску дисертацију користе у складу са одредбама Закона о ауторском и сродним правима.

припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од следећих *Creative Commons* лиценци:

- 1) Ауторство
- 2) Ауторство - делити под истим условима
- 3) Ауторство - без прерада
- 4) Ауторство - некомерцијално
- 5) Ауторство - некомерцијално - делити под истим условима
- 6) Ауторство - некомерцијално - без прерада²

У _____, _____ године,

потпис аутора

² Молимо ауторе који су изабрали да дозволе припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци да заокруже једну од понуђених лиценци. Детаљан садржај наведених лиценци доступан је на: <http://creativecommons.org.rs/>



VOJNOSANITETSKI PREGLED

VOJNOMEDICINSKA AKADEMIJA

Crnotravska 17, 11 000 **Beograd, Srbija**

Tel/faks: +381 11 2669689

vsp@vma.mod.gov.rs

ACCEPTED MANUSCRIPT

Accepted manuscripts are the articles in press that have been peer reviewed and accepted for publication by the Editorial Board of the *Vojnosanitetski Pregled*. They have not yet been copy edited and/or formatted in the publication house style, and the text could still be changed before final publication.

Although accepted manuscripts do not yet have all bibliographic details available, they can already be cited using the year of online publication and the DOI, as follows: article title, the author(s), publication (year), the DOI.

Please cite this article: **FECAL GALECTIN-1 AS A POTENTIAL MARKER FOR COLORECTAL CANCER AND DISEASE SEVERITY**

ФЕЦЕСНИ ГАЛЕКТИН-1- ПОТЕНЦИЈАЛНИ МАРКЕР КОЛОРЕКТАЛНОГ КАРЦИНОМА И ТЕЖИНЕ БОЛЕСТИ

Authors: **Milan Jovanovic¹, Nevena Gajovic², Natasa Zdravkovic³, Marina Jovanovic³, Milena Jurisevic⁴, Danilo Vojvodic⁵, Darko Mirkovic¹, Bosko Milev¹, Veljko Maric⁶, Nebojsa Arsenijevic²**; *Vojnosanitetski pregled* (2018); Online First January, 2018.

UDC:

DOI: <https://doi.org/10.2298/VSP171201007J>

When the final article is assigned to volumes/issues of the Journal, the Article in Press version will be removed and the final version appear in the associated published volumes/issues of the Journal. The date the article was made available online first will be carried over.

TITLE PAGE

TITLE

Fecal Galectin-1 as a potential marker for colorectal cancer and disease severity Фекални галактин-1- потенцијални маркер колоректалног карцинома и тежине болести

Milan Jovanovic¹, Nevena Gajovic², Natasa Zdravkovic³, Marina Jovanovic³, Milena Jurisevic⁴, Danilo Vojvodic⁵, Darko Mirkovic¹, Bosko Milev¹, Veljko Maric⁶, Nebojsa Arsenijevic²

1 Clinic for General Surgery, Military Medical Academy, Belgrade, Serbia

2 Center for Molecular Medicine and Stem Cell Research, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Serbia

3 Department of Internal medicine, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Serbia

4 Department of Pharmacy, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Serbia

5 Institute for medical research, Military Medical Academy, Belgrade, Serbia

6 Department of Surgery, Faculty of Medicine Foca, University of East Sarajevo, Bosnia and Herzegovina

Corresponding author:

Nevena Gajovic, MD

Center for Molecular Medicine and Stem Cell Research

Faculty of Medical Sciences University of Kragujevac

Svetozara Markovica 69, 34000 Kragujevac, Serbia

Tel +38134306800, Fax. +38134306800112

E-mail: gajovicnevena@yahoo.com

ABSTRACT

Background/Aim: Colorectal cancer (CRC) represents one of the most common cancers worldwide. CRC is frequently diagnosed at advanced stages with poor prognosis, indicating on need for new diagnostic and prognostic markers. The aim of this study was to determine systemic and fecal values of galectin-1 (gal-1) and ratios between gal-1 and proinflammatory cytokines TNF- α , IL-1 β and IFN- γ in patients with CRC and the relationship with clinicopathological aspects of disease.

Methods: The blood samples and feces liquid fraction of 58 patients with CRC were analyzed. Serum and fecal levels of TNF- α , IL-1 β and IFN- γ and galectin-1 were measured using sensitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kits.

Results: Fecal level of gal-1 was increased in CRC patients with higher nuclear grade and poor tumor tissue differentiation. Gal-1/TNF- α ratio in serum and feces had a higher trend in patients with advanced TNM stage as well as detectable lymphatic and blood vessel invasion. Gal-1/TNF- α and Gal-1/IFN- γ ratios were increased in serum of patients with presence of lung/liver metastasis or peritoneal carcinomatosis, respectively, while enhanced Gal-1/IL-1 ratio was detected only in serum of patients with lung metastasis

Positive correlation between Gal-1 value in feces and histological differentiation of tumor and biomarkers AFP and CA 19-9, respectively was also observed. Fecal values of gal-1 higher than 13708,29 pg/g present a highly sensitive and specific marker for histological differentiation of tumor tissue.

Conclusion: We believe that predomination of gal-1 over pro-inflammatory cytokines TNF- α , IL-1 β and IFN- γ in patients with advanced and progressive disease may implicate on immunomodulatory role of gal-1 in limiting ongoing proinflammatory processes. The fecal values of gal-1 can be used as a valuable marker for CRC severity.

Key words: Colorectal carcinoma, galectin-1, feces

SAŽETAK

Uvod/Cilj: Kolorektalni karcinom (engl. Colorectal carcinoma- CRC) je jedan od najučestalijih karcinoma na svetu. CRC se često dijagnostikuje u uznapredovalim stadijumima sa lošom prognozom, ukazujući na potrebu za novim dijagnostičkim i prognostičkim markerima. Cilj ove studije bio je utvrđivanje sistemskih i fekalnih vrednosti galektina-1 (gal-1) i odnosa između gal-1 i proinflamacijskih citokina TNF- α , IL-1 β i IFN- γ kod pacijenata sa CRC i odnosa sa kliničko-patološkim aspektima bolesti.

Metode: Analizirani su uzorci krvi i tečne frakcije fecesa 58 pacijenata sa CRC-om. Serumski i fekalni nivoi TNF- α , IL-1 β , IFN- γ i galektina-1 su mereni korišćenjem senzitivnog ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) testa.

Rezultati: Fekalni nivo gal-1 povećan je kod pacijenata sa CRC-om sa velikim nuklearnim gradusom i slabo diferentovanim tumorskim tkivom. Odnos Gal-1/TNF- α u serumu i fecesu značajno je veći kod pacijenata sa uznapredovalim TNM stadijumom, kao i detektabilnom invazijom limfnih i krvnih sudova. Odnosi Gal-1/TNF- α i Gal-1/IFN- γ su povećani u serumima pacijenata sa metastazama u plućima/jetri ili peritonealnom karcinomatozom, dok je povećan odnos Gal-1/IL-1 detektovan samo u serumu pacijenata sa metastazama u plućima.

Takođe je primećena pozitivna korelacija između vrednosti Gal-1 u fecesu i histološkog tipa tumora i biomarkera AFP i CA 19-9. Vrednosti Gal-1 u fecesu veće od 13708,29 pg/g predstavljaju visoko osetljiv i specifičan marker za histološku diferencijaciju tumorskog tkiva.

Zaključak: Naši rezultati ukazuju da dominacija Gal-1 nad proinflamacijskim citokinima TNF- α , IL-1 β , IFN- γ kod pacijenata sa uznapredovalom i progresivnom bolešću ističe imunomodulatornu ulogu Gal-1 u ograničavanju proinflamacijskih procesa. Vrednosti Gal-1 u fecesu mogu se koristiti kao marker procene težine kolorektalnog karcinoma.

Ključne reči: kolorektalni karcinom, galektin-1, feces

INTRODUCTION

Colorectal cancer (CRC) is one of the most common cancers and the fourth cause of cancer-related deaths ¹. Despite the constant achievements in the understanding of cancer biology, the morbidity and mortality rates of CRC continue to increase ¹. In most cases CRC is diagnosed at advanced stages with poor prognosis. This phenomenon highlights the need for new diagnostic and prognostic markers. There has been a sustained interest in the identification of bio-markers for the prognosis and progression of CRC ²⁻⁴. New markers should contribute to the prediction of prognosis or relapse after therapy. Today, serum markers for CRC are preferred over tissue- or stool-based assays, especially for screening and monitoring purposes, which require repeat testing ⁴. Novel studies point to the significance of fecal markers measurement in the detection and prediction of disease severity ⁵⁻⁷.

A large body of evidence indicates that galectins participate in a variety of normal cellular functions, and are dysregulated in CRC ⁸⁻¹¹. Among all the known galectins, galectin-1 (gal-1) is well characterized. Galectin-1 (Gal-1) is a multifunctional β -galactoside-binding lectin produced by a variety of vascular, interstitial, epithelial, immune cells as well as neoplastic cells ^{12,13}. It can be located either inside the cells in nucleus and cytosol or in the extracellular space ^{12,13}. It is shown that gal-1 is involved in several biological processes and in various phases of tumorigenesis such as regulation of cell growth and migration, cell-extracellular matrix and cell-cell interactions, angiogenesis, tumor-immune escape ^{14,15}. Elevated expression of gal-1 was observed in tissues of various solid malignant tumors, whereas low or no expression was found in normal tissues ⁸⁻¹¹. The immunomodulatory role of Gal-1 is also familiar, and its strong influence on inflammation is well established ¹⁶.

The aim of this study was to evaluate systemic and fecal values of gal-1 and ratios between gal-1 and proinflammatory cytokines in patients with CRC and the relationship with clinicopathological aspects of disease. In this study we demonstrate enhanced fecal concentration of gal-1 in CRC patients with higher nuclear grade and poor tumor tissue differentiation, while predominance of gal-1 over proinflammatory cytokines in patients with advanced TNM stage and metastatic disease.

METHODS

Ethical Approvals. The study was conducted at the Clinical center, Kragujevac, Serbia, and Center for Molecular Medicine and Stem Cell Research, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Serbia, after the study protocol was approved by relevant Ethics Committees of the Clinical center, Kragujevac, Serbia, and Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Serbia. All patients gave their informed consent. All research procedures were made according to the Principle of Good Clinical Practice and the Declaration of Helsinki.

Subjects. Fifty eight patients with CRC were enrolled in the study. All patients received surgical resection for CRC. Diagnosis was based on endoscopic and histological criteria. Exclusion criteria included no well-defined pathology, no adequate clinical document available and previous treatment with radiation and chemotherapy. Clinical data about age, gender, size of cancer, metastasis, and pathologic reports (vascular invasion, lymph node invasion, nuclear grade and well and moderate + poor differentiation) and clinical stage by TNM (tumor, nodes, and metastasis) were recorded and analyzed in study. Blood and stool samples were taken before the surgery and stored at -80°C until ELISA.

Feces liquid fraction preparation

Stool samples (1-10 g) were collected in the morning in sterile containers and weighed. One gram of fecal samples was diluted, mixed, homogenised in 5 mL of protease inhibitor cocktail (SIGMA, P83401), and then centrifuged, as previously described^{17,18}. The supernatant fluid was collected and stored at -80°C until ELISA.

Evaluation of tumor markers in serum. Serum levels of Alpha-fetoprotein (AFP), Carcino-embryonic antigen (CEA), and Cancer antigen 19-9 (CA19-9) were routinely determined by chemiluminescence enzyme immunoassay (CLIA) in the central biochemical laboratory of the Clinical center Kragujevac.

Determination of Galectin-1, TNF- α , IL-1 β and IFN- γ in serum and feces. Serum and fecal concentrations of Gal-3 and cytokines were measured, as described¹⁹, using sensitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kits (R&D Systems, Minneapolis, MN, for Gal-1, TNF- α , IL-1 β and IFN- γ ; measurement of cytokines according to the manufacturer's

instructions). Briefly, the 96-well plates were coated with capture antibody, overnight. The plates were washed with a washing buffer (0.05% Tween-20 in PBS) and incubated with blocking buffer (1% bovine serum albumin in PBS) for 1 hour at room temperature. Serum/faecal samples or standard recombinant Gal-1/TNF- α /IL-1 β /IFN- γ were introduced to the plates for 2 hours before the application of biotinylated detection antibody for 1 hour at room temperature. After introduction of streptavidin peroxidase for 1 hour, the plates were developed with substrate reagent for 20 minutes. The reaction was stopped by adding 4mol/L sulfuric acid, and the absorbance was read at 495 nm by a microplate reader. We measured the exact concentration of mentioned biomarkers by intrapolation of a standard curve made by a series of well-known concentrations as per manufacturer's instruction. Values of measured cytokines are presented as pg/ml of serum and pg/g of feces, respectively.

Statistical analysis

The statistical analyses were performed using SPSS 20.0 software. The results were reported as mean and standard error (SE). Determination statistically significant difference between the means of two groups was determined using Student's t-test for independent samples if the data had normal distribution or Mann-Whitney U-test for data without normal distribution. Pearson's or Spearman's correlation, where appropriate, evaluated the possible relationship between the cytokines and disease severity and progression in patients with CRC. Numerical values were assigned to different histological differentiation stages (well=1; moderate + poor = 2). Strength of correlation was defined as negative or positive weak (-0.3 to -0.1 or 0.1 to 0.3), moderate (-0.5 to -0.3 or 0.3 to 0.5) or strong (-1.0 to -0.5 or 1.0 to 0.5). P-value of 0.05 was considered as statistically significant.

