

UNIVERZITET U BEOGRADU

MEDICINSKI FAKULTET

Jovan T. Juloski

**BIOHEMIJSKA KARAKTERIZACIJA
TUMORSKOG TKIVA
KOLOREKTALNOG KARCINOMA**

doktorska disertacija

Beograd, 2022

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF MEDICINE

Jovan T. Juloski

**BIOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF
COLORECTAL CARCINOMA TISSUE**

doctoral disertation

Belgrade, 2022

Mentor:
Prof. dr Silvio de Luka
Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu

Članovi komisije:
Prof. dr Aleksandar Karamarković
Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu
Predsednik Komisije

Prof. dr Branka Popović
Stomatološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

Dr. sci. Tamara Popović
Viši naučni saradnik, Institut za medicinska istraživanja, Univerzitet u Beogradu

Dr. sci. Saša Janković
Viši naučni saradnik, Institut za higijenu i tehnologiju mesa

Prof. dr Miroslav Stojanović
Medicinski fakultet, Univerzitet u Nišu

Datum odbrane:

IZJAVE ZAHVALNOSTI

Posebnu zahvalnost dugujem **Andeliji Ilić**, višem naučnom saradniku Instituta za fiziku u Beogradu, pre svega na velikom doprinosu i izuzetnom zalaganju u izradi ove disertacije. Svojim radom je uzdigla naučni kvalitet mog istraživanja na viši nivo, i koja nije zauzela svoje zasluženno mesto komentora isključivo iz proceduralnih razloga.

Svom mentoru **prof. Silviu de Luki** biću večno zahvalan na ukazanom poverenju, strpljenju i trudu, i koji nikad nije posustajao tokom svih ovih godina rada sa mnom. Smatram ga jednim od svojih najznačajnijih učitelja.

Zahvaljujem se članovima Komisije: **prof. Aleksandru Karamarkoviću, prof. Branki Popović, prof. Miroslavu Stojanoviću, višem naučnom saradniku Saši Jankoviću i višoj naučnoj saradnici Tamari Popović** na vremenu i pažnji posvećenju čitanju i korigovanju ove disertacije, kao i na izuzetnoj saradnji i pomoći u istraživačkom radu od samog početka mojih doktorskih studija.

Svesrdna podrška **prof. Vladimira Ćuka**, uz kog sam pravio svoje prve korake u hirurgiji, mi je omogućila pristup velikom broju pacijenata, čime je moje istraživanje dobilo potreban značaj. Hvala Vam na očinskoj brizi i savetima!

Na podršci, poverenju i motivisanju od prvog dana moje stručne i akademske karijere najiskrenije se zahvaljujem **prim. dr Marjanu Iliću**.

Moj kum, **dr Vladica Ćuk** zaslužuje posebno mesto u ovoj zahvalnici. Bez njegove podrške, zalaganja i rada sa mnom, ova disertacija ne bi ugledala svetlost dana.

Dr Mariji Milić Perović se zahvaljujem na veoma detaljnim patohistološkim analizama, njen neumorni rad na svim preparatima predstavlja temelj svih drugih analiza ove disertacije.

Kolektivu Službe za laboratorijsku dijagnostiku Kliničko-bolničkog centra Zvezdara hvala na divnoj saradnji.

Takođe se zahvaljujem **kolektivu Klinike za hirurgiju „Nikola Spasić“ Kliničko-bolničkog centra Zvezdara**, a naročito **medicinskim sestrama, tehničarima i instrumentarkama** na pomoći i razumevanju. Bez vaše podrške celokupan rad bi bio značajno teži.

U nabavci ključne opreme ovog istraživanja **Mitre Kutanoski** je imao neizmeran doprinos i na tome mu zahvaljujem.

Svojim dragim prijateljima hvala što su uvek verovali u mene i to mi jasno stavljali do znanja.

Kolegama sa doktorskih studija hvala na razmeni iskustava stečenih tokom ovog programa.

Mojoj porodici ogromno hvala na pruženoj podršci i безусловnoj ljubavi. Tokom uzbudljivog perioda ovih studija imali su uloge kurira, lektora, statističara, psihologa, vaspitača, arhivatora, sekretarica, ali su pre svega bili čvrsto tlo pod mojim nogama, zahvaljujući kom nikad nisam posustao u svojim namerama. Bez njih ne bih bio tu gde sam sad.

Disertaciju posvećujem svojoj supruzi, tati, mami, sestrama, bratu i svojim učiteljima hirurgije.

Biohemijska karakterizacija tumorskog tkiva kolorektalnog karcinoma

Sažetak

Kolorektalni karcinom je najčešći malignitet gastrointestinalnog trakta.

Ciljevi ovog istraživanja bili su da se u KRK i zdravoj mukozi odrede: morfometrijska, teksturna i fraktalna analiza digitalizovanih mikrografa, koncentracija elemenata, parametri oksidativnog stresa, koncentracija masnih kiselina i biohemijski sastav uz pomoć infracrvene spektroskopije.

U studiji preseka učestvovalo je 111 pacijenata starijih od 18 godina, operisanih zbog KRK, i podjeljeni su u četiri grupe: sredovečni/stariji, muškarci/žene.

U tumoru su značajno veće koncentracije K, Mg, Cu, Se, Ca, dok su Na, Zn, Cd, Hg i Cr u značajno manjoj koncetraciji. Odnos Cu/Zn značajno je veći u tumoru, pacijenti u više uznapredovalim stadijumima imaju veći odnos Cu/Zn. Pokazali smo značajno veće koncentracije MDA u tumorskom tkivu, kao i značajne razlike u sastavu masnih kiselina između tumorskog tkiva i zdrave mukoze. Najduže telomere su u tumorskom tkivu, a najkraće u zdravoj mukozi. Uočene su značajne razlike u vrednostima pojedinih patohistoloških mikrografa između stadijuma I. i II. sa jedne strane, i III. i posebno IV. sa druge. Prikazane su različite spektralne karakteristike zdravog i tumorskog tkiva.

Rezultati ove studije pokazuju da je odnos bakar/cink značajan prognostički faktor za invazivnost i progresiju KRK; da je odnos AA/EPA pouzdan pokazatelj inflamatornog statusa tumora i progresije; veće vrednosti SI govore u prilog biološki manje agresivnog tumora i jačeg imunskog odgovora; u tumoru postoji povećana lipidna peroksidacija i oksidativni stres se dešava na nivou reaktivnih kiseoničnih, ali ne i azotnih vrsta. Najduže telomere su u tumorskom tkivu, potom u leukocitima periferne krvi, a najkraće u zdravoj mukozi. Na osnovu digitalnih mikrografa može se lako izdvojiti tumorsko tkivo od zdrave mukoze u stadijumu I i II, dok se u stadijumu IV dobijaju slični rezultati za tumorsko i zdravo tkivo. Na osnovu IR spektralnih karakteristika, u malignom tkivu prisutna je manja količina lipida i nukleinskih kiselina, dok se količina proteina uvećava.

Ključne reči: kolorektalni karcinom, mikroelementi, markoelementi, telomere, masne kiseline oksidativni stres, infracrvena spektroskopija.

Naučna oblast: Medicina

Uža naučna oblast: Fiziološke nauke

UDK br.:

Biochemical characterization of colorectal carcinoma tissue

Abstract

Colorectal cancer is the most common malignancy of the gastrointestinal tract.

The objectives of this study were to determine in CRC and healthy mucosa: morphometric, textural and fractal analysis of digitized micrographs, elemental concentration, oxidative stress parameters, fatty acid concentration and biochemical composition using infrared spectroscopy.

The cross-sectional study involved 111 patients over the age of 18 who underwent surgery due to CRC and were divided into four groups: middle-aged / elderly, men / women.

The concentrations of K, Mg, Cu, Se, Ca are significantly higher in the tumor, while Na, Zn, Cd, Hg and Cr are in significantly lower concentrations. The Cu/Zn ratio is significantly higher in tumor, patients in more advanced stages have a higher Cu/Zn ratio. We showed significantly higher concentrations of MDA in tumor tissue, as well as significant differences in fatty acid composition between tumor tissue and healthy mucosa. The longest telomeres are in tumor tissue, and the shortest in healthy mucosa. Significant differences in the values of individual pathohistological micrographs between stages I and II were observed on one side, and III. and especially IV. on the other. Different spectral characteristics of healthy and tumor tissue were presented.

Results of this study show that the Cu/Zn ratio is a significant prognostic factor for CRC invasiveness and progression; the AA/EPA ratio is a reliable indicator of tumor inflammatory status and progression; higher SI values support a biologically less aggressive tumor and a stronger immune response; there is increased lipid peroxidation in the tumor and oxidative stress occurs at the level of reactive oxygen species, but not nitrogen species. The longest telomeres are in tumor tissue, then in peripheral blood leukocytes, and the shortest in healthy mucosa. On the basis of digital micrographs, tumor tissue can be easily isolated from healthy mucosa in stages I and II, while in stage IV similar results are obtained. Based on the IR spectral characteristics, a smaller amount of lipids and nucleic acids is present in the malignant tissue, while the amount of protein increases.

Key words: colorectal cancer, microelements, macroelements, telomeres, fatty acids, oxidative stress, infrared spectroscopy.