RESULTS

Fifty eight patients with CRC were enrolled in the study. There was no significant difference in gender distribution (34 males and 24 females). Patients were similar in age (mean age 66 ± 1). Clinical and pathologic characteristics of these patients are presented in Table 1.

Serum and fecal concentration of Gal-1 and ratio between Gal-1 and pro-inflammatory mediators, regard to histo-pathologic characteristics of CRC

Patients with CRC were categorized into 3 groups according to nuclear grade of tumor tissue: I, II and III, and analyzed for systemic and fecal values of ratio between Gal-1 and pro-inflammatory mediators (TNF- α , IL-1 β and IFN- γ). As shown in Figure 1A, CRC patients with higher nuclear grade appear to have higher fecal level of Gal-1 (III vs. II: $21936,14 \pm 3601,19$ vs. $13286,97 \pm 782,97$ pg/ml; $p=0.020$; III vs. I: $21936,14 \pm 3601,19$ vs. $15724,30 \pm 1903,49$ pg/ml; $p=0.047$), systemic value of Gal-1/TNF- α ratio (III vs. II: $60,46 \pm 9,01$ vs. $27,17 \pm 2,62$; $p=0.009$; III vs. I: $60,46 \pm 9,01$ vs. $24,44 \pm 0,89$; $p=0.032$), as well as fecal Gal-1/IFN- γ ratio (III vs. II: $13,64 \pm 0,78$ vs. $9,76 \pm 1,39$; $p=0.001$; III vs. I: $13,64 \pm 0,78$ vs. $10,03 \pm 2,96$; $p=0.048$).

Further, we classified CRC patients in two groups, according to histological differentiation rate: well and moderate + poor. In patients with poor tumor tissue differentiation, we detected increased fecal Gal-1 (moderate and poor vs. well: $19353,69 \pm 2224,35$ vs. $12757,56 \pm 1207,58$ pg/ml; $p=0.026$) and systemic Gal-1/TNF- α ratio (moderate and poor vs. well: $503,57 \pm 100,01$ vs. $69,73 \pm 11,61$; $p=0.042$; Figure 1B).

Serum and fecal Gal-1/TNF- α ratios are associated with TNM system and lymph and blood vessels invasion

Patients with CRC were divided in two categories on the basis of TNM stage of disease: I+II (localized tumor) and III+IV (metastatic tumor). There were no patients with TNM stage II. Patients with TNM stages III+IV revealed significantly higher Gal-1/TNF- α ratio in serum ($115,03 \pm 20,10$ vs. $60,51 \pm 7,95$; $p=0.046$) and feces ($16,84 \pm 0,92$ vs. $10,36 \pm 1,36$; $p=0.024$; Figure 2A).

Patients with CRC were divided in two groups, based on the presence of lymphatic/blood vessel invasion, respectively (+ and -). Increased Gal-1/TNF- α ratio in serum was detected in patients with detectable lymphatic ($146,95 \pm 28,91$ vs. $58,53 \pm 24,87$; $p=0.049$) and blood vessel invasion ($38,62 \pm 4,01$ vs. $22,82 \pm 3,25$; $p=0.040$; Figure 2B).

Liver, lung and peritoneal metastasis are associated with higher Gal-1/TNF- α ratio

Further, we divided patients in two categories based on presence of lung/liver metastasis or peritoneal carcinomatosis, respectively. Higher Gal-1/TNF- α ratio was found in serum of patients with detectable liver metastasis ($48,53 \pm 6,95$ vs. $28,12 \pm 2,87$; $p=0.005$), lung metastasis ($70,61 \pm 10,09$ vs. $28,87 \pm 2,51$; $p=0.001$), or peritoneal carcinomatosis ($53,79 \pm 11,42$ vs. $29,71 \pm 2,72$; $p=0.012$), in comparison to patients without metastasis/carcinomatosis (Figure 3). In addition, we also found higher Gal-1/IFN- γ ratio in serum of patients with detectable liver metastasis ($72,68 \pm 12,51$ vs. $46,01 \pm 3,26$; $p=0.043$), lung metastasis ($100,34 \pm 25,82$ vs. $55,02 \pm 5,25$; $p=0.033$), or peritoneal carcinomatosis ($89,57 \pm 19,57$ vs. $54,65 \pm 5,46$; $p=0.033$), as illustrated in figure 3. Increased Gal-1/IL-1 ratio was detected in serum of patients with detectable lung metastasis ($1001,91 \pm 82,09$ vs. $791,65 \pm 31,63$; $p=0.027$; Figure 3).

Faecal Gal-1 concentration significantly correlates with histological differentiation stage of colon cancer and systemic values of tumor markers AFP, CEA and CA 19-9

Spearman correlation analysis of Gal-1 concentration in stool uncovered positive correlation between Gal-1 value and histological differentiation stage of tumor ($r=0.357$; $P= 0.025$). Further analyses also found that fecal Gal-1 significantly correlated with AFP levels ($r=0.317$; $P= 0.028$), CA 19-9 levels ($r=0.296$; $P= 0.049$), but no significant correlation was found with CEA levels (Figure 4). Serum Gal-1 did not correlate with same parameters and markers of colon cancer (data not shown). Analysis also showed that fecal Gal-1 can be a valuable marker for distinguishing poor and moderate differentiation of tumor tissue (Figure 4). The optimal cut-off value estimated for Gal-1 that allows discrimination between poor and moderate differentiation was 13708,29 pg/g. For this cut-off, we determined sensitivity to be 73,6% and specificity 60,0%.

DISCUSSION

Biological role of Gal-1 in tumor cell proliferation, invasion, apoptosis, metastasis, immuno-suppression and tumor angiogenesis is well known²⁰⁻²⁷. It is involved in poor prognosis and the metastatic phenotype^{23,24}. Galectin-1 may act intracellularly as well as extracellularly, after secretion²⁸. Secreted Gal-1 can interact with cell-surface proteins such as fibronectin, integrins, laminin and VEGFR2 and subsequently determines proliferation, adhesion, migration and angiogenesis^{29,30}. These findings highlight the importance of extracellular Gal-1 in tumor biology. In the present study, we analyzed systemic and fecal level of Gal-1 and its ratio with several pro-inflammatory cytokines, in different stages of CRC. We found increased concentration of Gal-1 in stool of CRC patients with higher nuclear grade (III vs. II and III vs. I) and poor tumor tissue differentiation (Figure 1). Previous studies established Gal-1 as a protein commonly elevated in serum of patients with tumors⁸⁻¹⁰. Also, serum Gal-1 values were significantly increased in patients with metastatic disease compared with patients with localized tumors¹¹. We didn't find that serum Gal-1 mean values ranged significantly different regard to pathohistological characteristics of tumor, while fecal Gal-1 showed significant alteration according to pathohistological characteristics (Figure 1).

Indeed, in recent studies feces has been used as a sample for testing different biomarkers^{5,6}. For instance, fecal calprotectin (FC), a biomarker of intestinal inflammation that has been in clinical use for years⁵⁻⁷, has been also shown to be elevated in CRC and suggested for screening high risk groups for CRC³¹. Today, researchers are testing diagnostic accuracy of different fecal markers in the detection of cancerous lesions of the colorectum in order to find the most accurate for CRC screening. According to available literature, this is the first study testing fecal Gal-1 for detection of severe and progressive forms of CRC.

It had been suggested that ratio of counterregulatory cytokines is a reliable marker of the disease progression³². Therefore, we considered ratios of Gal-1 and pro-inflammatory cytokines and showed predomination of Gal-1 over pro-inflammatory cytokines TNF- α , IL-1 β and IFN- γ in patients with CRC with progressive disease. Gal-1/TNF- α ratio in serum and feces had a higher trend in patients with advanced TNM stage (III+IV) as well as detectable lymphatic and blood vessel invasion (Figure 2). In line with this finding,

enhanced Gal-1/TNF- α and Gal-1/IFN- γ ratios were detected in serum of patients with presence of lung/liver metastasis or peritoneal carcinomatosis, respectively, while enhanced Gal-1/IL-1 ratio was detected only in serum of patients with lung metastasis (Figure 3). Based on these findings, we believe that Gal-1/TNF- α ratio could be a predictor for the advanced stages of colorectal cancer.

The role of Gal-1 in the onset, progression and resolution of inflammation is well established¹⁶. Previous studies revealed that Gal-1 inhibit cell growth and induce the apoptosis of activated immune cells^{33,34}. Gal-1 has been shown to skew the balance toward type-2 immune response, simultaneously inhibiting IFN γ , TNF α , IL-2, and IL-12 production and facilitating IL-5 secretion, *in vitro* and *in vivo*³⁵⁻³⁷. Some studies suggest that Gal-1 might inhibit T-cell effector functions or induce the death of tumor infiltrating leukocytes and subsequently suppress strong immune response derived by proinflammatory cytokines^{36,38-40}. We are first to describe prevailing of Gal-1 over TNF- α , IL-1 β and IFN- γ in stool of patients with severe and progressive forms of CRC (Figure 2 and 3). In line with our finding Camby I et al.⁴⁰ conclude that tumor cells may impair T-cell effector functions through the secretion of Gal-1, that favors genesis of an immunosuppressive environment at a tumor site.

Further in this study, we envisage the possible role of fecal galectin-1 as a biomarker in preceding disease severity. We found positive correlation between Gal-1 value in feces and histological differentiation stage of tumor and biomarkers AFP and CA 19-9, respectively (Figure 4). Interestingly, we didn't find correlation of serum Gal-1 with the same parameters and markers of disease severity. Also, values of Gal-1 in feces are about two to three times higher than in serum, what makes measurement in feces a more sensitive method. Analysis of Receiver Operating Characteristic (ROC) curves of Gal-1 and disease parameters and markers for CRC revealed that Gal-1 could predict poor differentiated type of tumor, at good sensitivity and specificity. According to our findings, fecal Gal-1 could be a valuable marker for CRC severity.

CONCLUSION

In summary, increased local values of Gal-1, reflected through higher fecal concentration, in CRC patients with higher nuclear grade and poor tumor tissue differentiation may be considered as a sign of the tumor's malignant progression and, consequently, of a poor prognosis for patients. Predominance of Gal-1 over pro-inflammatory cytokines TNF- α , IL-1 β and IFN- γ in patients with advanced and progressive disease may implicate on immunomodulatory role of Gal-1 in limiting ongoing proinflammatory processes and preventing potent antitumor immune response. Furthermore, the fecal values of Gal-1 can be used as a valuable marker for CRC severity. These observations point on possible role of fecal Gal-1 as state marker of CRC and its potential use as therapeutic target.

Declaration of interest

The authors declare that they have no competing interests.

Acknowledgements

This work was supported by grants from the Serbian Ministry of Science and Technological Development (175071, 175069 and 175103), Serbia and from the Faculty of Medical Sciences Kragujevac (project JP 04/15), Serbia. The authors thank Milan Milojevic and Aleksandar Ilic for excellent technical assistance.

REFERENCES

1. Global Burden of Disease Cancer Collaboration, Fitzmaurice C, Dicker D, Pain A, Hamavid H, Moradi-Lakeh M, MacIntyre MF, et al. The Global Burden of Cancer 2013. *JAMA Oncol.* 2015 Jul;1(4):505-27.
2. Zdravkovic N, Pavlovic M, Radosavljevic G, Jovanovic M, Arsenijevic A, Zdravkovic N, et al. Serum levels of immunosuppressive cytokines and tumor markers in metastatic colorectal carcinoma. *JBUON* 2017; 22: 1-8
3. Zdravkovic N.D., Jovanovic I.P., Radosavljevic G.D., Arsenijevic A.N., Zdravkovic N.D., Mitrovic S.Lj., et al. Potential Dual Immunomodulatory Role of VEGF in Ulcerative Colitis and Colorectal Carcinoma. *Int J Med Sci* 2014; 11: 936-947
4. Wu KL, Chen HH, Pen CT, Yeh WL, Huang EY, Hsiao CC, et al. Circulating Galectin-1 and 90K/Mac-2BP Correlated with the Tumor Stages of Patients with Colorectal Cancer. *Biomed Res Int.* 2015;2015:306964.
5. Wagner M, Peterson CG, Ridefelt P, Sangfelt P, Carlson M. Fecal markers of inflammation used as surrogate markers for treatment outcome in relapsing inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol.* 2008 Sep 28;14(36):5584-9; discussion 5588.
6. Tibble J. A., Sigthorsson G., Bridger S., Fagerhol M. K., Bjarnason I. Surrogate markers of intestinal inflammation are predictive of relapse in patients with inflammatory bowel disease *Gastroenterology* 2000; 119: 15-22.
7. Tibble J., Teahon K., Thjodleifsson B. et al., "A simple method for assessing intestinal inflammation in Crohn's disease," *Gut* 2000; 47: 506-513
8. Kim HJ, Jeon HK, Cho YJ, Park YA, Choi JJ, Do IG, et al. High galectin-1 expression correlates with poor prognosis and is involved in epithelial ovarian cancer proliferation and invasion. *Eur J Cancer.* 2012; 48:1914-21
9. Zhang P, Zhang P, Shi B, Zhou M, Jiang H, Zhang H, et al. galectin-1 overexpression promotes progression and chemoresistance to cisplatin in epithelial ovarian cancer. *Cell Death Dis.* 2014; 5: e991
10. Ouyang J, Plütschow A, Pogge von Strandmann E, Reiners KS, Ponader S, Rabinovich GA, et al. Galectin-1 serum levels reflect tumor burden and adverse clinical features in classical Hodgkin lymphoma. *Blood.* 2013; 121: 3431-3

11. Chen L, Yao Y, Sun L, Zhou J, Liu J, Wang J, et al. Clinical implication of the serum galectin-1 expression in epithelial ovarian cancer patients. *J Ovarian Res.* 2015; 8: 78
12. Al-Salam S, Hashmi S. Galectin-1 in early acute myocardial infarction. *PLoS One.* 2014; 9: e86994. doi: 10.1371/journal.pone.0086994.
13. Nakahara S, Raz A. Biological modulation by lectins and their ligands in tumor progression and metastasis. *Anticancer Agents Med Chem.* 2008; 8: 22-36
14. Camby I, Le Mercier M, Lefranc F, Kiss R. Galectin-1: a small protein with major functions. *Glycobiology.* 2006; 16: 137-157
15. Spano D, Russo R, Di Maso V, Rosso N, Terracciano LM, Roncalli M, et al. Galectin-1 and its involvement in hepatocellular carcinoma aggressiveness. *Mol Med.* 2010; 16: 102-15
16. Almkvist, J. and Karlsson, A. Galectins as inflammatory mediators. *Glycoconj. J.* 2004; 19: 575-581
17. Heilmann RM, Cranford SM, Ambrus A, Grützner N, Schellenberg S, Ruaux CG, et al. Validation of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the measurement of canine S100A12. *Vet Clin Pathol.* 2016; 45: 135-47
18. Prakash N, Stumbles P, Mansfield C. Initial Validation of Cytokine Measurement by ELISA in Canine Feces. *Open Journal of Veterinary Medicine*, 2013; 3: 282-288
19. Jovanovic M, Zdravkovic N, Jovanovic I, Radosavljevic G, Gajovic N, Zdravkovic N, et al. TGF- β as a marker of ulcerative colitis and disease severity. *Ser J Exp Clin Res* DOI: 10.1515/sjecr-2017-0019
20. Wu MH, Hong TM, Cheng HW, Pan SH, Liang YR, Hong HC, et al. Galectin-1-mediated tumor invasion and metastasis, up-regulated matrix metalloproteinase expression, and reorganized actin cytoskeletons. *Mol Cancer Res* 2009; 7: 311-318
21. Thijssen VL, Postel R, Brandwijk RJ, Dings RP, Nesmelova I, Satijn S, et al. Galectin-1 is essential in tumor angiogenesis and is a target for antiangiogenesis therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103: 15975-15980
22. Tang D, Gao J, Wang S, Yuan Z, Ye N, Chong Y, et al. Apoptosis and anergy of T cell induced by pancreatic stellate cells-derived galectin-1 in pancreatic cancer. *Tumour Biol* 2015; 36: 5617-5626
23. Grosset AA, Labrie M, Vladoiu MC, Yousef EM, Gaboury L, St-Pierre Y. Galectin signatures contribute to the heterogeneity of breast cancer and provide new prognostic information and therapeutic targets. *Oncotarget.* 2016; 7: 18183-203. doi: 10.18632/oncotarget.7784.

24. Astorgues-Xerri L, Riveiro ME, Tijeras-Raballand A, Serova M, Rabinovich GA, Bieche I, et al. OTX008, a selective small-molecule inhibitor of galectin-1, downregulates cancer cell proliferation, invasion and tumour angiogenesis. *Eur J Cancer*. 2014; 50: 2463-77
25. Jung EJ, Moon HG, Cho BI, Jeong CY, Joo YT, Lee YJ, et al. Galectin-1 expression in cancer-associated stromal cells correlates tumor invasiveness and tumor progression in breast cancer. *Int J Cancer*. 2007 Jun 1;120(11):2331-8.
26. Croci DO, Salatino M, Rubinstein N, Cerliani JP, Cavallin LE, Leung HJ, et al. Disrupting galectin-1 interactions with N-glycans suppresses hypoxia-driven angiogenesis and tumorigenesis in Kaposi's sarcoma. *J Exp Med* 2012; 209: 1985-2000
27. Brandt B, Abou-Eladab EF, Tiedge M and Walzel H. Role of the JNK/c-Jun/AP-1 signaling pathway in galectin-1-induced T-cell death. *Cell Death Dis* 2010; 1: e23
28. Barondes SH, Castronovo V, Cooper DN, Cummings RD, Drickamer K, Feizi T, et al. Galectins: a family of animal beta-galactoside-binding lectins. *Cell* 1994; 76: 597-598
29. D'Haene N, Sauvage S, Maris C, Adanja I, Le Mercier M, Decaestecker C, et al. VEGFR1 and VEGFR2 involvement in extracellular galectin-1- and galectin-3-induced angiogenesis. *PLoS One* 2013; 8: e67029
30. Suzuki O and Abe M. Galectin-1-mediated cell adhesion, invasion and cell death in human anaplastic large cell lymphoma: regulatory roles of cell surface glycans. *Int J Oncol* 2014; 44: 1433-1442
31. Johne B, Kronborg O, Tøn HI, Kristinsson J, Fuglerud P. A new fecal calprotectin test for colorectal neoplasia. Clinical results and comparison with previous method. *Scand J Gastroenterol*. 2001 Mar;36(3):291-6.
32. Borovcanin M, Jovanovic I, Radosavljevic G, Djukic Dejanovic S, Stefanovic V, Arsenijevic N, Lukic ML. Antipsychotics can modulate the cytokine profile in schizophrenia: attenuation of the type-2 inflammatory response. *Schizophr Res*.2013;147(1):103-109.
33. Blaser, C, Kaufmann, M, Muller, C, Zimmermann, C, Wells, V, Mallucci, L, et al. Beta-galactoside-binding protein secreted by activated T cells inhibits antigen-induced proliferation of T cells. *Eur. J. Immunol*. 1998; 28: 2311-2319
34. He, J. and Baum, L.G. Presentation of galectin-1 by extracellular matrix triggers T cell death. *J. Biol. Chem*. 2004; 279: 4705-4712
35. Allione, A, Wells, V, Forni, G, Mallucci, L, and Novelli, F. Betagalactoside-binding protein (beta GBP) alters the cell cycle, upregulates expression of the alpha- and beta-chains of the IFN-gamma receptor, and triggers IFN-gamma-mediated apoptosis of activated human T lymphocytes. *J. Immunol*. 1998; 161: 2114-2119

36. Baum L.G, Blackall DP, Arias-Magallano S, Nanigian D, Uh SY, Browne JM, et al. Amelioration of graft versus host disease by galectin-1. *Clin. Immunol.* 2003; 109: 295-307
37. Santucci, L, Fiorucci, S, Rubinstein, N, Mencarelli, A, Palazzetti, B, Federici, B, et al. Galectin-1 suppresses experimental colitis in mice. *Gastroenterology.* 2003; 124: 1381-1394
38. van der Leij, J, van den Berg, A, Blokzijl, T, Harms, G, van Goor, H, Zwiers, P, van Weeghel, R, Poppema, S, and Visser, L. Dimeric galectin-1 induces IL-10 production in T-lymphocytes: an important tool in the regulation of the immune response. *J. Pathol.* 2004; 204: 511-518
39. van den Brule, FA, Waltregny, D, and Castronovo, V. Increased expression of galectin-1 in carcinoma-associated stroma predicts poor outcome in prostate carcinoma patients. *J. Pathol* 2001; 193: 80-87.
40. Camby I, Le Mercier M, Lefranc F, Kiss R. Galectin-1: a small protein with major functions. *Glycobiology.* 2006; 16: 137-157.

Table 1. Baseline characteristics of patients

	Number
Gender (male/female)	34/24
Age (mean [range])	66 [50–82] years
Site (P/D/R)	14/34/10
Nuclear grade (I/II/III)	7/37/14
Stage (TNM: I/II/III/IV)	32/0/14/12
Necrosis (well/moderate/absent)	15/43/0

Note: P: proximal colon; D: distal colon; R: rectum.

Figure 1. Serum and fecal values of Gal-1 and mediators of inflammation and their ratio in patients with CRC, based on histo-pathological characteristics of tumor.

A. *Increased concentration of Gal-1 and Gal-1/IFN- γ ratio in feces and Gal-1/TNF- α ratio in serum, in patients with higher nuclear grade of CRC.* Patients with CRC were divided in three groups, based on nuclear grade (I, II and III). Serum and fecal levels of all mentioned biomarkers were determined by ELISA. Gal-1/IFN- γ and Gal-1/TNF- α ratios were evaluated for each patient, separately.

B. *Increased concentration of Gal-1 in feces and Gal-1/TNF- α ratio in serum of patients with poor histological differentiation of CRC.* Patients with CRC were divided in two groups, according to histological differentiation rate (well and moderate + poor). Statistical significance was tested by Mann–Whitney Rank Sum test or independent samples t-test, where appropriate.

Figure 2. Concentrations of Gal-1 and Gal-1/TNF- α ratio in serum and feces of patients with CRC, based on clinico-pathological characteristics of tumor.

A. *Increased concentration of Gal-1/TNF- α ratio in serum and feces in patients with higher TNM stage of CRC.* Patients with CRC were divided in two groups, based on TNM stage (I+II and III+IV). Serum and fecal levels of all mentioned biomarkers were determined by ELISA. Gal-1/TNF- α ratio was evaluated for each patient, separately.

B. *Increased Gal-1/TNF- α ratio in serum of patients with detectable lymphatic and blood vessel invasion of CRC.* Patients with CRC were divided in two groups, based on the presence of lymphatic/blood vessel invasion (+ and -). Serum levels of all mentioned biomarkers were determined by ELISA. Gal-1/TNF- α ratio was evaluated for each patient, separately. Statistical significance was tested by Mann–Whitney Rank Sum test or independent samples t-test, where appropriate.

Figure 3. Systemic values of Gal-1/TNF- α , Gal-1/IL-1 and Gal-1/IFN- γ ratios in patients with CRC, based on tumor progression.

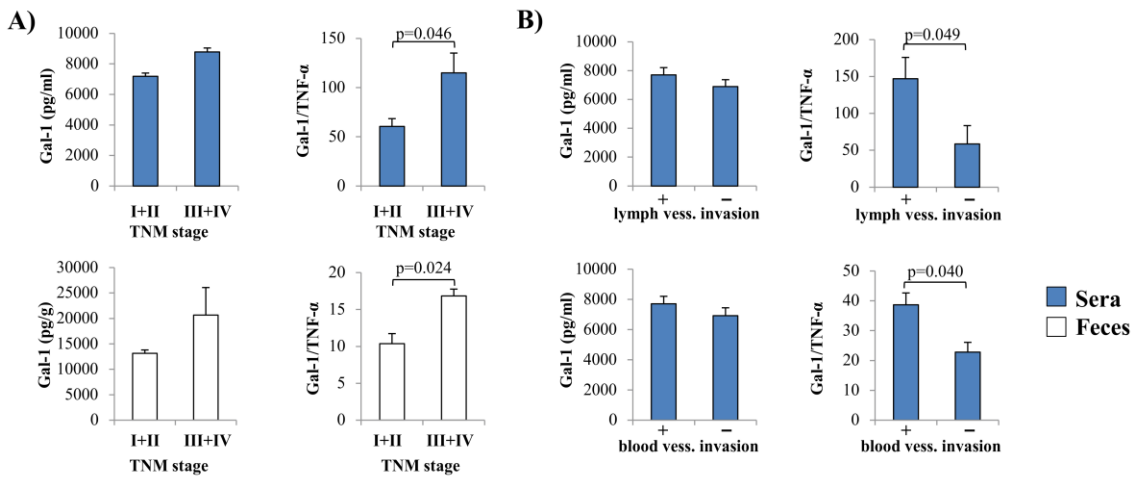
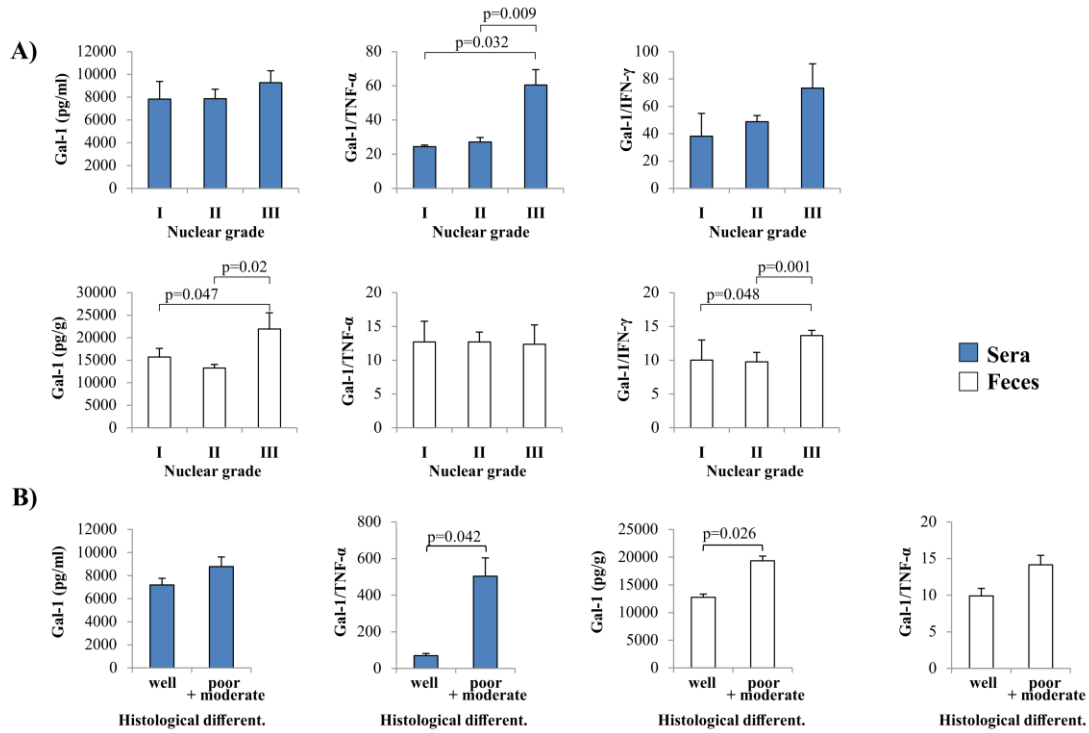
A. *Increased Gal-1/TNF- α and Gal-1/IFN- γ ratios in patients with detectable liver metastasis.* Patients with CRC were divided in two groups, based on presence of liver metastasis (+ and -).