Scientific area: Medicine

Narrow scientific field: Physiological sciences

UDK No.:

Sadržaj

1. UVOD	1
1.1. Epidemiološke karakteristike kolorektalnog karcinoma u svetu	1
1.2. Epidemiološke karakteristike kolorektalnog karcinoma u Srbiji	2
1.3. Faktori rizika za nastanak kolorektalnog karcinoma	2
1.3.1. Genetski faktori rizika	2
1.3.1.1 Geni i nasledne mutacije	3
1.3.1.2. Telomere	4
1.3.2. Faktori rizika načina života i ishrane	4
1.3.2.1. Gojaznost	5
1.3.2.2. Fizička aktivnost i sedentaran način života	5
1.3.2.3. Način ishrane kao faktor rizika	6
1.3.2.3.1. Vlakna i cela zrna	7
1.3.2.3.2. Alkohol	7
1.3.2.3.3. Pušenje	8
1.3.3. Stres kao faktor rizika za nastanak kolorektalnog karcinoma	8
1.4. Patogeneza kolorektalnog karcinoma, putevi širenja i prirodni tok bolesti	9
1.5. Skrining i rano otkrivanje kolorektalnog karcinoma	11
1.6. Klinička prezentacija, preoperativna evaluacija bolesti i određivanje stadijuma	12
1.6.1. Klinička prezentacija	12
1.6.2. Preoperativna evaluacija	12
1.6.3. Određivanje stadijuma	12
1.6.4. Kvantitativna analiza parametara digitalizovanih mikrografa	15
1.6.5. Infracrvena spektroskopija kao moguće dijagnostičko sredstvo	15
1.6.5.1. Prednosti FTIR spektroskopije	16
1.6.5.2. Budućnost infracrvene spektroskopije u dijagnostici kolorektalnog karcinoma	17
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	18
3. MATERIJAL I METODE	19
3.1. Studijski pacijenti	19
3.2. Protokol istraživanja	19
3.3. Određivanje hematoloških i biohemijskih parametara	20
3.4. Patohistološka analiza	21
3.5. Morfometrijska, teksturna i fraktalna analiza digitalizovanih mikrografa	21
3.5.1. Morfometrijska analiza	21
3.5.2. Analiza karakteristika teksture	21
3.5.3. Fraktalna analiza	22
3.6. Koncentracija mikro- i makroelemenata	23
3.7. Određivanje parametara oksidativnog stresa	25
3.7.1. Određivanje sadržaja lipidnih peroksida - MDA	25
3.7.2. Određivanje aktivnosti katalaze	26
3.7.3. Određivanje koncentracije nitrita Gris-ovom reakcijom	27
3.7.4. Određivanje koncentracije proteina po Lowry-ju	27
3.8. Određivanje koncentracije masnih kiselina	27
3.9. Određivanje dužine telomera u tkivnim uzorcima	28
3.10. Određivanje dužine telomera u uzorcima krvi	28
3.11. Infracrvena spektroskopija	29
3.12. Statistička analiza podataka	29

4. REZULTATI	30
4.1. Koncentracija mikro- i makroelemenata u tumorskom tkivu kolona/rektuma i zdravoj mukozi	30
4.2. Parametri oksidativnog stresa u krvi, tumorskom tkivu kolona/rektuma i zdravoj mukozi	40
4.3. Koncentracija masnih kiselina u tumorskom tkivu kolona/rektuma i zdravoj mukozi	49
4.4. Dužina telomera u tumorskom tkivu kolona/rektuma, zdravoj mukozi i perifernim leukocitima	55
4.5. Morfometrijski, teksturni i fraktalni parametri	59
4.6. Infracrvenom spektroskopijom izmereni spektri apsorbiranih talasnih dužina	66
5. DISKUSIJA	72
6. ZAKLJUČCI	91
7. REFERENCE	93

1. UVOD

Nezarazne bolesti su odgovorne za većinu smrtnih slučajeva širom sveta i očekuje se da karcinomi budu vodeći uzrok umiranja i ubedljivo najvažnija prepreka u produžavanju prosečnog životnog veka u svakoj zemlji sveta u XXI veku (1, 2). Prema proceni Svetske zdravstvene organizacije (SZO) za 2015. godinu, karcinom je prvi ili drugi uzrok umiranja pre 70. godine života u 91 od 172 zemlje sveta, a zauzima treće ili četvrto mesto u dodatne 22 zemlje (2). Incidenca i smrtnost od karcinoma ubrzano rastu širom sveta. Uzrok tome nije jedinstven, i takav trend je verovatno rezultat kako starenja populacije i njenog rasta, tako i prevalence i distribucije glavnih faktora rizika, pre svega onih povezanih sa socio-ekonomskim razvojem (3, 4). Sa ubrzanim rastom broja stanovnika i starenja populacije, porast broja umrlih od karcinoma donekle je praćen relativnim smanjenjem stope smrtnosti od cerebralnih insulta i bolesti srca u odnosu na maligne bolesti u velikom broju zemalja (1). Promena tipa karcinoma najviše je uočljiva u zemljama u razvoju, gde se beleži pomak od karcinoma povezanih sa infekcijama i siromaštvom ka onim tipovima karcinoma koji su već zastupljeni u velikom procentu u najrazvijenijim zemljama sveta. Ovi tipovi karcinoma se često pripisuju tzv. zapadnjačkom načinu života (4-6). Ipak, različiti profili karcinoma u pojedinim zemljama i između regiona označavaju da još uvek postoji izražena geografska raznolikost, uz prisutnost lokalnih faktora rizika u populacijama u sasvim različitim fazama socijalnog i ekonomskog razvoja (2). Ova činjenica se naročito primećuje u različitim stopama karcinoma koji su povezani sa infekcijama, uključujući i karcinom grlića materice, želuca i jetre, između zemalja na suprotnim krajevima socio-ekonomskog razvoja (5).

1.1. Epidemiološke karakteristike kolorektalnog karcinoma u svetu

Kolorektalni karcinom (KRK) je najčešći malignitet gastrointestinalnog trakta. U Sjedinjenim Američkim Državama (SAD) se svake godine postavi preko 140.000 novih dijagnoza karcinoma kolona ili rektuma, dok preko 50.000 pacijenata umre, čime KRK postaje treći po smrtnosti karcinom u SAD (7). Globalni podaci pokazuju da je 2018. godine bilo registrovano preko 1.8 miliona (10%) novih slučajeva kolorektalnog karcinoma, kao i preko 881.000 (9%) smrtnih slučajeva (1). KRK je treći po učestalosti, posle karcinoma pluća i dojke, ali i drugi po smrtnosti u svetu, posle karcinoma pluća. To znači da je, na globalnom nivou, otprilike svaka deseta novoobolela i svaka deveta umrla osoba od nekog malignog tumora imala kolorektalni karcinom (1). Incidenca kolorektalnog karcinoma trostruko je veća u razvijenim zemljama u odnosu na zemlje u razvoju; međutim, iako je smrtnost veća u manje razvijenim zemljama, razlike u stopama mortaliteta između razvijenih zemalja i zemalja u razvoju, nisu toliko izražene (1). Najviše stope incidence karcinoma kolona su u delovima Evrope (Mađarska, Slovenija, Slovačka, Holandija i Norveška), Australiji i Novom Zelandu, severnoj Americi i istočnoj Aziji (Japan, Južna Koreja i Singapur); među kojima Mađarska zauzima prvo mesto kada je u pitanju oboljevanje muškaraca, i Norveška kada su u pitanju žene (1). Incidence kolorektalnog karcinoma veoma variraju u različitim regionima sveta, sa šestostrukim i osmostrukim razlikama za karcinom kolona i karcinom rektuma. Uprkos ovim razlikama, uočava se trend kojim se kolorektalni karcinom može smatrati znakom socioekonomskog razvoja, jer incidenca kolorektalnog karcinoma paralelno raste sa porastom Indeksa Humanog Razvoja (IHR) (5, 8). Kada se uzmu u obzir broj novoobolelih i umrlih od karcinoma kolona ili rektuma, mogu se razlikovati tri globalna obrasca povezana za stepenom razvoja zemalja: povećanje i broja novoobolelih i broja umrlih (Brazil, Kina, Ruska Federacija i Baltički region); povećanje broja novoobolelih, ali smanjenje broja umrlih (Kanada, Velika Britanija, Singapur i Danska); smanjenje i broja novoobolelih i broja umrlih (SAD, Japan, Francuska) (9). Skokovi incidence, posebno promene između različitih starosnih grupa, koji su primećeni u kohortnim studijama, ističu uticaj načina ishrane, gojaznosti i načina života, dok pad mortaliteta viđen u više razvijenih zemalja odslikava bolje preživljavanje kroz primenu savremenih metoda lečenja karcinoma (9). Programi za dugotrajni skrining i ranu detekciju, koji si prvobitno

implementirani u SAD i Japanu krajem XX veka su svakako jedan od važnih faktora, ako ne i najvažniji, koji su doveli do pada broja i novoobolelih i pada broja umrlih (10). Kada se govori o stilu života i načinu ishrane, pogotovo kada se priča o pojedinačnim nutrientima, rezultati objavljenih istraživanja su dosta različiti (11). Podaci se uglavnom slažu oko toga da su obrađeno meso, alkoholna pića i gojaznost povezani za povećanim rizikom za nastanak KRK (11). Pojedine studije ovakvu ishranu dovode u vezu samo sa karcinomom kolona, ali ne i rektuma (12). Fizička aktivnost se dovodi u vezu sa manjim rizikom oboljevanja od karcinoma kolona, dok na oboljevanje od karcinoma rektuma verovatno nema uticaj (11).

1.2. Epidemiološke karakteristike kolorektalnog karcinoma u Srbiji

U republici Srbiji, kolorektalni karcinom je drugi najčešći malignitet kod oba pola, sa oko 3800 novih slučajeva i 2300 smrtnih ishoda godišnje (13). Prema podacima Instituta za javno zdravlje „Dr. Milan Jovanović Batut“ tokom desetogodišnjeg perioda između 1999. godine i 2009. godine incidenca se skoro utrostručila kod muškaraca, i udvostručila kod žena (13). Tačan uzrok ovog povećanja nije poznat, ali se može eventualno objasniti većom izloženošću faktorima rizika, kao i napretkom u registrowanju obolelih od kolorektalnog karcinoma. Prema jednoj studiji koja je uzela u obzir 40 evropskih zemalja, Srbija zauzima trinaesto mesto po incidenci i mortalitetu kada su u pitanju muškarci i dvadesetčetvrto i dvanaesto mesto kada su u pitanju žene (14).