B. *Increased Gal-1/TNF- α , Gal-1/IL-1 and Gal-1/IFN- γ ratios in patients with detectable lung metastasis.* Patients with CRC were divided in two groups, based on presence of lung metastasis (+ and -).

C. *Increased Gal-1/TNF- α and Gal-1/IFN- γ ratios in patients with detectable peritoneal carcinomatosis.* Patients with CRC were divided in two groups, based on presence of carcinomatosis in peritoneum (+ and -).

Serum levels of all mentioned biomarkers were determined by ELISA. Gal-1/TNF- α , Gal-1/IL-1 and Gal-1/IFN- γ ratios were evaluated for each patient, separately. Statistical significance was tested by Mann–Whitney Rank Sum test or independent samples t-test, where appropriate.



Figure 4. Fecal concentration of Gal-1 was positively associated with poorly differentiated tumor and systemic values of tumor markers AFP, CEA and CA 19-9, in patients with CRC. Relationships between values of Gal-1 in feces and histological differentiation stage of tumor tissue and concentrations of AFP, CEA and CA 19-9 in serum were examined by Spearman correlation test. ROC curve illustrates the specificity and sensitivity of fecal Gal-1 in attempt to differentiate histological differentiation stage of tumor tissue: well/moderate vs. poor differentiated.



Received on December 01, 2017.
 Revised on January 10, 2018.
 Accepted on January 11, 2018.
 Online First January, 2018.

Research Article

Fecal Galectin-3: A New Promising Biomarker for Severity and Progression of Colorectal Carcinoma

Milan Jovanovic,¹ Nevena Gajovic ,² Natasa Zdravkovic,³ Marina Jovanovic,³ Milena Jurisevic,⁴ Danilo Vojvodic,⁵ Veljko Maric,⁶ Aleksandar Arsenijevic,² and Ivan Jovanovic ²

¹Department of Abdominal Surgery, Military Medical Academy, Belgrade, Serbia

²Center for Molecular Medicine and Stem Cell Research, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Kragujevac, Serbia

³Department of Internal Medicine, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Kragujevac, Serbia

⁴Department of Pharmacy, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Kragujevac, Serbia

⁵Institute for Medical Research, Military Medical Academy, Belgrade, Serbia

⁶Department of Surgery, Faculty of Medicine Foca, University of East Sarajevo, Sarajevo, Bosnia and Herzegovina

Correspondence should be addressed to Nevena Gajovic; gajovicnevena@yahoo.com

Received 29 December 2017; Revised 26 February 2018; Accepted 5 March 2018; Published 4 April 2018

Academic Editor: Amedeo Amedei

Copyright © 2018 Milan Jovanovic et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Background and Objectives. The aim of the study was to determine systemic and fecal values of galectin-3 and pro- and anti-inflammatory cytokines in patients with CRC and the relationship with clinicopathological aspects. **Methods.** Concentrations of galectin-3, TNF- α , TGF- β , IL-10, and IL-1 β were analyzed in samples of blood and stool of 60 patients with CRC. **Results.** Systemic concentration of TNF- α was significantly lower in patients with severe diseases (advanced TNM stage, nuclear grade, and poor histological differentiation) as in patients with more progressive CRC (lymph and blood vessel invasion, presence of metastasis). Fecal values of anti-inflammatory cytokines TGF- β and IL-10 were increased in patients with severe stadium of CRC. Fecal concentration of Gal-3 was enhanced in CRC patients with higher nuclear grade, poor tumor tissue differentiation, advanced TNM stage, and metastatic disease. Gal-3/TNF- α ratio in sera and feces had a higher trend in patients with severe and advanced diseases. Positive correlation between fecal Gal-3 and disease severity, tumor progression, and biomarkers AFP and CEA, respectively, was also observed. **Conclusions.** Predomination of Gal-3 in patients with advanced diseases may implicate on its role in limiting ongoing proinflammatory processes. The fecal values of Gal-3 can be used as a valuable marker for CRC severity and progression.

1. Introduction

Of cancers that affect both men and women, colorectal cancer (CRC) is the fourth leading cause of cancer death in the world [1, 2]. It is the third most common cancer in males and the second in females [1, 2]. Although the distribution of CRC varies widely, more than two-thirds of all cases and more than half of all deaths happen in countries with high human development index (HDI) [3]. Besides the important role of genetic factors such as mutations of oncogenes and tumor suppressor genes and history of CRC in first-degree relatives, environmental factors, such as inflammatory bowel

disease, increased body mass index (BMI), red meat intake, cigarette smoking, low physical activity, and low vegetable and fruit consumption, are associated with an increased risk of CRC [4, 5]. CRC metastasizes to the liver and lungs, while bone metastasis often indicates the terminal phase of colon cancer [6]. Despite the fact that around 80% of patients with CRC have primary surgery, about half of the patients already have metastatic lesions primarily in the liver [7, 8]. Surgery, as well as radiofrequency ablation, cryosurgery, chemotherapy, radiation therapy, or targeted therapy, is the most common treatment option for CRC [4]. Although a 5-year survival or stage I–III CRC is pretty good, cancer-related

deaths are registered in one-third of patients younger than 65 years old at disease onset [9]. Although the gold standard for CRC diagnosis is a colonoscopy procedure, there is a tendency to use more noninvasive tests such as measurement of different molecules in sera and feces of patients [10]. There has been a sustained interest in the identification of state biomarkers for CRC [11–13]. New markers should contribute to the prediction of prognosis. Recent studies revealed the significance of estimation of fecal markers in the determination and prediction of disease severity [14–16].

Galectin-3 (Gal-3) is a multifunctional β -galactoside-binding lectin highly expressed in a variety of inflammatory and epithelial cells [17]. Multiple functions of Gal-3 depend on its location inside the cell or on the cell surface [18]. It is well known that Gal-3 is involved in several biological processes such as cell attachment, cell differentiation and proliferation, embryogenesis, inflammation, cancer invasion, and metastasis [19, 20]. Previous studies revealed the importance of Gal-3 as a prognostic marker in CRC. It is shown that patients with detectable expression of Gal-3 in tumor have more lymph node and distant metastases, frequent venous invasion, and deeper wall invasion in comparison to those with Gal-3-negative cases [21]. Moreover, a recent study revealed that serum galectin-3 and carcinoembryonic antigen (CEA) promote CRC migration and metastasis [22].

The aim of this study was to evaluate systemic and fecal values of Gal-3 and pro- and anti-inflammatory cytokines, as well as their ratios, in patients with CRC and UC and the relationship with clinicopathological aspects of disease. We demonstrate enhanced fecal concentration of Gal-3 in CRC patients with higher nuclear grade, poor tumor tissue differentiation, advanced TNM stage, and metastatic disease, while predominance of Gal-3 over proinflammatory cytokines in patients with advanced TNM stage and metastatic disease. Fecal Gal-3 positively correlates with disease severity (advanced TNM stage, higher nuclear grade, and poor tumor tissue differentiation) and progression (presence of lung/liver metastasis or peritoneal carcinomatosis) and systemic biomarkers AFP and CEA. There was no significant correlation between fecal Gal-3 and clinical and endoscopic scores and histopathological characteristics of affected tissue in patients with ulcerative colitis. These findings indicate Gal-3 as a potential marker of CRC severity and progression.

2. Materials and Methods

2.1. Ethics Approval. The study was conducted at Center for Gastroenterology, Clinical Center of Kragujevac, and Center for Molecular Medicine and Stem Cell Research, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Serbia. Informed consent was obtained from all subjects. The study was approved by the ethics committee of the Clinical Center of Kragujevac, Kragujevac, Serbia, and Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Serbia. All research procedures were made according to the principle of Good Clinical Practice and the Declaration of Helsinki.

2.2. Patients. The study included 60 patients with CRC. The diagnosis of CRC was based on endoscopic and

histopathological criteria. Patients with no well-defined pathology, no adequate clinical document available, or previously treated with radiation or chemotherapy were excluded from the study. Clinicopathological information for all patients included sex, age, TNM stage, vascular/lymph node invasion, nuclear grade, and differentiation. Blood and stool specimens were collected before the surgery and stored at -80°C . Pathological features were analyzed according to the 2010 American Joint Committee on Cancer (AJCC) classification.

Fifty patients, with a median age of 55 (range, 23–73 years), diagnosed as UC cases, were also enrolled in this study. Diagnosis was made on the basis of established clinical, endoscopic, and histological criteria [23]. The study did not include patients without well-defined pathology, no adequate clinical document available, or with previously diagnosed coexisting cardiopulmonary, renal, hepatic, allergy, and rheumatic disease who were treated with anti-inflammatory drugs. Stool samples were collected before the surgery and stored at -80°C . Clinical activity of disease and endoscopic findings were represented as Mayo clinical/endoscopic subscore, defined as previously described [24–26]. Histological activity was scored according to Geboes Score (GS), considering the presence of architectural changes, neutrophils, eosinophils, crypt destruction, and erosion of the mucous membranes [27].

2.3. Measurement of Galectin-3, TNF- α , TGF- β , IL-10, and IL-1 β in Sera and Feces. All samples were collected prior to any therapeutic application. Blood specimens were collected from each studied subject; blood clot was cut and centrifuged for separating the serum; and all serum samples were kept at -80°C before use. Stools (1–10 g) were collected in sterile containers and weighed. They were divided into 1 g aliquot and then emulsified in 5 mL of protease inhibitor cocktail (SIGMA, P83401), diluted 1:100, and centrifuged for 5 minutes at 400g, at 4°C , as previously described [28, 29]. The supernatant fluid was collected and stored at -80°C until ELISA. Serum and fecal concentrations of cytokines were measured, as described [30], using sensitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kits (R&D Systems, Minneapolis, MN) specific for human cytokines according to the manufacturer's instructions. Briefly, the PVC microtiter plates were coated with capture antibody, overnight. After blocking the remaining protein-binding sites by adding blocking buffer (1% bovine serum albumin in PBS) for 1 hour, serum/fecal samples or standard recombinant Gal-3/TNF- α /IL-1 β /TGF- β /IL-10 were added to the plates for 2 hours, followed by application of biotinylated detection antibody for 1 hour at room temperature. After introduction of streptavidin peroxidase for 1 hour, the plates were developed with substrate reagent for 20 minutes. The reaction was stopped by adding 4 mol/L sulfuric acid, and the absorbance was read at 495 nm by a microplate reader. Concentration of the samples was measured by interpolation from the standard curve made by a series of well-known concentrations as per manufacturer's instruction. Values of measured cytokines are presented as pg/ml of sera and pg/g of feces, respectively. The lower detection limit (sensitivity) of the ELISA

kits, for measured cytokines, was galectin-3: 85 pg/ml; TNF- α : 5.5 pg/ml; TGF- β : 15.4 pg/ml; IL-10: 3.9 pg/ml, and IL-1 β : 1 pg/ml.

2.4. Evaluation of Tumor Markers in Sera. Serum levels of tumor markers alpha-fetoprotein (AFP), carcinoembryonic antigen (CEA), and cancer antigen 19-9 (CA19-9) were determined by chemiluminescence enzyme immunoassay (CLIA) in the central biochemical laboratory of the Clinical Center Kragujevac.

2.5. Statistical Analysis. The statistical analyses were performed using SPSS 20.0 software. The results were reported as mean, standard deviation (SD), and standard error (SE). Determination of statistically significant difference between the means of two groups was determined using Student's *t*-test for independent samples if the data had normal distribution or Mann-Whitney *U* test for data without normal distribution. Kruskal-Wallis test was used to determine statistically significant difference between the means of three groups. Pearson's correlation evaluated the possible relationship between the cytokines and disease severity and progression in patients with CRC. The strength of correlation was defined as negative or positive weak (-0.3 to -0.1 or 0.1 to 0.3), moderate (-0.5 to -0.3 or 0.3 to 0.5), or strong (-1.0 to -0.5 or 1.0 to 0.5). A *p* value of 0.05 was considered statistically significant.