U Srbiji kolorektalni karcinom je drugi vodeći uzrok oboljevanja od maligniteta, iza raka pluća kod muškaraca, i iza raka dojke kod žena (14). Kada se govori o broju umrlih od malignih tumora, kolorektalni karcinom zauzima drugo mesto kod muškaraca (iza raka pluća), i treće mesto kod žena (iza raka pluća i dojke) (13, 14).

S obzirom na činjenicu da se Srbija ubraja u zemlje sa visokom stopom mortaliteta i sa srednje visokom stopom incidence, dolazi se do zaključka da kolorektalni karcinom predstavlja veliki zdravstveni problem naše zemlje (15). Kako bi se ovaj problem rešio, ili barem umanjio, potrebno je sprovesti mere primarne i sekundarne prevencije. Pod primarnom prevencijom se podrazumeva eliminisanje ili barem smanjivanje stepena izloženosti faktorima rizika. Otkrivanjem bolesti u ranom stadijumu (sekundarna prevencija) pre svega skriningom (digito-rektalni pregled, testovi za okultno krvarenje, kolonoskopija, irigografija...) bi trebalo da dovedu do otkrivanja bolesti u ranom stadijumu, što značajno utiče na uspešnost lečenja i poboljšava prognozu bolesti.

1.3. Faktori rizika za nastanak kolorektalnog karcinoma

Faktori rizika za nastanak kolorektalnog karcinoma su brojni, i u njih se ubrajaju, između ostalih, i: genetski faktori rizika, način života i ishrane, gojaznost, fizička aktivnost, stres.

1.3.1. Genetski faktori rizika

Kolorektalni karcinom se deli, u odnosu na genetske faktore, na: sporadičnu, familijarnu i hereditarnu (naslednu) formu (7). Sporadični karcinomi su najčešći, predstavljaju oko 70% svih KRK i javljaju se kod osoba koje nemaju pozitivnu porodičnu anamnezu (7). Familijarna forma je druga po učestalosti, javlja se kod osoba koje imaju srodnike sa ovim tumorom, ali se ne može obeležiti kao hereditarna, jer nema jasno identifikovanog genetskog uzročnika (7). Opšta populacija, u zemljama visokog rizika, ima kumulativni rizik od 5% za razvoj kolorektalnog karcinoma do 75. godine života (16). Ovaj rizik se znatno uvećava ukoliko osoba ima pozitivnu porodičnu anamnezu ili nasledne sindrome (17). Kod osoba sa pozitivnom porodičnom anamnezom, utvrđeno je povećanje rizika za 2,24 puta (95% interval poverenja 2,06-2,43) kod onih sa barem jednim obolelim srodnikom prvog stepena (roditelj, brat/sestra, dete), dok je kod onih sa barem dva obolela srodnika prvog stepena rizik uvećan skoro četiri puta (95% interval poverenja 2.60-6.06) (18). Ova uzročno/posledična veza

postaje jača ukoliko je dijagnoza kod srodnika postavljena pre 50. godine života (18). Izuzev retkih naslednih karcinomskih sindroma, većina poznatih naslednih mutacija su slabo penetrirajuće; stoga značajan deo slučajeva kolorektalnog karcinoma, koji su porodično grupisani, nije nasledan, već se dešava kroz stečene genomske aberacije, koje ističu značaj faktora sredine u podešavanju rizika za razvoj kolorektalnog karcinoma (17).

Osobe pogođene naslednim karcinomskim sindromima imaju povišen rizik od oboljevanja u bilo kojem životnom dobu u odnosu na opštu populaciju, zato što imaju (germinativne) mutacije polnih ćelija u visoko-penetrirajućim genima, koji se uglavnom ponašaju autozomno dominantno (19). Bitno je naglasiti da osoba može razviti nasledni sindrom iako je porodična anamneza negativna, jer roditelji mogu imati mutacije samo u polnim ćelijama, a ne i u somatskim ćelijama, ili se te mutacije razvijaju ubrzo nakon oplodnje (20). U naslednom nepolipoznom karcinomu kolona (NNPKK), PMS2 mutacije imaju smanjenu penetraciju u poređenju sa mutacijama ostalih uzročnih gena (21). Stoga, iako je osoba nasledila PMS2 mutaciju i razvila KRK, porodična anamneza može da bude negativna ukoliko jedan ili oba roditelja, koji su nosioci PMS2 mutacije, nisu razvili KRK (16). Nasledni nepolipozni karcinom kolona je najčešći nasledni KRK sindrom, sa procenjenom prevalencom od 0,33% u zapadnim zemljama (22). Glavno obeležje NNPKK je razvoj kolorektalnog karcinoma sa izraženom mikrosatelitnom nestabilnošću (MSI-high) pretežno u proksimalnom kolonu (23). Kolorektalni karcinom povezan sa NNPKK je često slabo diferentovan, sa izraženom mucinoznom komponentom i intratumorskim limfocitnim odgovorom (24). Nasledni nepolipozni karcinom kolona uvećava životni rizik od nastanka KRK do 60%, ali predstavlja svega 2-4% svih slučajeva KRK (17).

Familijarna adenomatozna polipoza (FAP) je druga najčešća forma naslednog KRK sindroma, i javlja se kod 1 osobe na oko 30.000 (25), a izazvana je naslednim mutacijama APC (Adenomatous polyposis coli) gena unutar polnih ćelija (nasuprot mutacijama APC gena kod somatskih ćelija). Stotine adenoma, uglavnom u distalnom kolonu, koje se javljaju, počevši od adolescencije, karakterišu ovaj sindrom, koji objašnjava manje od 1% svih slučajeva kolorektalnog karcinoma (26). Do 40.-50. godine života, prisustvo velikog broja adenoma u FAP-u dovodi do razvoja karcinoma kod apsolutno svih obolelih ukoliko se ne izvrši profilaktička proktokolektomija (7).

1.3.1.1 Geni i nasledne mutacije

Mutacije gena na dva načina mogu dovesti do nastanka KRK: aktivacijom protoonkogena (npr. K-ras), i/ili inaktivacijom tumor supresorskih gena (npr. APC, p53). Smatra se da KRK nastaje akumulacijom mutacija u adenomatoznim polipima, što je u literaturi poznato kao adenom-karcinom sekvenca (7). Sama aktivacija ili inaktivacija nekog od ovih gena neće direktno rezultovati nastankom karcinoma. Mutacije zapravo stvaraju pogodne uslove za dalju akumulaciju genskih oštećenja koji će na kraju dovesti do razvoja karcinoma (7).

APC (adenomatous polyposis coli) gen je recesivan, tumor supresorski gen, stoga su potrebne mutacije u oba alela kako bi se započelo stvaranje polipa. Većina ovih mutacija predstavljaju rane stop kodone, te se stvaraju skraćeni APC proteini. Defekti u APC genu su prvi put opisani kod pacijenata sa FAP-om, ali su takođe prisutni i u 80% sporadičnih slučajeva karcinoma (27). Osim prisustva same mutacije APC gena, veoma je bitno i mesto unutar DNK gde mutacija nastane. Ukoliko se nalazi na krajevima gena, bilo na 5', bilo na 3' kraju, nastaje oslabljena forma FAP-a, ali ukoliko mutacija nastane na sredini gena, tok bolesti će biti daleko teži (7). Zato je poznavanje vrste mutacije bitno i u kliničkom rešavanju bolesti, a ne samo iz akademskih razloga (7).

Još jedan od gena koji su često izmenjeni u KRK je K-ras (Kirsten rat sarcoma virus) gen, koji je klasifikovan kao protoonkogen, jer je dovoljna mutacija samo jednog alela kako bi se poremetio ćelijski ciklus (28). Proizvod ovog gena je K-ras protein, signalni molekul u intraćelijskom putu prenosa signala preko receptora za epidermalni faktor rasta (EGFR). Aktivirani K-ras protein vezuje guanozin trifosfat (GTP), dok hidroliza GTP u guanozin difosfat (GDP) inaktivira K-ras protein. Kada je K-ras izmenjen mutacijom gena, hidroliza GTP-a se ne odvija, te K-ras protein ostaje trajno aktiviran. Smatra se da trajna aktivacija K-ras proteina dovodi do nekontrolisane deobe ćelija

(28). BRAF je još jedan od signalnih molekula EGFR sistema koji učestvuje u patogenezi kolorektalnog karcinoma (29).

MYH gen je gen koji učestvuje u reparaciji DNK ekscizijom baza, a nasleđuje se autozomno recesivno. Delecija ovog gena na oba alela hromozma 1p dovodi do promena u nizu drugih molekula i povezana je za atenuisanom formom FAP-a (30).

Tumor supresorski gen p53 je dobro poznat u literaturi i dovodi se u vezu sa velikim brojem malignih bolesti. Smatra se da p53 ima ključnu ulogu u započinjanju apoptoze kod ćelija sa nepopravljivim oštećenjima genetskog materijala (31). Mutacije ovog gena su pristune u čak 75% slučajeva kolorektalnih karcinoma (7).

1.3.1.2. Telomere

Telomere su specijalizovani, guaninom bogati heksanukleotidni ponovci, lokalizovani na krajevima hromozoma, koji se progresivno skraćuju sa svakom ćelijskom deobom (32). Skraćenje telomera je uzrokovano nepotpunom replikacijom krajeva DNK lanca (32), i njihovo skraćenje korelira sa starenjem (33). One imaju ključnu ulogu u stabilizaciji hromozoma štiteći ih od fuzije krajeva i degradacije. Dužina telomera je takođe pod uticajem genotoksičnog efekta raznih intracelularnih jedinjenja i jedinjenja iz spoljne sredine, među kojima su i razni lekovi koji se koriste u lečenju karcinoma (34, 35). Kod tumorskih ćelija zbog ubrzane deobe dolazi i do bržeg skraćanja telomera u odnosu na netumorske somatske ćelije. Skraćenje telomera može delovati i kao jak tumor-supresorski mehanizam, jer ograničava nekontrolisan rast ćelija. Problem je taj što većina karcinoma razvije mehanizam produžavanja, tj. podmlađivanja telomera, kako bi se prevazišla ta barijera (32). Podmlađene telomere pre svega stabilizuju najkraće telomere, a te kritično kratke telomere mogu dovesti do formiranja mostova između hromozoma tokom anafaze ćelijske deobe, što doprinosi hromozomskoj nestabilnosti (36). Poremećaj mehanizma reparacije DNK (MMR mismatch repair) koji dovodi do mikrosatelitne nestabilnosti takođe može da utiče i na dužinu telomera (37). Podaci iz literature jasno ističu da KRK nije bolest sa jedinstvenim uzrokom, ili jednim patogenetskim mehanizmom; već da uz hromozomsku nestabilnost, mikrosatelitna nestabilnost i mehanizmi epigenetske alteracije doprinose multifaktorskoj prirodi nastajanja KRK (38, 39).

Telomeraza je reverzna transkriptaza, enzim koji sintetiše specifične sekvence na krajevima telomera, održavajući njihovu dužinu, samim tim i stabilnost. Dužina telomera i aktivnost telomeraze je važan mehanizam u genomskoj stabilnosti i replikativnom potencijalu ćelije; i njihova disfunkcija ima jednu od ključnih uloga u onkogenetičkom procesu (40).

Postoje podaci koji dovode u vezu dužinu telomera u perifernim leukocitima sa leukocitnom infiltracijom u tumoru i prognozom preživljavanja (41). Pretpostavlja se da kraće telomere u perifernim leukocitima znače bolji imunski odgovor i izraženiju infiltraciju tumora, što sve daje bolju prognozu i duže preživljavanje (41). Neki podaci ističu da skraćenje telomera ima značaj u početnim stadijumima karcinoma, dok u odmakloj fazi razlika u dužini telomera u odnosu na zdravu mukožu istih pacijenata nije toliko velika (42). Isti autori dovode u vezu i promenu dužine telomera sa lokalizacijom kolorektalnog karcinoma (42).

Dosadašnja istraživanja su uglavnom pokazala da skraćenje telomera ima ulogu u nastanku tumora, dok njihovo produženje ima ulogu u progresiji tumora i njegovom rastu (42). Veliki značaj dužine telomera u inicijaciji, progresiji karcinoma i u prognozi bolesti se ne dovodi u pitanje, ali i dalje postoje razlike u rezultatima savremenih istraživanja (43, 44). Zato je veoma važno razumeti biologiju telomera u celosti, kako bi se u budućnosti što bolje iskoristio koncept lečenja KRK baziran na stabilizaciji telomera ili inhibiciji telomeraza (32).

1.3.2. Faktori rizika načina života i ishrane

Genetski faktori svakako doprinose povećanju rizika za svakog pojedinca, ali incidenca kolorektalnog karcinoma u populaciji je velikim delom izazvana stilom života i načinom ishrane, faktorima koji su promenljivi, i čijom se promenom u relativno kratkom vremenskom roku, mogu

drastično promeniti stope oboljevanja od KRK. Dokaz ovoj tvrdnji su i podaci koji pokazuju da osobe koje su došle iz zemalja sa niskim stopama, u zemlje sa visokim stopama oboljevanja od KRK, ubrzo dostižu visoke stope oboljevanja svoje nove domovine, sa prihvatanjem novog stila života (45, 46). Dosadašnja istraživanja su zaključila da gojaznost, smanjena fizička aktivnost, loša ishrana (crveno meso, obrađeno meso, manjak vlakana, celog zrna i kalcijuma), alkohol i duvan povećavaju rizik od nastanka KRK (47, 48). Prema procenama iz prethodnih studija čak 47% KRK u SAD i 45% slučajeva KRK u Engleskoj se može pripisati izloženošću spomenutim faktorima rizika koji se mogu izbeći (48, 49). Kada udruženo deluju, svi ovi faktori vrlo verovatno dovode do povećanja incidence KRK u zemljama u razvoju (16).

1.3.2.1. Gojaznost

Brojne studije do sada su pokazale, a nove samo potvrđuju, koristeći razna antropometrijska merenja, da je preterana gojaznost jasno dokazan faktor rizika za nastanak KRK (uzročno posledična veza je jača za karcinom kolona, u odnosu na rektalni karcinom) (50, 51). Dva najčešće korišćena pokazatelja gojaznosti su indeks telesne mase (BMI-body mass index), koji predstavlja meru sveukupne gojaznosti, i obim struka (WC - waist circumference), koji odslikava abdominalnu gojaznosti. WC se dovodi u snažniju vezu sa nastankom KRK u odnosu na BMI (52). Kada se ova dva parametra uključe u statistički model za izračunavanje rizika od KRK, relativni rizik za BMI se smanjuje, ali ne i za WC, konkretnije, za svako povećanje WC od 10cm, relativni rizik od nastanka KRK se poveća za 4% (53).

Potkožno masno tkivo (SAT) i visceralno masno tkivo (VAT) predstavljaju dve zasebne celine. U poređenju sa potkožnim, visceralno masno tkivo produkuje više proinflamatornih adipokina (npr TNF) i manje adiponektina (54), uz to sadrži i više imunskih ćelija, pre svega makrofaga (55). Ove osobine visceralnog masnog tkiva stvaraju sredinu slabe hronične inflamacije i insulinske rezistencije, koji su povezani sa stimulisanjem tumorskog rasta i tumorskom progresijom (56, 57). Mora se ipak naglasiti, da još uvek nije poznato da li gojaznošću indukovana inflamacija direktno uvećava rizik od nastanka kolorektalnog karcinoma ili posredno putem procesa kao što je insulinska rezistencija. Poznato je da u uslovima hiperinsulinemije (kao posledice insulinske rezistencije) dolazi do povišenog nivoa insulinu sličnog faktora rasta 1 (IGF1), čiji signalni put stimuliše proliferaciju ćelija i inhibiše apoptozu (58).

Prema podacima iz literature, kod bilo koje vrednosti BMI, visceralna gojaznost je više zastupljena kod ljudi azijskog porekla nego kod pripadnika bele rase (59), kao i kod muškaraca nego kod žena (60). Ova različita sklonost ka visceralnoj gojaznosti jasno dovodi do povećanog rizika od KRK kod Azijata, čak i sa normalnim BMI (61), kao i do jače povezanosti porasta BMI i rizika od nastanka KRK kod muškaraca nego kod žena (50).

Slabija povezanost gojaznosti i rizika od nastanka KRK kod žena se, osim manje zastupljenom visceralnom gojaznošću, može objasniti i drugim faktorima. Endogeni estrogene predstavljaju zaštitni faktor kod žena, i adipociti su njihov glavni izvor nakon menopauze (62, 63), stoga se kod postmenopausalnih žena, prokancerski efekat gojaznosti, putem hiperinsulinemije i IGF1, u određenoj meri poništava zaštitnim efektom estrogena (16). Ovome u prilog govore i podaci iz studija koji gojaznost kod devojčica označavaju kao znatno veći faktor rizika za nastanak KRK, nego gojaznost koja nastane tek kasnije u odrasloj dobi (64, 65).

1.3.2.2. Fizička aktivnost i sedentaran način života

Kolorektalni karcinom, pogotovo karcinom kolona je jedan od retkih maligniteta za koji je fizička aktivnost, tj. njeno odsustvo, dokazani faktor rizika (66). Iako ne postoji precizno definisan režim, u smislu trajanja i intenziteta fizičke aktivnosti u cilju prevencije, preporučuje se najmanje 150 minuta umerene fizičke aktivnosti i 75 minuta intenzivne fizičke aktivnosti tokom nedelju dana, ili kombinacija ova dva režima, gde 2 minuta umerene aktivnosti menja 1 minut intenzivne aktivnosti (67). Dosadašnja literatura se slaže u tome da je bitan određen nivo potrošene energije kroz fizičku

aktivnost, a ne neka određena fizička aktivnost (16). Povećanje fizičke aktivnosti od samo 5 metaboličkih ekvivalenata (MET) smanjuje rizik od nastanka karcinoma kolona za oko 8% (48). Metabolički ekvivalent zadatka (MET- Metabolic Equivalent of Task) predstavlja jednostavan i praktičan način za određivanje energetske potrebe određene fizičke aktivnosti. Osim toga, koristi se i kao mera funkcionalnog kapaciteta i aerobne sposobnosti pojedinca. Jedan MET se definiše kao intenzitet metabolizma u mirovanju, odnosno količina kiseonika koju osoba troši dok miruje i iznosi približno 3,5 ml O₂/kg/min (ili 1.2 kcal/min za osobu od 70kg) (68). Dakle, tokom fizičke aktivnosti koja zahteva 3 MET jedinice, potroši se tri puta više energije za isto vreme u odnosu na mirovanje. Dosadašnja istraživanja se ne slažu oko načina na koji fizička aktivnost dovodi do smanjenja rizika. Poznat je njen pogodan uticaj na motilitet digestivnog trakta, imunski sistem, inflamaciju, metaboličke hormone (69), ali postoje neslaganja kako do toga dolazi, da li je to direktan uticaj fizičke aktivnosti ili do ovih efekata dolazi posredno, preko gubitka visceralnog masnog tkiva (70). Odrasle gojazne osobe, putem redovne fizičke aktivnosti, kao što su svakodnevno šetanje ili trčanje, tokom nekoliko meseci, će smanjiti količinu visceralnog masnog tkiva, čak i ako ukupna telesna masa ostane nepromenjena (71, 72), čime se smanjuje rizik od nastanka karcinoma kolona. Iako postoji saglasnost među istraživačima, da je bitnija bilo kakva fizička aktivnost, postoje autori koji su detaljnije ispitali tu temu i navode podatke da se aerobnim vežbanjem znatno više smanjuje rizik od KRK nego vežbama otpora i da je količina od samo 30 MET časova nedeljno, optimalna količina aktivnosti (73), što podrazumeva svakodnevnu šetnju brzinom od oko 5km/h (aktivnost od 3 MET minuta) u trajanju od 90 minuta.