3. Results

Sixty adult patients with CRC and fifty with UC were included in this study. There was no significant difference in gender distribution. The average age of all patients with CRC is 64 ± 1 and of patients with UC is 55 ± 1 . Clinical and pathologic characteristics of these patients are presented in Table 1. We have assessed concentration of pro- and anti-inflammatory cytokines, as well as Gal-3, and tumor markers (AFP, CEA, and CA19-9) in serum and feces liquid fraction.

3.1. Fecal Concentration of Gal-3 Associated to Histopathologic Characteristics of CRC. Firstly, patients with CRC were classified in four groups based on the nuclear grades of tumor tissue: I, II, III, and IV. This classification was based on the evaluation of the size and shape of the nucleus in tumor cells and the percentage of tumor cells that are in the process of dividing or growing [31]. Recent studies have shown associations between nuclear grading and aggressiveness underscoring the importance of nuclear grading beyond prognostic stratification [31, 32]. We did not estimate nuclear grade IV in any of the CRC patients. Evaluation of systemic levels of the previously defined markers of interest revealed significantly lower level of TNF- α in the group of patients with nuclear grade III in comparison to patients with nuclear grade I or II ($p = 0.001$; Figure 1(a)). There were no statistical differences in the serum level of Gal-3 between the defined groups. However, Gal-3/TNF- α ratio was significantly higher in the patients with nuclear grade III ($p = 0.001$; Figure 1(a)). There was no significant difference in the fecal level of TNF- α between the patients with different nuclear grades of CRC (Figure 1(a)). We noticed significant

TABLE 1: Baseline characteristics of patients.

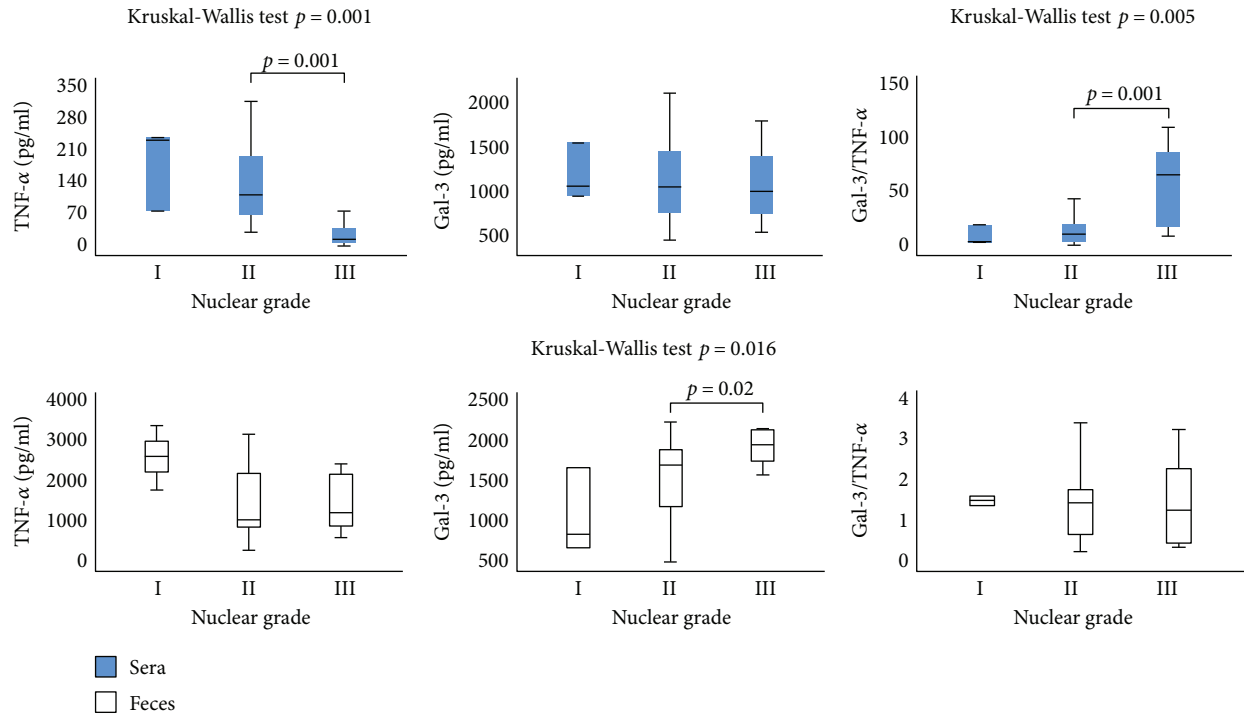
	Number
Colorectal carcinoma (CRC)	
Gender (male/female)	35/25
Age (mean (range))	64 (50–82) years
Site (P/D/R)	15/34/11
Nuclear grade (I/II/III)	8/37/15
Histological differentiation rate (well/moderate/poor)	11/33/16
Stage (TNM: I/II/III/IV)	42/0/16/12
Necrosis (well/moderate/absent)	16/44/0
Ulcerative colitis (UC)	
Gender (male/female)	29/21
Age (mean (range))	55 (23–73) years
Endoscopic score (0/I/II/III)	0/26/16/8
Clinical score (0/I/II/III)	0/28/14/8
Crypt destruction (0/I/II/III)	4/25/9/12
Erosion of the mucous membranes (0/I/II/III/IV)	12/13/6/9/10
Architectural changes (0/I/II/III)	0/23/14/13
Neutrophil infiltration (0/I/II/III)	5/19/8/18
Eosinophil infiltration (0/I/II/III)	10/16/13/11

P: proximal colon; D: distal colon; R: rectum.

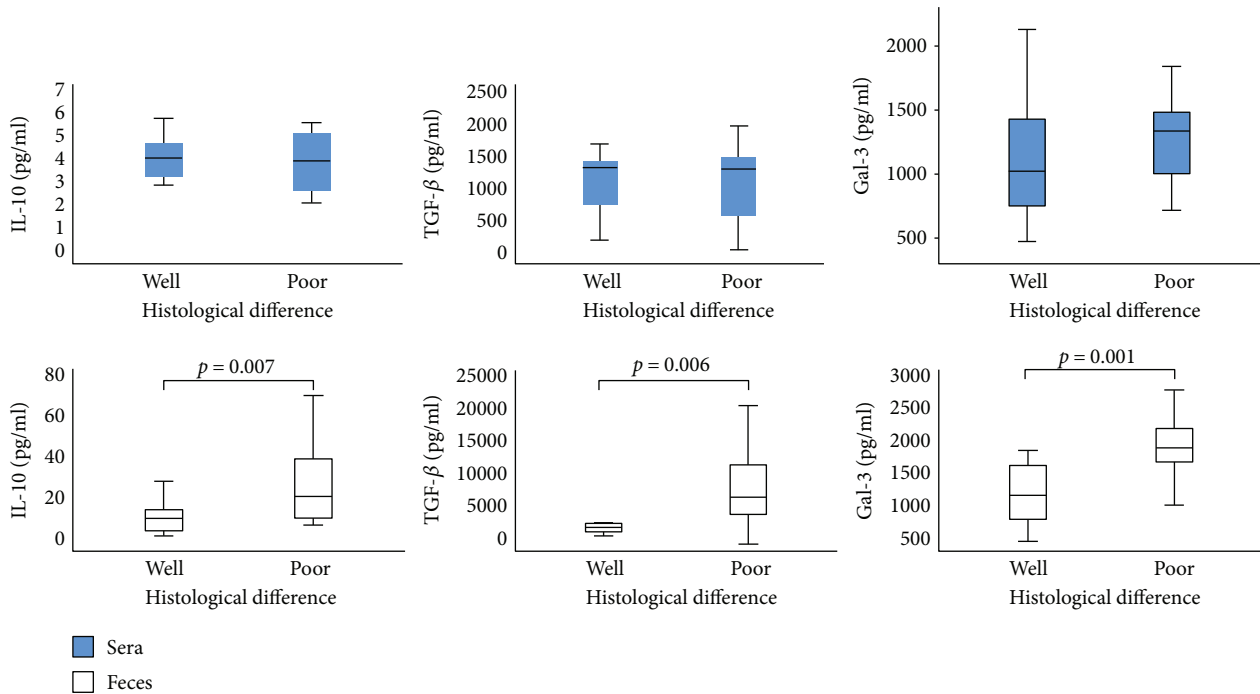
increment of the fecal level of Gal-3 in the group of patients with nuclear grade III compared to grades I and II ($p = 0.02$), while there was no difference in the Gal-3/TNF- α ratio (Figure 1(a)).

Next, patients were divided into two groups according to histological differentiation rate: well/moderate and poor. Well-differentiated and moderately differentiated tumors (well/moderate) were defined as low-grade lesions, whereas poorly differentiated tumors (poor) were defined as high-grade lesions according to the WHO guidelines [33]. Grading was based on the evaluation of the worst area, excluding areas of focal dedifferentiation present at the invasive margin of the tumor [34]. Poorly differentiated tumors have repeatedly been shown to behave more aggressively than well/moderate-differentiated carcinomas in multivariate analysis [34]. We did not find significant differences in the serum level of IL-10, TGF- β , and Gal-3 between the defined groups (Figure 1(b)). However, fecal levels of Gal-3 ($p = 0.001$) and anti-inflammatory cytokines IL-10 ($p = 0.007$) and TGF- β ($p = 0.006$) were significantly higher in patients with poorly differentiated CRC (Figure 1(b)).

3.2. Fecal Gal-3 and Gal-3/TNF- α Ratio Associated with TNM System and Lymph and Blood Vessel Invasion. Patients with CRC were divided into two categories on the basis of TNM stage of disease: I+II and III+IV. Patients with TNM stages III+IV revealed significantly lower TNF- α in sera in comparison to patients with TNM stages I+II ($p = 0.006$; Figure 2(a)). There were no differences in the serum level of TGF- β and Gal-3 (Figure 1(b)). The Gal-3/TNF- α ratio was higher in the sera of patients with



(a)



(b)

FIGURE 1: (a) Increased concentration of Gal-3 in feces and Gal-3/TNF- α ratio in sera, in patients with a higher nuclear grade of CRC. Patients with CRC were divided into three groups, based on nuclear grades (I, II, and III). Serum and fecal levels of all mentioned biomarkers were determined by ELISA. Gal-3/TNF- α ratios were evaluated for each patient, separately. Kruskal-Wallis test was used to determine statistically significant difference between the means of three groups. (b) Increased concentrations of IL-10, TGF- β , and Gal-3 in the feces of patients with poor histological differentiation of CRC. Patients with CRC were divided into two groups, according to histological differentiation rate (well/moderate and poor). Statistical significance was tested by Mann-Whitney Rank Sum test.

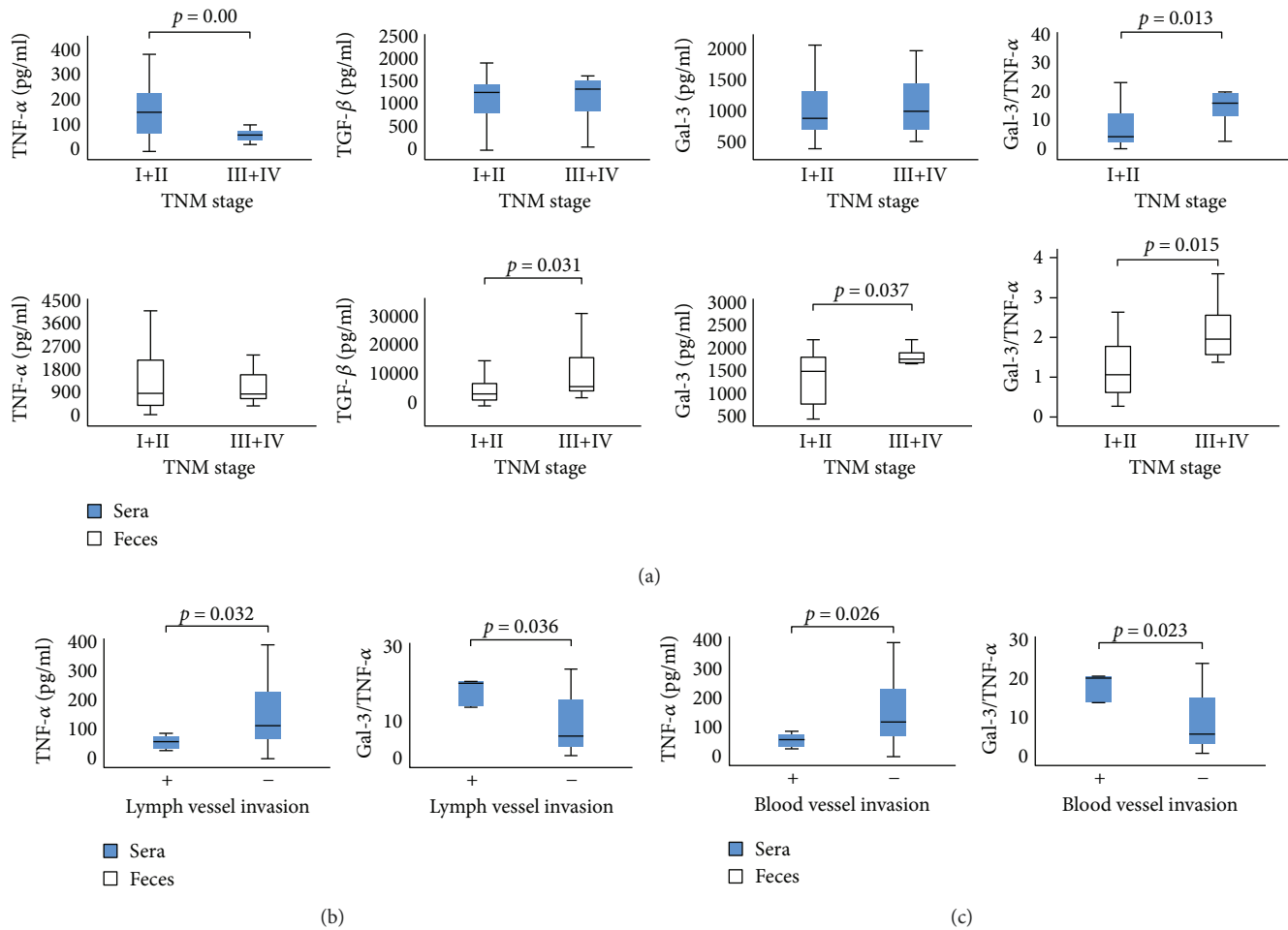


FIGURE 2: (a) Increased concentration of TGF- β , Gal-3, and Gal-3/TNF- α ratios in feces in patients with higher TNM stage of CRC. The patients with CRC were divided into two groups, based on the TNM stage (I+II and III+IV). Serum and fecal levels of all mentioned biomarkers were determined by ELISA. Gal-3/TNF- α ratio was evaluated for each patient, separately. (b-c) Decreased TNF- α and increased Gal-3/TNF- α ratio in the sera of patients with detectable lymphatic and blood vessel invasion of CRC. The patients with CRC were divided into two groups, based on the presence of lymphatic/blood vessel invasion (+ and -). Serum levels of all mentioned biomarkers were determined by ELISA. Gal-3/TNF- α ratio was evaluated for each patient, separately. Statistical significance was tested by Mann-Whitney Rank Sum test or independent samples *t*-test, where appropriate.

TNM stages III+IV, but this difference did not reach statistical significance (Figure 2(a)).

As shown in Figure 2(a), CRC patients with higher TNM stages appear to have a higher fecal level of TGF- β ($p = 0.031$). There was no difference in the fecal level of TNF- α between the defined groups (Figure 2(a)). We noticed a higher fecal level of Gal-3 ($p = 0.037$) as well as Gal-3/TNF- α ratio ($p = 0.015$) in patients with TNM stages III+IV (Figure 2(a)).

Further, we divided the patients based on the invasion of lymph and blood vessels, respectively (+ and -), and analyzed their serum levels of biomarkers. TNF- α was significantly decreased in patients with detected lymph or blood vessel invasion ($p = 0.032$; $p = 0.026$; Figures 2(b) and 2(c)). Moreover, an increased Gal-3/TNF- α ratio in sera was evaluated in patients with detectable lymphatic ($p = 0.036$) and blood vessel invasion ($p = 0.023$; Figures 2(b) and 2(c)).

3.3. Liver, Lung, and Peritoneal Metastasis Associated with Higher Fecal Gal-3. Next groups of patients with CRC were made according to the presence of lung/liver metastasis or peritoneal carcinomatosis, respectively, and analyzed for values of Gal-3 and other mediators of interest. There were no differences in the systemic concentrations of IL-1 β and Gal-3 between the patients with and without metastasis/carcinomatosis (Figure 3). Lower TNF- α but a higher Gal-3/TNF- α ratio was found in the sera of patients with detectable liver metastasis, lung metastasis, or peritoneal carcinomatosis, in comparison to patients without metastasis/carcinomatosis ($p < 0.05$ all, Figure 3). Feces concentration of IL-1 β was significantly lower while the level of Gal-3 was significantly higher in patients with metastasis/carcinomatosis. There were no differences in the feces levels of TNF- α and neither in the Gal-3/TNF- α ratio between the defined groups.

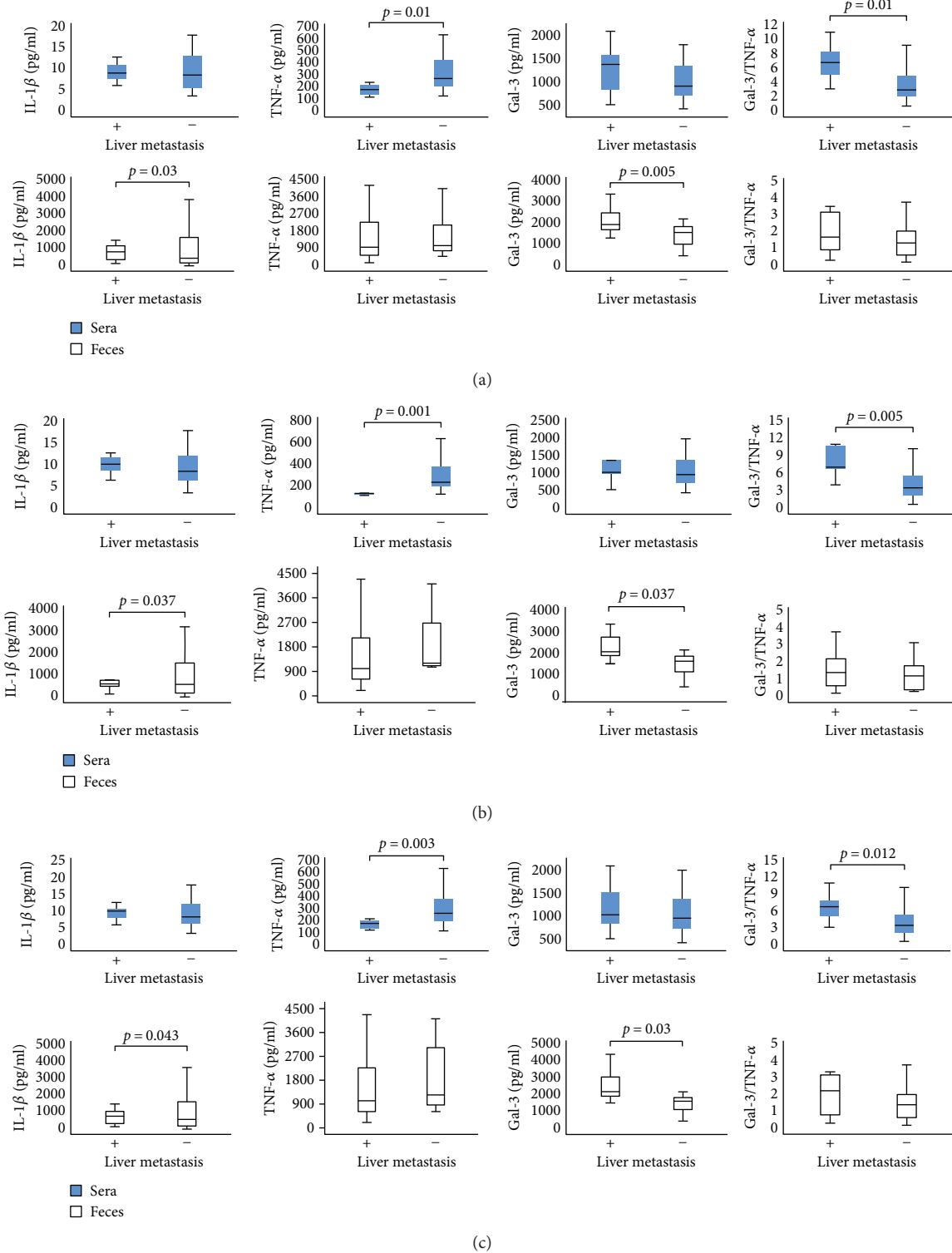


FIGURE 3: (a) Decreased fecal IL-1 β and systemic TNF- α , while increased fecal Gal-3 and systemic Gal-3/TNF- α ratios in patients with detectable liver metastasis. Patients with CRC were divided into two groups, based on the presence of liver metastasis (+ and -). (b) Decreased fecal IL-1 β and systemic TNF- α , while increased fecal Gal-3 and systemic Gal-3/TNF- α ratios in patients with detectable lung metastasis. The patients with CRC were divided into two groups, based on the presence of lung metastasis (+ and -). (c) Decreased fecal IL-1 β and systemic TNF- α , while increased fecal Gal-3 and systemic Gal-3/TNF- α ratios in patients with detectable peritoneal carcinomatosis. The patients with CRC were divided into two groups, according to the presence of carcinomatosis in peritoneum cavity (+ and -). The serum levels of all mentioned biomarkers were determined by ELISA. Gal-3/TNF- α ratio was evaluated for each patient, separately. The statistical significance was tested by Mann-Whitney Rank Sum test.

3.4. Fecal Gal-3 Concentration Significantly Correlated with CRC Severity, but Not with UC Severity. The relationship between fecal Gal-3 and the clinicopathological parameters of patients with CRC and UC, respectively, were summarized in Table 2. An analysis revealed a positive correlation between fecal galectin-3 and parameters and markers of disease severity and progression. There is a moderate positive correlation between fecal galectin-3 and nuclear grade ($r = 0.358$; $p = 0.025$), histological type ($r = 0.543$; $p = 0.001$), TNM stage ($r = 0.339$; $p = 0.035$), presence of liver metastasis ($r = 0.406$; $p = 0.004$), presence of lung metastasis ($r = 0.303$; $p = 0.036$), presence of peritoneal carcinomatosis ($r = 0.420$; $p = 0.003$), and tumor markers AFP ($r = 0.438$; $p = 0.002$) and CEA ($r = 0.308$; $p = 0.049$). We did not find a correlation between systemic galectin-3 and the same parameters (data not shown). Further, we found no correlation between fecal Gal-3 and parameters and markers of UC severity (endoscopic score, clinical score, crypt destruction, erosion of the mucous membranes, architectural changes, neutrophil infiltration, and eosinophil infiltration; Table 2).

Analysis of Receiver Operating Characteristic (ROC) curves of fecal galectin-3 for various stages and parameters of CRC found that galectin-3 level in feces could predict disease severity (Figure 4). The analysis showed that Gal-3 can be a valuable marker for distinguishing the nuclear grade (sensitivity 88.7%, specificity 83.8%) and histological type of CRC (sensitivity 88.7%, specificity 83.8%), TNM stage (sensitivity 88.7%, specificity 83.8%), presence of liver metastasis (sensitivity 88.7%, specificity 83.8%), lung metastasis (sensitivity 88.7%, specificity 83.8%), and peritoneal carcinomatosis (sensitivity 88.7%, specificity 83.8%). The optimal cutoff value estimated for Gal-3 that allows the discrimination of stages of CRC progression was 1958.82 pg/g. For this cutoff, we determined sensitivity to be 81.8% and specificity 60.7%.

4. Discussion

Disease severity depends of cytokine milieu that dominates in a tumor environment. Previous studies established that presence of CD4+ Th1 cells and cytotoxic CD8+ T cells (CTLs) in tumor microenvironment presents positive prognostic sign, while presence of Treg and Th2/Th17 cells indicates lower survival of patients with CRC [35, 36]. Predomination of proinflammatory TNF- α /IFN- γ -producing Th1 cells, besides enhancing CTL activity, also facilitates innate antitumor mechanisms and associates with the absence of metastatic invasion, tumor recurrence, and increased survival of patients with CRC [37–39]. On contrary, Th2-polarized CD4+ T cells produce IL-4, IL-10, and IL-13, enhancing local humoral immunity and suppressing Th1 immune response [36]. In line with this phenomenon, previous studies have shown that patients with bladder and colorectal cancer have decreased proportions of IFN- γ /IL-2-producing Th1 cells, while increased proportions of IL-4/IL-10-producing Th2 cells, in peripheral blood [40, 41]. Presence of immunosuppressive TGF- β /IL-10-producing innate/adaptive immune cells correlates with advanced disease and poor prognosis [35]. In the present study, we analyzed concentration of pro- and anti-inflammatory cytokines in sera

TABLE 2: Correlation between the fecal level of Gal-3 and parameters of disease severity and progression in patients with CRC and UC. Statistical significance was tested by Spearman correlation coefficient.