Bez obzira na nivo fizičke aktivnosti, produženo sedenje, u današnje vreme pre svega višesatno gledanje televizije, predstavlja jedan od vodećih faktora rizika (74). Ova štetna navika savremenog čoveka je toliko značajna, da su objavljeni podaci toliko detaljni, da pokazuju čak da produženo vreme gledanja televizije od samo 2 sata dnevno, povećava rizik od nastanka KRK za čak 7% (75). Smanjena aktivnost skeletne muskulature, izazvana produženim sedenjem, olakšava nastanak insulinske rezistencije, koja je takođe povezana sa karcinogenezom (76). Važno je napomenuti i činjenicu da je često ustajanje, bez obzira na ukupno vreme provedeno sedeći, obrnuto povezano sa već pomenutim faktorima rizika (BMI, WC) (77).

1.3.2.3. Način ishrane kao faktor rizika

Kako bi se pronašla ishrana pogodna za prevenciju karcinoma, a ujedno i identifikovali potencijalni štetni i korisni efekti ishrane, istraživanja su promenila svoj fokus sa pojedinačnih nutrijenata na sveukupan obrazac ishrane (78). Kroz svoje aditivne, ili sinergističke efekte pojedinačnih sastojaka, određeni obrasci ishrane mogu povećati ili smanjiti rizik od razvoja KRK (16). Na osnovu dosadašnjih opservacionih istraživanja, mogu se razlikovati dva obrasca ishrane: tzv. „zdravi“ (mediteranski) način ishrane (sa visokim unosom voća, povrća, celog zrna, leguma, orašastih plodova, ribe, morskih plodova, niskomasnog mleka ili mlečnih proizvoda) i „nezdrav“ (zapadni) način ishrane (sa visokim unosom crvenog i obrađenog mesa, zaslađenih napitaka, obrađenog zrna, slatkiša i krompira) (79). Poredeći jedan od dva navedena načina ishrane u meta analizama kohortnih studija, izračunat je relativni rizik za KRK od 1,12 (95% CI 1,01–1,24) kod zapadnog načina ishrane, i 0,89 (95% CI 0,84–0,95) kod mediteranskog načina ishrane, pri čemu je povezanost bila jača za karcinom kolona, nego za karcinom rektuma (80). Štetni, odnosno protektivni efekat, ishrane predstavlja kompleksno međusobno dejstvo svih pojedinačnih nutrijenata. Uticaj crvenog i prerađenog mesa npr. utiče na razvoj KRK putem hema iz gvožđa, spoljnih N-nitrozo jedinjenja, jonizovanih masnih kiselina, sekundarnih žučnih kiselina iz masti, kao i heterocikličnih amina i policikličnih aromatičnih ugljovodonika koji se stvaraju prilikom termičke obrade mesa (81–83). Prema jednoj meta-analizi prospektivnih studija, svako povećanje unosa crvenog/prerađenog mesa za 100g dnevno povezano je sa povećanjem rizika za razvoj KRK za 12% (95% CI 1,04–1,21), ova povezanost jača je za prerađeno meso nego za crveno (84).

Ispitivanje uticaja insulina i biomarkera inflamacije na nastanak kolorektalnog karcinoma predstavlja nov pristup u rasvetljavanju karcinogeneze kolona i rektuma (58). Nivoi C peptida

(markera sekrecije insulina), kao i CRP-a, IL-6 i TNF α (markera inflamacije) odražavaju način ishrane, pun zaslađenih napitaka, crvenog mesa, sa malo namirnica sa celim zrnom (85). Pozitivna povezanost C peptida i parametara inflamacije sa rizikom od nastanka KRK sugeriše da hiperinsulinemija i inflamacija imaju udeo u uticaju celokupne ishrane na nastanak KRK (85, 86).

1.3.2.3.1. Vlakna i cela zrna

Prvi objavljeni podaci o zaštitnoj ulozi vlakana u ishrani, objavljeni još ranih 70-ih godina, zasnovani su na činjenici niske incidence KRK među stanovnicima ruralnih delova Afrike, koje je odlikovala voluminozna stolica i brzo crevno pražnjenje (87). Vlakna u ishrani, naročito nerastvorljiva vlakna, smanjuju izloženost epitela kolona i rektuma karcinogenima time što skraćuju vreme prolaska stolice kroz creva i povećavaju zapreminu stolice (88). Osim na ovaj način, pretpostavlja se da vlakna deluju i posredno preko bakterija u lumenu creva. Rastvorljiva vlakna, koja stižu do kolona nesvarena, odmah se fermentišu od strane anaerobnih bakterija u crevu u masne kiseline kratkog lanca, uglavnom acetatnu, propionsku i buternu kiselinu (89). Buterna kiselina je u *in vitro* studijama pokazala povoljan uticaj na preživljavanje ćelijskih linija zdravih kolonocita, a izaziva apoptozu neoplastičnih kolonocita (90) i inhibiše proinflamatorni odgovor u kolonocitima (91). Još jedan pretpostavljen mehanizam putem kog vlakna deluju protektivno na sluznicu creva je preko bakterije *Fusobacterium nucleatum*, koja se nalazi u većem broju u tumorskom tkivu u odnosu na normalnu mukozu, a za koju se pretpostavlja da stimuliše karcinogenezu u kolonu i rektumu tako što stvara imunosupresivno tumorsko mikrookruženje (92). Pretpostavka je da visok sadržaj vlakana u ishrani menja mikrobiom creva, smanjujući prisustvo *Fusobacterium nucleatum*. Ishrana bogata vlaknima i celim zrnom povezana je sa smanjenim rizikom od nastanka KRK kod kojih se registruje *F. nucleatum* u tkivu, ali ne i sa KRK kod kojeg se ne detektuje *F. nucleatum* (93). Iako su rezultati dosadašnjih istraživanja pokazali veoma jaku mogućnost zaštitnog dejstva vlakana, velike epidemiološke studije iznose različite rezultate kada se radi o namirnicama koje sadrže vlakna (16). Dok su vlakna u žitaricama obrnuto povezana sa rizikom od nastanka KRK, vlakna u voću, povrću i mahunarkama nisu, a isti rezultat se dobija kada se radi o nastanku adenoma (94, 95). Zaštitna uloga vlakana iz žitarica se ogleda i u činjenici da je njihov povećan unos, čak i posle postavljanja dijagnoze KRK (bez metastaza), povezan sa smanjenom smrtnošću ovih pacijenata (96). Interesantno je da su randomizovane studije pokazale da ishrana bogata vlaknima iz pšeničnih mekinja ne doprinosi prevenciji nastanka kolorektalnog adenoma (97). Sa obzirom na nove i ne toliko ubedljive dokaze o ulozi vlakana u zaštiti sluznice kolona i rektuma od nastanka adenoma i karcinoma, njihova zaštitna uloga je od „ubedljive“ označena kao „verovatna“ (16).

1.3.2.3.2. Alkohol

Acetaldehid, kao prvi produkt metabolizma etil alkohola, dokazana je karcinogena supstanca (16). Jedna metaanaliza iz 2018. godine iznosi podatak da čak i veoma umereno konzumiranje alkoholnih pića (uzeta je granica od jednog pića ili manje na dan), dovodi do blagog, ali značajnog uvećanja rizika od razvoja KRK (RR 1.04, 95% CI 1.01–1.06) u odnosu na osobe koji uopšte ne piju ili povremeno popiju alkoholna pića (98). Uglavnom je povezanost alkohola i rizika od KRK veća kod muškaraca nego kod žena, što se objašnjava većom konzumacijom alkohola od strane muškaraca, ali ostavljena je mogućnost uticaja i drugih faktora rizika koji nisu uzimani u obzir (99). Alkohol dospeva do kolonocita putem sistemske cirkulacije i putem difuzije iz lumena creva. Crevna flora preko alkoholne dehidrogenaze pretvara alkohol u acetaldehid, koji se akumulira u crevnom epitelu usled slabe aktivnosti mukozne acetaldehid dehidrogenaze (100) i ima štetan uticaj na mukozu izazivajući posledičnu ćelijsku regenerativnu proliferaciju (100, 101). Kada dospe u ćeliju, acetaldehid oštećuje DNK i uništava intraćelijske folate koji su neophodni za sintezu DNK i njenu metilaciju (101). Važnu ulogu ima i vrsta alkoholne dehidrogenaze u organizmu, jer pojedini autori iznose podatke o povećanom riziku od nastanka KRK zbog konzumiranja alkohola kod Azijske populacije (102) u odnosu na ostatak sveta (99). Kao jedan od razloga navodi se visoka prevalenca

ALDH2*2 varijante enzima alkoholne dehidrogenaze u Aziji (103, 104). Postoje i suprotni podaci koji navode smanjen rizik od nastanka KRK kod nosilaca ovih gena, jer im usporeno metabolisanje etanola izaziva diskomfor zbog kog i ne piju često alkohol (105). Bitno je istaći da studije koje ispituju povezanost alkohola i rizik od kolorektalnog karcinoma imaju brojna ograničenja, pre svega manjak podgrupa, kako među onima koji piju, tako i među onima koji ne piju alkohol, te su potrebne detaljnije analize kako bi se rasvetlila uloga etanola i njegovih metabolita u nastanku KRK (105).

1.3.2.3.3. Pušenje

Dim cigareta u sebi sadrži brojne supstance koje doprinose do kolorektalne mukoze direktno ingestijom ili preko sistemske cirkulacije, izazivajući genetičke i epigenetičke aberacije (106). Meta-analize opservacionih studija su pokazale da se relativni rizik od razvoja kolorektalnog karcinoma povećava sa uvećanjem paklo-godina (pušenje jedne paklice cigareta (20 cigareta) dnevno tokom cele godine), a smanjuje sa što kasnijim početkom pušenja (približno za 4% za svakih 10 godina kasnijeg početka pušenja) (47, 107). Istraživanja čak tvrde da pušenje različito utiče na nastanak KRK u različitim delovima kolona/rektuma (16). Pojedini istraživači navode da aktivni pušači imaju veći rizik od nastanka karcinoma rektuma i proksimalnog dela kolona, ali ne i od karcinoma distalnog kolona (108).