Variables	Gal-3	
	Spearman's rho	p value
CRC		
Nuclear grade	0.358	0.025
Histological type	0.543	0.001
Dukes stage	0.339	0.035
Liver metastasis	0.406	0.004
Lung metastasis	0.303	0.036
Peritoneal carcinomatosis	0.420	0.003
AFP	0.438	0.002
CEA	0.308	0.049
CA19-9	0.254	0.088
UC		
Endoscopic score	0.187	0.172
Clinical score	0.091	0.511
Crypt destruction	0.193	0.159
Erosion of the mucous membranes	0.170	0.215
Architectural changes	0.100	0.468
Neutrophil infiltration	0.107	0.435
Eosinophil infiltration	0.035	0.799

and feces of patients with CRC. Systemic values of proinflammatory cytokine TNF- α were significantly lower in patients with severe disease (TNM stages III and IV, poor histological differentiation, and nuclear grade III) (Figures 1 and 2). Moreover, systemic TNF- α was significantly lower in patients with more progressive CRC (lymph and blood vessel invasion and presence of metastasis in the liver, lung, and peritoneal carcinomatosis; Figures 2 and 3). Local values of cytokines in liquid fraction of feces have shown predomination of anti-inflammatory cytokines TGF- β and IL-10 in patients with severe stadium of CRC (TNM stages III and IV, poor histological differentiation) as well as lower level of proinflammatory IL-1 β in patients with a more progressive disease (presence of metastasis in the liver, lung, and peritoneal carcinomatosis; Figures 1, 2, and 3). These results are in line with our and other previous studies claiming that serum levels of IL-10 and TGF- β were increased in patients with CRC in comparison to healthy controls and that CRC patients with worse prognosis had increased systemic concentration of IL-10 compared to patients with better prognosis [11, 42].

Gal-3 is involved in various biological and pathological processes, such as cell proliferation and differentiation, cell and extracellular matrix interactions, metastasis, and regulation of apoptosis [43, 44]. Earlier studies have investigated possible linkage between Gal-3 and CRC. Immunohistochemical staining confirmed that colon cancer with detected Gal-3 was significantly larger, with deeper invasion to the colonic wall and with poor histological differentiation [25, 45]. Others showed that Gal-3 upregulation correlated with

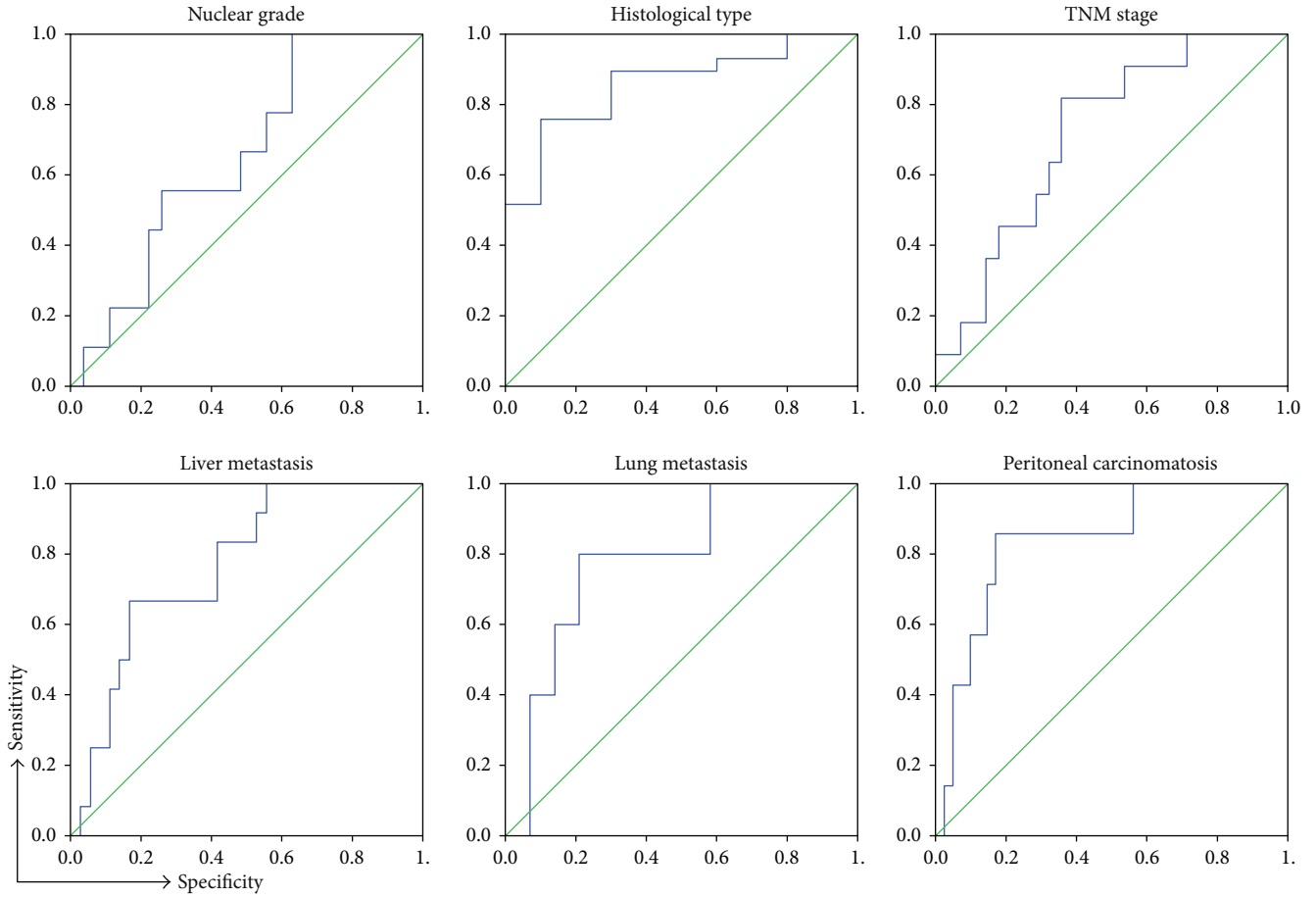


FIGURE 4: Specificity and sensitivity of fecal Gal-3. ROC curves illustrate the specificity and sensitivity of fecal Gal-3 comparing nuclear grade, histological type of tumor tissue (well/moderate versus poor differentiated), TNM stage (I+II versus III+IV), presence of liver metastasis (+ versus -), lung metastasis (+ versus -), and peritoneal carcinomatosis (+ versus -).

tumor progression and predicted shorter survival of CRC patients [46]. In contrast, some studies showed decreased Gal-3 levels in CRC progression and that there was no significant correlation between galectin-3 and tumor staging of colon cancer [13, 47]. These findings highlight the importance of extracellular Gal-3 in CRC biology. Recently, studies point on significance of measuring biomarkers in feces [14, 15]. In this way, proteins and molecules produced by intestinal mucosa are measured, which reflect condition in bowels [48]. Recent studies have shown elevated fecal values of M2 pyruvate kinase, fecal calprotectin, and iFOBT in CRC and suggested for screening high-risk groups for CRC [49]. Today, researchers are testing diagnostic accuracy of different fecal markers in the detection of cancerous lesions in the colon, in order to find the most accurate for CRC screening. To our knowledge, this is the first study testing fecal Gal-3 for detection of severe and progressive forms of CRC. We have not found differences in the systemic level of Gal-3 between different stages of colorectal cancer. However, significantly increased fecal level of Gal-3 was detected in patients with a more severe stage of CRC (poor histological differentiation and higher nuclear grade and TNM stages III and IV; Figures 1 and 2). Moreover, fecal Gal-3 was significantly increased in patients with lymph and blood vessel

invasion and with presence of metastasis in the liver, lung, or peritoneal carcinomatosis, respectively (Figures 2 and 3).

As it is well known that the ratio of counterregulatory cytokines is a reliable marker of the disease process, we have analyzed the ratio of Gal-3 with pro- and anti-inflammatory cytokines. There were no differences in the ratio of Gal-3 and TGF- β , IL-10, and IL-1 β . However, we noticed predominance of Gal-3 over proinflammatory cytokine TNF- α in sera and feces of patients with more severe and progressive stadium of CRC (Figures 1, 2, and 3). Based on these findings, we believe that the Gal-3/TNF- α ratio could be a predictor for the advanced stages of colorectal cancer. There are few possible mechanisms that can explain the potential role of Gal-3 in CRC progression. Firstly, Gal-3 can exert anti-inflammatory effect. The role of Gal-3 in the onset, progression and resolution of inflammation is well established [19]. It is well known that during inflammation, reactive oxygen species and other toxic products accumulate in cell and induce production of advanced glycation end products (AGEs) [50]. Further, AGEs bind to receptor (RAGE) thus facilitating local inflammation [51]. Gal-3 inhibits AGE-RAGE pathway and subsequently suppresses RAGE-induced inflammation in tissue [52]. Another possible mechanism of act of Gal-3 is direct inhibition of cellular immune

response, by inhibiting interaction between T cells and antigen-presenting cells [53]. Others claimed that extracellular galectin-3 induces apoptosis of CD4 or CD8 T cells in the tumors and can suppress IFN- γ secretion of human cytotoxic T cells in tumor [54]. We are first to describe prevalence of Gal-3 over TNF- α in stool of patients with severe and progressive forms of CRC (Figures 2 and 3).

Besides these roles in immunomodulation, Gal-3 can facilitate migration of colon cancer cells through the K-Ras-Raf-Erk1/2 pathway [55]. Gal-3 can exert clustering of integrins, leading to cell motility, while binding to mucin-1, a molecule that dominates in gastrointestinal environment and facilitates transendothelial invasion [56].

Further in this study, we envisage the possible role of fecal galectin-3 as a biomarker in preceding disease severity and progression. We obtained a positive correlation between the fecal Gal-3 and disease severity (advanced TNM stage, higher nuclear grade, and poor tumor tissue differentiation; Table 2 and Figure 4). Moreover, the fecal level of Gal-3 is in a positive correlation with more progressive CRC (presence of lung/liver metastasis or peritoneal carcinomatosis; Figure 4). We have also shown a strong positive correlation between the fecal Gal-3 and biomarkers AFP and CEA, respectively (Table 2). Interestingly, we did not find a correlation of serum Gal-3 with the same parameters and markers of the disease severity. Also, values of Gal-3 in feces are about two to three times higher than those in sera, what makes measurement in feces a more sensitive method. In CRC, AFP and CEA have been used as reliable tumor markers for monitoring tumor progression. Recent studies demonstrated that Gal-3 interacts with CEA, promoting colorectal cancer cell migration, adhesion, and subsequent metastasis [22, 57]. Analysis on UC patients revealed that fecal Gal-3 does not correlate with the endoscopic and clinical Mayo score, as well as with histopathological parameters of the affected tissue, and is not suitable for evaluation of severity of UC (Table 2).

Analysis of Receiver Operating Characteristic (ROC) curves of Gal-3 and disease parameters and markers for CRC revealed that Gal-3 could predict an advanced TNM stage, higher nuclear grade, and poor tumor tissue differentiation as well as the presence of lung/liver metastasis or peritoneal carcinomatosis, at good sensitivity and specificity. According to our findings, fecal Gal-3 could be a valuable marker for CRC severity and progression.

5. Conclusions

In summary, increased local values of Gal-3, reflected through a higher fecal concentration, in CRC patients with a higher nuclear grade, poor tumor tissue differentiation, and advanced TNM stage of disease, may be considered as a sign of the tumor's malignant progression and, consequently, of a poor prognosis for patients. Predominance of Gal-3 over proinflammatory cytokine TNF- α , in patients with advanced and progressive disease, may implicate on immunomodulatory role of Gal-3 in limiting ongoing proinflammatory processes and preventing potent antitumor immune response. This phenomenon favors tumor immune escape and long-range dissemination of tumoral cells

(metastasis). Furthermore, the fecal values of Gal-3 can be used as a valuable marker for CRC severity and progression and not for UC severity. These observations support the idea that Gal-3 may contribute to the immune privilege of tumors by modulating local immune response and point on possible role of fecal Gal-3 as a state and progression marker of CRC and its potential use as a therapeutic target.

Conflicts of Interest

The authors declare that they have no conflict of interests.

Authors' Contributions

Milan Jovanovic, Nevena Gajovic, and Ivan Jovanovic wrote the manuscript. Marina Jovanovic and Nevena Gajovic collected the data. Milan Jovanovic, Marina Jovanovic, Veljko Maric, Aleksandar Arsenijevic, and Natasa Zdravkovic were involved in the analysis and interpretation of the data. Milena Jurisevic, Danilo Vojvodic, and Ivan Jovanovic contributed towards conception and design. All the authors have approved the final version of this manuscript. Milan Jovanovic and Nevena Gajovic contributed equally to this work.

Acknowledgments

The authors thank Aleksandar Ilic and Milan Milojevic for the excellent technical assistance. This work was supported by grants from the Serbian Ministry of Science and Technological Development (175071, 175069), Serbia, and from the Faculty of Medical Sciences Kragujevac (Project JP 04/15), Serbia.

References

- [1] M. Arnold, M. S. Sierra, M. Laversanne, I. Soerjomataram, A. Jemal, and F. Bray, "Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality," *Gut*, vol. 66, no. 4, pp. 683–691, 2017.
- [2] M. Ponz de Leon, G. Rossi, C. di Gregorio et al., "Epidemiology of colorectal cancer: the 21-year experience of a specialised registry," *Internal and Emergency Medicine*, vol. 2, no. 4, pp. 269–279, 2007.
- [3] J. Ferlay, I. Soerjomataram, R. Dikshit et al., "Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012," *International Journal of Cancer*, vol. 136, no. 5, pp. E359–E386, 2015.
- [4] A. R. Marley and H. Nan, "Epidemiology of colorectal cancer," *International Journal of Molecular Epidemiology and Genetics*, vol. 7, no. 3, pp. 105–114, 2016.
- [5] C. M. Johnson, C. Wei, J. E. Ensor et al., "Meta-analyses of colorectal cancer risk factors," *Cancer Causes & Control*, vol. 24, no. 6, pp. 1207–1222, 2013.
- [6] E. S. Roth, D. T. Fetzter, B. J. Barron, U. A. Joseph, I. W. Gayed, and D. Q. Wan, "Does colon cancer ever metastasize to bone first? A temporal analysis of colorectal cancer progression," *BMC Cancer*, vol. 9, no. 1, p. 274, 2009.
- [7] A. Wiegering, J. Riegel, J. Wagner et al., "The impact of pulmonary metastasectomy in patients with previously resected colorectal cancer liver metastases," *PLoS One*, vol. 12, no. 3, article e0173933, 2017.