Jedan od mehanizama preko koga pušenje dovodi do nastanka tumora je stvaranje nepovratnih promena u DNK štetnim delovanjem policikličnih aromatičnih ugljovodonika (106). Prema dosadašnjim podacima u literaturi, ovaj mehanizam značajniji je u nastanku tumora rektuma, treba mu više vremena da dovede do nastanka karcinoma i izaziva nepovratne promene u DNK (106). Zato se štetan uticaj pušenja može samo u izvesnoj meri umanjiti prestankom pušenja, ali ne i potpuno ukloniti.

1.3.3. Stres kao faktor rizika za nastanak kolorektalnog karcinoma

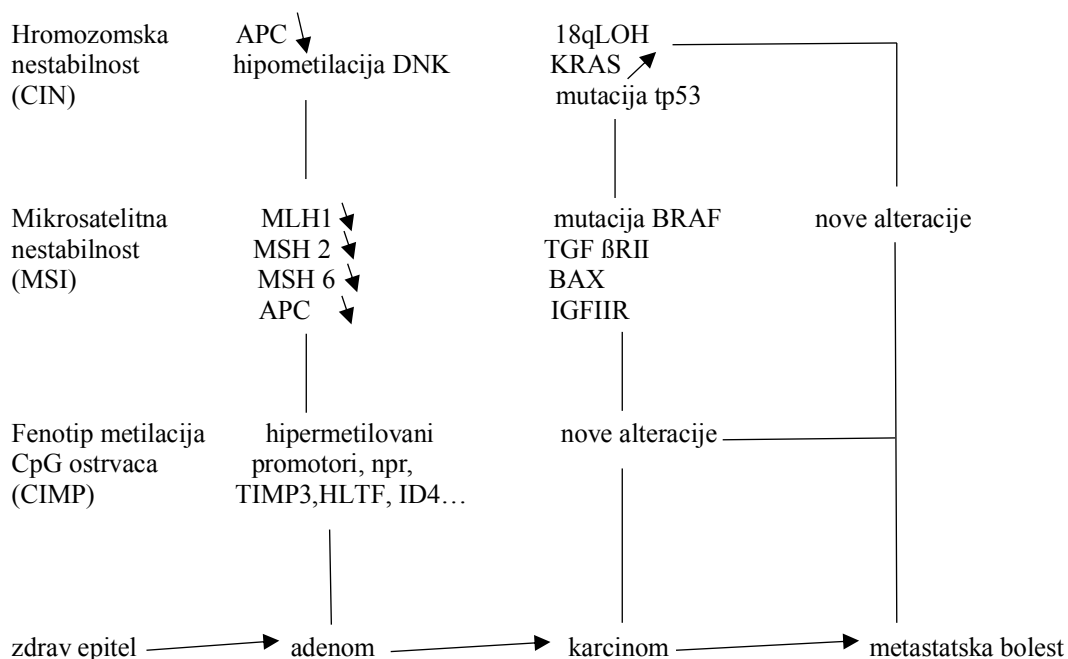
Kada se kaže stres u svakodnevnom govoru, uglavnom se misli na psihosocijalni pritisak kojem je savremeni čovek svakodnevno izložen (109). U tom smislu, stres se definiše kao proces u kojem zahtevi sredine prevazilaze adaptivne kapacitete individue, zbog čega nastaju psihološke i biološke promene koje mogu uvećavati rizik od brojnih oboljenja (110). Zato uvek treba imati na umu da, iako stres za svrhu ima prilagođavanje, on sa sobom nosi rizik i od neuspeha u prilagođavanju raznim faktorima spoljne sredine (109). Prva istraživanja o povezanosti stresa i malignih bolesti su se bazirala na načine suočavanja sa bolešću (111), poredeći ishod bolesti sa jednom od četiri kategorije suočavanja: borbenost, poricanje, stoicizam/fatalizam i pesimizam (112). Rezultati prvih studija su govorili u prilog povoljnijeg ili štetnijeg uticaja pojedinih načina ponašanja na ishod maligne bolesti, ali su početkom milenijuma bolje dizajnirane studije ipak iznele jasan stav da nema statistički značajne razlike u ishodu bolesti između pacijenata sa načinom suočavanja (113). Savremene studije sa početka XXI veka koje su se bavile povezanošću stresa i karcinoma, imale su znatno veće kohorte, sa dugačkim periodom praćenja, a takođe su beležile pojavu bilo koje vrste karcinoma, dakle razvile su se kvalitetne prospektivne studije (109). Pojedinačni rezultati ovih studija, sprovedenih širom sveta su pokazali da u skoro 80% slučajeva nije bilo veze između stresa i nastanka karcinoma, u manje od 20% slučajeva ta veza je bila potvrđena, dok je u nekoliko procenata slučajeva nađeno čak i protektivno dejstvo stresa (109). Engleski autori su u jednoj metaanalizi naveli da je indeks rizika za nastanak karcinoma u prisustvu stresa 1,21, odnosno da je za 21% šansa veća da se pojavi karcinom bilo gde u telu kod osoba izloženih stresu i da je indeks rizika rastao sa dužim trajanjem praćenja, što ih je navelo na zaključak da stres ima spor, ali kumulativan efekat na rizik od nastanka karcinoma (114). Takođe su zaključili da je potreban veći broj ispitanika kako bi se izbegao lažno negativan nalaz, jer je u studijama sa većim brojem ispitanika indeks rizika bio veći (114). Isto tako, Yoichi i saradnici tvrde da su ličnosti sklone stresu, sa nepovoljnim tehnikama prevladavanja, lošijim kvalitetom života granično povezane sa nastankom karcinoma (114). Međutim, možda i najvažniji zaključak ove grupe autora, je povezanost depresivnosti i nastanka karcinoma. Od svih

psihosocijalnih faktora, depresivnost je imala najjaču povezanost sa nastankom karcinoma, sa indeksom rizika 1,29 (95% CI: 1,14-1,46) (114). Ova metaanaliza je, u odnosu na sve do tada publikovano, pokazala stres kao dosta značajniji faktor rizika (109), uz naglašeno ograničenje da se radi o ispitanicima iz razvijenih zemalja, što umanjuje primenu njenih rezultata na ostatak sveta (114). Uprkos toj činjenici, rezultati ove studije trenutno predstavljaju najpribližniji odgovor na pitanje koliko stres utiče na pojavu karcinoma (109). Još jedan od faktora čiji se uticaj na nastanak karcinoma ispitivao kroz različite teorijske modele, je i tip ličnosti (109). Dosadašnja istraživanja, ipak naglašavaju, da tip ličnosti, iako predstavlja važan faktor u reagovanju na stresogene faktore, ima samo granično značajan uticaj na rizik od pojave karcinoma (115).

U velikom broju dosadašnjih istraživanja postoje konzistentni dokazi o uticaju emotivnih poremećaja (pre svega depresije), izazvanih određenim delom i stresom, na nastanak karcinoma (109). Kako je hipotalamo-hipofizno-adrenalna osovina ključni sistem za odgovor na stresogene faktore, za njene poremećaje se pretpostavlja da mogu biti veza između depresivnosti i karcinoma (109). Poremećaj ove osovine je odavno primećen kod pacijenata sa depresijom, koji karakteriše izmenjena koncentracija i dnevni profil lučenja kortizola, a koji svoje efekte ispoljava preko glukokortikoidnog receptora, te se poremećaj ovog signalnog puta smatra jednim od uzroka depresije (116). Podaci iz literature ukazuju na promene u ekspresiji glukokortikoidnog receptora, njegovoj nuklearnoj translokaciji, promene u transkripciji posredovanoj ovim receptorom i u aktivnostima drugih proteina koji menjaju njegovu aktivnost (116, 117).

1.4. Patogeneza kolorektalnog karcinoma, putevi širenja i prirodni tok bolesti

Geneza karcinoma kolona i rektuma je postepen proces tokom kojeg dolazi do patoloških promena mukoze creva i nakupljanja genetskih i epigenetskih promena u ćelijama epitela (118). Smatra se da kolorektalni karcinom nastaje putem tzv. adenom-karcinom sekvence. Iz zdrave mukoze, nakupljanjem mutacija, dolazi do transformacije epitela, najpre u displastični epitel, potom u rani, srednji i „kasni“ adenom i na kraju nastaje invazivni karcinom koji ima potencijal da metastazira (7). KRK može nastati iz jedne ili kombinacije tri različita mehanizma: hromozomske nestabilnosti (CIN), mikrosatelitne nestabilnosti (MSI) i fenotip metilacije CpG ostrvaca (CIMP) (118). Tipična geneza tumora sa hromozomskom nestabilnošću počinje sa mutacijom APC gena, koja je praćena aktivacijom K-ras onkogenom i inaktivacijom p53 tumor supresorskog gena (119). Aneuploidija i gubitak heterozigotnosti (LOH) predstavljaju glavne faktore u CIN tumorima, koji čine najveći deo sporadičnih formi (85%) i učestvuju u slučajevima familijarne adenomatozne polipoze koji su povezani sa „germline“ mutacijama APC gena (120). Metilacija CpG ostrvaca predstavlja epigenetsku alteraciju, pre svega hipermetilacijom raznih tumor supresorskih gena od kojih su najvažniji MGMT i MLH1. Ove hipermetilacije su često udružene sa BRAF mutacijom i mikrosatelitnom nestabilnošću (121). Kod mikrosatelitne nestabilnosti (MSI) postoje genetske promene kratkih segmenata koji se ponavljaju i najčešće se dešavaju u nekom od gena odgovornih za popravku oštećenja DNK (mismatch repair gene - MMR) (122). Ove promene predstavljaju osnovno obeležje Linč sindroma (predispozicija za razvoj KRK, kao i karcinoma drugih lokalizacija). Javljaju se u oko 15% sporadičnih slučajeva KRK. Isto tako i hipermetilacija MMR gena može dovesti do MSI(122). Iz svega napisanog jasno je da se ova tri mehanizma često preklapaju u razvoju KRK (Šema 1.4.1.).



Šema 1.4.1. Genetski i epigenetski mehanizmi nastanka kolorektalnog karcinoma.

Karcinom kolona i rektuma nastaje u mukozi i vremenom infiltriše zid creva, susedna tkiva i organe. Kako tumor raste i postaje voluminozan, može dovesti do opstrukcije u pasaži, a lokalno širenje tumora, kada je rektum u pitanju, može dovesti do opstrukcije i drugih organa, pre svega uretera na nivou karlice (7). Limfogeno širenje predstavlja najčešći put širenja KRK, koje uglavnom prethodi razvoju udaljenih metastaza ili karcinomatozi (7). Verovatnoća za nastanak nodalnih/limfogenih metastaza raste sa rastom tumora, dubinom infiltracije, slabijom histološkom diferencijacijom i limfovaskularnom invazijom. T stadijum (dubina infiltracije) je pojedinačni najznačajniji prediktor limfogenog širenja (7). Karcinom in situ (Tis), koji se prostire samo do muscularis mucosae, se zove još i displazija visokog stepena, kod koje ne bi trebalo da postoji rizik od limfogenog širenja. Male tumorske promene koje su ograničene na zid creva, T1 i T2 tumori, nose rizik od limfogenog širenja 5% do 20%, dok tumori koji infiltrišu sve slojeve zida creva i okolne organe (T3 i T4) u preko 50% slučajeva već imaju metastaze u limfnim čvorovima. Broj limfnih čvorova sa metastazama je u pozitivnoj korelaciji sa udaljenim metastazama, a u negativnoj sa dužinom preživljavanja (7). Kada postoji 4 ili više pozitivnih limfnih čvorova, prognoza je lošija. Limfogeno širenje karcinoma kolona obično ide duž magistralnih venskih sudova obolelog segmenta kolona. Kod karcinoma rektuma limfogeno širenje može ići u dva pravca. U proksimalnim delovima rektuma limfna drenaža se odvija na gore duž gornjih rektalnih sudova do donjih mezenteričnih limfnih čvorova, dok u donjim delovima rektuma limfna drenaža može ići duž srednjih rektalnih sudova. Limfna drenaža duž donjih rektalnih sudova do unutrašnjih ilijačnih čvorova ili čvorova u preponama je retka, osim kada se radi o tumoru analnog kanala ili su proksimalni limfatici blokirani tumorom (7).

Najčešći organ udaljenih metastaza KRK je jetra. Do jetre KRK dolazi hematogenim putem preko portnog venskog sistema. Kao i kada se radi o limfogenom širenju, verovatnoća nastanka jetrenih metastaza raste sa veličinom i gradusom tumora, međutim, i mali tumori mogu dati udaljenje metastaze (7). Drugi najčešći organ hematogenog širenja KRK su pluća, ali veoma retko se dešavaju izolovane plućne metastaze. Karcinomatoza predstavlja difuzno peritonealno širenje tumora i ima veoma lošu prognozu (7).

1.5. Skrining i rano otkrivanje kolorektalnog karcinoma

Skrining može smanjiti incidencu i smrtnost od KRK otkrivajući na vreme prekancerozne promene ili karcinom u ranoj fazi i time omogućavajući pravovremeno lečenje (13). Načini skrininga mogu biti različiti, sa različitim finansijskim i infrastrukturnim zahtevima (16).

Najrasprostranjeniji način skrininga je test na okultno krvarenje (Fecal Occult Blood Test - FOBT), koji detektuje krv u stolici, što može ukazati na prisustvo prekancerskih ili kancerskih lezija kolona/rektuma. Stariji FOBT su bazirani na gvajaku, dok su noviji imunohemijski, poznati i kao fekalni imunohemijski testovi (Fecal Immunochemical Test - FIT) danas poželjniji, jer ne zahtevaju poseban režim ishrane pre testiranja, imaju veću senzitivnost i veću specifičnost u odnosu na klasične FOBT (123).

Relativno nov način skrininga, razvijan od strane američkih autora je višeciljni fekalni DNK test (124). Ovaj test podrazumeva kvantitativni molekularni esej za KRAS mutaciju, aberantne metilacije NDRG4 i BMP3, i β aktin u uzorcima stolice. Kombinujući FIT i detekciju izmenjene DNK u stolici dobijena je veća pojedinačna senzitivnost u odnosu na klasičan, komercijalni FIT, kako za KRK tako i za uznapredovale prekancerozne promene, sa još uvek smanjenom specifičnošću (124). Zbog niže specifičnosti koja dovodi do verovatno većeg broja invazivnih procedura, pre svega kolonoskopija, a samim tim i povećanih troškova, kombinacija FIT/DNK testa još uvek ne predstavlja dobar skrining test (125).

Zlatni standard u dijagnostici, a i skriningu KRK je kolonoskopija, ali je svakako najskuplja i zahteva najobimnije resurse (16). Skrining kolonoskopija smanjuje sveukupni rizik od KRK, kao i mortalitet od KRK, u odnosu na nesprovođenje kolonoskopije (126), uz relativno retke komplikacije u vidu perforacije ili krvarenja (127), dok tzv. prekomerno lečenje (engl. overtreatment) nije toliko često kao kod karcinoma dojke ili prostate (128).

Osim pomenutih FOBT, FIT i kolonoskopije, kao skrining testovi mogući su i fleksibilna sigmoidoskopija, sama ili u kombinaciji sa FOBTom, barijumska klizma i CT kolonografija (tzv. virtuelna kolonoskopija) (7).

Trenutna preporuka Američkog kancerološkog društva je da se sa skriningom počne sa 45. godinom života, kada se radi o populaciji prosečnog rizika, dakle za asimptomatske pacijente, sa negativnom ličnom i porodičnom anamnezom (129), dok se u Finskoj i Novom Zelandu skrining sprovodi od 59. godine, a u Austriji i Japanu od 40. godine (130). Preporučuju se sledeće opcije: godišnje FOBT ili FIT prema uputstvu proizvođača za uzimanje uzoraka, fleksibilna sigmoidoskopija svakih 5 godina, kolonoskopija svakih 10 godina, klizma sa dvojnim kontrastom svakih 5 godina ili CT kolonografija svakih 5 godina (131). Ukoliko postoje neki od faktora rizika ili pozitivna lična, tj. porodična anamneza sa skrining testovima treba početi i ranije (131).

Međutim, preporuke za skrining se razlikuju između zemalja, pa čak i između različitih organizacija (16). Tako se FIT preporučuje u velikom starosnom opsegu od 50 do 74 godine, dok se kolonoskopija kao metoda skrininga preporučuje samo u Austriji, Nemačkoj, Poljskoj i Americi (130). Za osobe od 75. godine života se u Kanadi ne preporučuje rutinski skrining, što nije slučaj u Austriji, dok se u Engleskoj i Americi odluka o sprovođenju skrininga za ove pacijente donosi za svaki slučaj posebno, u zavisnosti od opšteg stanja, lične i porodične anamneze (130).

Bez obzira na velike različitosti u skrining programima, samo sprovođenje skrininga dovodi do smanjenja smrtnosti od KRK (9).

1.6. Klinička prezentacija, preoperativna evaluacija bolesti i određivanje stadijuma

Simptomi kolorektalnog karcinoma su raznoliki i obično postaju evidentni tek kada dođe do lokalnog ili sistemskog širenja bolesti. Kako bi lečenje imalo veće izgleda za uspeh, preoperativna evaluacija bolesti i određivanje stadijuma imaju veliki značaj.

1.6.1. Klinička prezentacija

Simptomi karcinoma kolona i rektuma ispoljavaju se uglavnom tek kada dođe do lokalne uznapredovalosti tumora i uglavnom su nespecifični. Promene u uobičajenom crevnom pražnjenju, kao i rektoragija su klasični simptomi koji se prvi javljaju. Abdominalni bolovi, grčevi, nadutost i ostali simptomni opstrukcije govore u prilog većeg ili više uznapredovalog tumora. Uopšteno, karcinomi desnog kolona uglavnom dovode do anemije usled dugotrajnog okultnog krvarenja, a ređe do opstruktivnih simptoma zbog velikog dijametra lumena creva. Dok levostrani tumori češće dovode do opstruktivnih smetnji, jer je i lumen levog kolona uži. Tumori rektuma dovode do promene u crevnom pražnjenju, krvarenja, tenezmi i bolova. Osim ovih tipičnih simptoma, pacijenti ne moraju da pokazuju ikakve simptome ili da se žale na nespecifične, uopštene tegobe kao što su malaksalost, slabost, gubitak apetita (7).

1.6.2. Preoperativna evaluacija

Onog trenutka kada se postavi dijagnoza KRK, potrebno je odrediti adekvatan stadijum bolesti. Prvo treba isključiti prisustvo sinhronog (više od jednog primarnog) tumora kolonoskopijom (7). Prema pojedinim podacima sinhroni tumor je prisutan u oko 5% slučajeva (132). Kod karcinoma rektuma potrebno je prvo uraditi digitorektalni pregled i rigidnu proktoskopiju kako bi se adekvatno procenio položaj tumora, njegova veličina, morfologija i fiksiranost. Endorektalni ultrazvuk i NMR karlice daju neprocenjive podatke o T i N stadijumu tumora (133, 134). Nakon određivanja lokalnog statusa bolesti, CT pregledom grudnog koša, abdomena i male karlice procenjuje se prisustvo udaljenih metastaza (7). Pozitron emisionom tomografijom se nekad može proceniti priroda promena otkrivenih na CT-u. Određivanje tumor markera (CEA i CA 19-9) preoperativno služi za orijentaciju u daljem postoperativnom praćenju (7).