- [8] J. N. Primrose, "Treatment of colorectal metastases: surgery, cryotherapy, or radiofrequency ablation," *Gut*, vol. 50, no. 1, pp. 1–5, 2002.
- [9] T. Veen, K. Stormark, B. S. Nedrebø et al., "Long-term follow-up and survivorship after completing systematic surveillance in stage I-III colorectal cancer: who is still at risk?," *Journal of Gastrointestinal Cancer*, vol. 46, no. 3, pp. 259–266, 2015.
- [10] T. M. Geiger and R. Ricciardi, "Screening options and recommendations for colorectal cancer," *Clinics in Colon and Rectal Surgery*, vol. 22, no. 4, pp. 209–217, 2009.
- [11] N. Zdravkovic, M. Pavlovic, G. Radosavljevic, and I. Jovanovic, "Serum levels of immunosuppressive cytokines and tumor markers in metastatic colorectal carcinoma," *Journal of BUON*, vol. 22, pp. 1–8, 2017.
- [12] N. D. Zdravkovic, I. P. Jovanovic, G. D. Radosavljevic et al., "Potential dual immunomodulatory role of VEGF in ulcerative colitis and colorectal carcinoma," *International Journal of Medical Sciences*, vol. 11, no. 9, pp. 936–947, 2014.
- [13] K. L. Wu, H. H. Chen, C. T. Pen et al., "Circulating galectin-1 and 90K/mac-2BP correlated with the tumor stages of patients with colorectal cancer," *BioMed Research International*, vol. 2015, Article ID 306964, 7 pages, 2015.
- [14] M. Wagner, C. G. Peterson, P. Ridefelt, P. Sangfelt, and M. Carlson, "Fecal markers of inflammation used as surrogate markers for treatment outcome in relapsing inflammatory bowel disease," *World Journal of Gastroenterology*, vol. 14, no. 36, pp. 5584–5589, 2008.
- [15] J. A. Tibble, G. Sigthorsson, S. Bridger, M. K. Fagerhol, and I. Bjarnason, "Surrogate markers of intestinal inflammation are predictive of relapse in patients with inflammatory bowel disease," *Gastroenterology*, vol. 119, no. 1, pp. 15–22, 2000.
- [16] J. Tibble, K. Teahon, B. Thjodleifsson et al., "A simple method for assessing intestinal inflammation in Crohn's disease," *Gut*, vol. 47, no. 4, pp. 506–513, 2000.
- [17] L. Larsen, H. Y. Chen, J. Saegusa, and F. T. Liu, "Galectin-3 and the skin," *Journal of Dermatological Science*, vol. 64, no. 2, pp. 85–91, 2011.
- [18] H. Y. Chen, F. T. Liu, and R. Y. Yang, "Roles of galectin-3 in immune responses," *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, vol. 53, no. 6, pp. 497–504, 2005.
- [19] V. Desmedt, S. Desmedt, J. R. Delanghe, R. Speeckaert, and M. M. Speeckaert, "Galectin-3 in renal pathology: more than just an innocent bystander," *American Journal of Nephrology*, vol. 43, no. 5, pp. 305–317, 2016.
- [20] R. Lukic, N. Gajovic, I. Jovanovic et al., "Potential hepatoprotective role of galectin-3 during HCV infection in end-stage renal disease patients," *Disease Markers*, vol. 2017, Article ID 6275987, 8 pages, 2017.
- [21] K. Endo, S. Kohnoe, E. Tsujita et al., "Galectin-3 expression is a potent prognostic marker in colorectal cancer," *Anticancer Research*, vol. 25, no. 4, pp. 3117–3121, 2005.
- [22] K. L. Wu, E. Y. Huang, W. L. Yeh, C. C. Hsiao, and C. M. Kuo, "Synergistic interaction between galectin-3 and carcinoembryonic antigen promotes colorectal cancer metastasis," *Oncotarget*, vol. 8, no. 37, pp. 61935–61943, 2017.
- [23] A. Dignass, R. Eliakim, F. Magro et al., "Second European evidence-based consensus on the diagnosis and management of ulcerative colitis part I: definitions and diagnosis," *Journal of Crohn's and Colitis*, vol. 6, no. 10, pp. 965–990, 2012.
- [24] F. Gomollón, S. García-López, B. Sicilia, J. P. Gisbert, J. Hinojosa, and Grupo Espa^ñol de Trabajo en Enfermedad de Crohn y Colitis Ulcerosa, "Therapeutic guidelines on ulcerative colitis: a GRADE methodology based effort of GETECCU," *Gastroenterología y Hepatología*, vol. 36, no. 2, pp. 104–114, 2013.
- [25] P. Rutgeerts, W. J. Sandborn, B. G. Feagan et al., "Infliximab for induction and maintenance therapy for ulcerative colitis," *The New England Journal of Medicine*, vol. 353, no. 23, pp. 2462–2476, 2005.
- [26] G. D'Haens, W. J. Sandborn, B. G. Feagan et al., "A review of activity indices and efficacy end points for clinical trials of medical therapy in adults with ulcerative colitis," *Gastroenterology*, vol. 132, no. 2, pp. 763–786, 2007.
- [27] K. Geboes, R. Riddell, A. Ost, B. Jensfelt, T. Persson, and R. Löfberg, "A reproducible grading scale for histological assessment of inflammation in ulcerative colitis," *Gut*, vol. 47, no. 3, pp. 404–409, 2000.
- [28] R. M. Heilmann, S. M. Cranford, A. Ambrus et al., "Validation of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the measurement of canine S100A12," *Veterinary Clinical Pathology*, vol. 45, no. 1, pp. 135–147, 2016.
- [29] N. Prakash, P. Stumbles, and C. Mansfield, "Initial validation of cytokine measurement by ELISA in canine feces," *Open Journal of Veterinary Medicine*, vol. 03, no. 6, pp. 282–288, 2013.
- [30] M. Jovanovic, N. Zdravkovic, I. Jovanovic et al., "TGF- β as a marker of ulcerative colitis and disease severity," *Serbian Journal of Experimental and Clinical Research*, 2018.
- [31] American Joint Committee on Cancer, *AJCC Cancer Staging Manual*, Springer, New York, NY, USA, 7th edition, 2010.
- [32] Q. Yang, I. Mori, T. Sakurai et al., "Correlation between nuclear grade and biological prognostic variables in invasive breast cancer," *Breast Cancer*, vol. 8, no. 2, pp. 105–110, 2001.
- [33] S. R. Hamilton and L. A. Aaltonen, "Pathology and genetics: tumours of the digestive system," in *World Health Organization Classification of Tumours*, S. R. Hamilton and L. A. Aaltonen, Eds., pp. 103–143, IARC, Lyon, France, 3rd edition, 2000.
- [34] G. Lanzaa, L. Messerini, R. Gafa, and M. Risio, "Colorectal tumors: the histology report," *Digestive and Liver Disease*, vol. 43, pp. S344–S355, 2011.
- [35] V. Formica, V. Cereda, A. Nardecchia, M. Tesauro, and M. Roselli, "Immune reaction and colorectal cancer: friends or foes?," *World Journal of Gastroenterology*, vol. 20, no. 35, pp. 12407–12419, 2014.
- [36] M. Johansson, D. G. Denardo, and L. M. Coussens, "Polarized immune responses differentially regulate cancer development," *Immunological Reviews*, vol. 222, no. 1, pp. 145–154, 2008.
- [37] L. Klampfer, "Cytokines, inflammation and colon cancer," *Current Cancer Drug Targets*, vol. 11, no. 4, pp. 451–464, 2011.
- [38] S. Pernot, M. Terme, T. Voron et al., "Colorectal cancer and immunity: what we know and perspectives," *World Journal of Gastroenterology*, vol. 20, no. 14, pp. 3738–3750, 2014.
- [39] M. Kitajima, T. Ito, D. J. Tumes et al., "Memory type 2 helper T cells induce long-lasting antitumor immunity by activating natural killer cells," *Cancer Research*, vol. 71, no. 14, pp. 4790–4798, 2011.
- [40] M. Kanazawa, K. Yoshihara, H. Abe et al., "Effects of PSK on T and dendritic cells differentiation in gastric or colorectal cancer patients," *Anticancer Research*, vol. 25, no. 1B, pp. 443–449, 2005.
- [41] A. Agarwal, S. Verma, U. Burra, N. S. Murthy, N. K. Mohanty, and S. Saxena, "Flow cytometric analysis of Th1 and Th2

- cytokines in PBMCs as a parameter of immunological dysfunction in patients of superficial transitional cell carcinoma of bladder," *Cancer Immunology, Immunotherapy*, vol. 55, no. 6, pp. 734–743, 2006.
- [42] S. Abtahi, F. Davani, Z. Mojtahedi, S. V. Hosseini, A. Bananzadeh, and A. Ghaderi, "Dual association of serum interleukin-10 levels with colorectal cancer," *Journal of Cancer Research and Therapeutics*, vol. 13, no. 2, pp. 252–256, 2017.
- [43] K. D. Johnson, O. V. Glinkii, V. V. Mossine et al., "Galectin-3 as a potential therapeutic target in tumors arising from malignant endothelia," *Neoplasia*, vol. 9, no. 8, pp. 662–670, 2007.
- [44] P. Nangia-Makker, V. Balan, and A. Raz, "Regulation of tumor progression by extracellular galectin-3," *Cancer Microenvironment*, vol. 1, no. 1, pp. 43–51, 2008.
- [45] L. Tao, L. Jin, L. Dechun, Y. Hongqiang, K. Changhua, and L. Guijun, "Galectin-3 expression in colorectal Cancer and Its correlation with clinical pathological characteristics and prognosis," *Open Medicine*, vol. 12, pp. 226–230, 2017.
- [46] W. Lu, J. Wang, G. Yang et al., "Posttranscriptional regulation of galectin-3 by miR-128 contributes to colorectal cancer progression," *Oncotarget*, vol. 8, no. 9, pp. 15242–15251, 2017.
- [47] K. Tsuboi, T. Shimura, N. Masuda et al., "Galectin-3 expression in colorectal cancer: relation to invasion and metastasis," *Anticancer Research*, vol. 27, no. 4B, pp. 2289–2296, 2007.
- [48] G. V. Assche, "Fecal biomarkers for the diagnosis and management of inflammatory bowel disease," *Gastroenterology & Hepatology*, vol. 7, no. 6, pp. 396–398, 2011.
- [49] M. Rutka, R. Bor, A. Bálint et al., "Diagnostic accuracy of five different fecal markers for the detection of precancerous and cancerous lesions of the colorectum," *Mediators of Inflammation*, vol. 2016, Article ID 2492081, 6 pages, 2016.
- [50] V. Krane and C. Wanner, "The metabolic burden of diabetes and dyslipidaemia in chronic kidney disease," *Nephrology, Dialysis, Transplantation*, vol. 17, Supplement 11, pp. 23–27, 2002.
- [51] A. Goldin, J. A. Beckman, A. M. Schmidt, and M. A. Creager, "Advanced glycation end products: sparking the development of diabetic vascular injury," *Circulation*, vol. 114, no. 6, pp. 597–605, 2006.
- [52] K. Nomoto, K. Tsuneyama, H. O. Abdel Aziz et al., "Disrupted galectin-3 causes non-alcoholic fatty liver disease in male mice," *The Journal of Pathology*, vol. 210, no. 4, pp. 469–477, 2006.
- [53] H. Y. Chen, A. Fermin, S. Vardhana et al., "Galectin-3 negatively regulates TCR-mediated CD4⁺ T-cell activation at the immunological synapse," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 106, no. 34, pp. 14496–14501, 2009.
- [54] W. Peng, H. Y. Wang, Y. Miyahara, G. Peng, and R. F. Wang, "Tumor-associated galectin-3 modulates the function of tumor-reactive T cells," *Cancer Research*, vol. 68, no. 17, pp. 7228–7236, 2008.
- [55] K. L. Wu, E. Y. Huang, E. W. Jhu et al., "Overexpression of galectin-3 enhances migration of colon cancer cells related to activation of the K-Ras-Raf-Erk1/2 pathway," *Journal of Gastroenterology*, vol. 48, no. 3, pp. 350–359, 2013.
- [56] A. Fortuna-Costa, A. M. Gomes, E. O. Kozłowski, M. P. Stelling, and M. S. G. Pavão, "Extracellular galectin-3 in tumor progression and metastasis," *Frontiers in Oncology*, vol. 4, p. 138, 2014.
- [57] D. Cvejic, S. Savin, S. Golubovic, I. Paunovic, S. Tatic, and M. Havelka, "Galectin-3 and carcinoembryonic antigen expression in medullary thyroid carcinoma: possible relation to tumour progression," *Histopathology*, vol. 37, no. 6, pp. 530–535, 2000.