1.6.3. Određivanje stadijuma

Određivanje stadijuma tumora se bazira na dubini infiltracije tumora, prisustvu depozita u limfnim čvorovima kao i prisustvu udaljenih metastaza. Istorijski su se koristili Djuksov (135), a potom i Astler-Koler-ov klasifikacioni sistem (136), a danas se koristi sistem određivanja stadijuma bolesti Američkog Udruženog Komiteta za Rak (American Joint Committee on Cancer, AJCC) baziran na TNM tumorskoj klasifikaciji koji su prikazani u tabelama 1.6.3.1. i 1.6.3.2. (137).

Tabela 1.6.3.1. TNM klasifikacija i Stadijumi tumora prema AJCC, osma verzija.

T stadijum	N stadijum	M stadijum
T_x primarni tumor se ne može proceniti	N_x regionalni limfni čvorovi se ne mogu proceniti	M₀ nema udaljeih metastaza
T₀ nema dokaza o prisustvu primarnog tumora	N₀ nema metastaza u regionalnim limfnim čvorovima	M_x prisustvo udaljeih metastaza se ne može proceniti
T_{is} karcinom in situ: intraepitelni tumor ili invazija lamine proprije	N₁ metastaze u 1 do 3 regionalna limfna čvora	M₁ prisutne udaljene metastaze
T₁ invazija submukoze	N_{1a} metastaza u jednom regionalnom limfnom čvoru	M_{1a} metastaze ograničene na jedan organ ili u neregionalnom limfnom čvoru
T₂ invazija muskularis proprije	N_{1b} metastaza u 2 do 3 regionalna limfna čvora	M_{1b} metastaze u više od jednog organa ili prisutni peritonealni depoziti
T₃ invazija kroz muskularis propriju u perikolorektalno tkivo	N_{1c} tumorski depozit(i) u subserozi, ili neperitonealizovanom perikoličnom ili perirektalnom tkivu, bez prisustva regionalnih limfnih čvorova	
T_{4a} infiltracija visceralnog peritoneuma	N₂ metastaze u 4 ili više regionalna limfna čvora	
T_{4b} tumor direktno infiltriše ili je adheriran uz okolne organe	N_{2a} metastaze u 4 do 6 regionalna limfna čvora	
	N_{2b} metastaze u 7 ili više regionalna limfna čvora	

Tabela 1.6.3.2. Stadijuma kolorektalnog karcinoma prema AJCC, osma verzija.

Stadijum tumora	T stadijum	N stadijum	M stadijum
0	Tis	N0	M0
I	T1	N0	M0
	T2	N0	M0
IIA	T3	N0	M0
IIB	T4a	N0	M0
IIC	T4b	N0	M0
IIIA	T1-T2	N1/N1c	M0
	T1	N2a	M0
IIIB	T3-T4a	N1/N1c	M0
	T2-T3	N2a	M0
	T1-T2	N2b	M0
IIIC	T4a	N2a	M0
	T3-T4a	N2b	M0
	T4b	N1-N2	M0
IVA	Bilo koji T	Bilo koji N	M1a
IVB	Bilo koji T	Bilo koji N	M1b

Stadijum I bolesti podrazumeva invazivne karcinome koji dopiru do submukoze ili muskularis proprije, ali bez prisustva nodalnih ili udaljenih metastaza. Stadijum II obuhvata tumore koji probijaju zid creva ili infiltrišu seroze ili susedne organe, ali nemaju nodalne ili udaljene metastaze. Tumori kod kojih postoje nodalne metastaze, ali ne i udaljene, bez obzira na T status ubrajaju se u stadijum III, dok prisustvo udaljenih metastaza svrstava pacijente u stadijum IV bolesti. Prisustvo udaljenih metastaza, tj. stadijum IV KRK su uglavnom otkrije preoperativno, T i N stadijum se može naslutiti uz pomoć NMR i endorektalnog ultrazvuka (133, 134), ali se definitivno određivanje stadijuma I, II i III može sprovesti isključivo nakon patohistološke evaluacije resecciranog preparata (7).

Stadijum bolesti korelira sa petogodišnjim preživljavanjem (138) i prema stadijumu se procenjuje svrsishodnost modaliteta lečenja koji su na raspolaganju. Kod pacijenata sa stadijumom I i II se može očekivati prilično visok procenat preživljavanja od preko 70%, dok prisustvo nodalnih i udaljenih metastaza dovodi do značajno manjeg preživljavanja (138).

Pored prisustva metastaza u lokoregionalnim limfnim čvorovima, kao najznačajnijeg prognostičkog faktora, brojne druge karakteristike, kao što su stepen diferencijacije, mucinozna komponenta, perineuralna i venska invazija, diferencijacija po tipu ćelija pečatnog prstena, peritumorski i intratumorski limfocitni odgovor i brojni drugi faktori, takođe utiču na preživljavanje kod KRK.

1.6.4. Kvantitativna analiza parametara digitalizovanih mikrografa

Sa ciljem smanjenja ukupnih dijagnostičkih troškova i poboljšanja preciznosti postavljenih dijagnoza, poslednjih godina se sve više razvijaju metode kvantitativne kompjuterske analize histopatoloških preparata i određivanja strukturnih i teksturnih parametara koji bi mogli poslužiti kao markeri oboljenja. Interesovanje u ovoj oblasti je dodatno motivisano razvojem WSI skenera (whole slide imaging scanner), kao i metoda mašinskog učenja i veštačke inteligencije. Sve to je korak ka digitalnoj patologiji, koja podrazumeva automatsko prikupljanje, obradu, interpretaciju i pretraživanje podataka dobijenih WSI skeniranjem visoke rezolucije (139-141). Međutim, pokazuje se da je metodologiju i kvalitet početnih uzoraka potrebno još dosta poboljšati kako bi ovakva rešenja mogla sa sigurnošću da se upotrebljavaju u praksi (142, 143). S jedne strane, predlaže se preciznija standardizacija postupaka koji bi se primenjivali u različitim laboratorijama ka smanjenju razlika u zaključcima. S druge strane, pokazuje se da se bolji rezultat može postići kontrolom kvaliteta i odbacivanjem dela uzoraka ili smanjenjem dimenzionalnosti vektora osobina slike (143, 144). Dodatno, ispituje se koje od osobina digitalizovanih mikrografa bi mogle biti pouzdane i robusne kao pokazatelji promena, čak i u slučaju kada bi količina ili kvalitet početnih uzoraka bili donekle ograničeni. Ova istraživanja imaju veliki potencijal za buduću primenu, ukoliko bi se uspešno redukovali postojeći problem.

1.6.5. Infracrvena spektroskopija kao moguće dijagnostičko sredstvo

Infracrvena (IR) spektroskopija je fizičko-hemijska metoda, koja se zasniva na snimanju apsorpcionih spektara analiziranih jedinjenja. U medicinskim istraživanjima, osnova za primenu ove metode nalazi se u različitom hemijskom sastavu zdravog i bolesnog tkiva. Prisustvo različitih molekula u ove dve vrste tkiva pokazaće i različite IR spektre.

Među različitim spektroskopskim metodama koje su bile procenjivane za razlikovanje normalnog od neoplastičnog tkiva, Fourier-ova infracrvena spektroskopija (FTIR) pokazala je ogroman potencijal kao tehnika budućnosti. Infracrvene (IR) tehnike u biomedicini postale su stvarnost sa velikom količinom informacija prikupljenih iz kliničkih studija. Ova tehnika, u kojoj se ne koriste reagensi, može brzo i neinvazivno otkriti promene u biohemijskom sastavu ćelija i tkiva (na molekularnom nivou), posebno tokom karcinogeneze (145).

Istaknuta područja u kojima se FTIR-spektroskopija može koristiti u dijagnostici malignih tumora u budućnosti su:

- razlikovanje normalnog od obolelog tkiva u različitim organima (dojke, jetre, grlića materice, kolona i rektuma) i otkrivanje ranih stadijuma maligniteta (na primer, polip koji se smatra premalignim), koji još nisu detektibilni primenom standardnih metoda (146).
- praćenje abnormalnog rasta i proliferacije ćelija u delovima tkiva, npr. u kriptama debelog creva koje poseduju dobro uspostavljene zone ćelijskog rasta i odbacivanja starih ćelija (147).
- diferencijacija između karcinoma i drugih patoloških stanja sa sličnom kliničkom manifestacijom, kao što su inflamatorne bolesti creva (IBD) i KRK (148).
- praćenje efekta hemioterapije kod limfoproliferativnih bolesti, pa čak i određivanje gradusa tih tumora (149, 150).

Svi ovi navedeni primeri jasno ukazuju na to da FTIR ima potencijal da se razvije u moćno sredstvo u dijagnostici karcinoma.

IR spektroskopija je proučavanje interakcije infracrvenog zračenja sa različitim materijama. Raniji instrumenti su bili previše disperzivni i stoga je intenzitet na svakoj talasnoj dužini meren zasebno. Ova metoda, iako popularna, oduzimala je mnogo vremena. S druge strane, FTIR spektroskopija ne sadrži monohromatore, već je optički element sastavljen od interferometra, omogućavajući istovremena merenja kompletnog opsega talasnih dužina u kratkom vremenskom periodu (145). Kompjuterizovana metodologija Fourier-ove transformacije prenosi razliku optičke putanje (interferogram) u frekventni domen i na taj način smanjuje nivo šuma i čini prikupljanje podataka bržim i lakšim za tumačenje (145).

Za razliku od UV zraka, rendgenskih zraka i gama zraka, koji se trenutno koriste u medicini, IR zraci ne vrše destrukciju bioloških uzoraka (145). U poređenju sa magnetnom rezonancom (MR) i pozitron emisionom tomografijom (PET), potrebna je manja količina uzoraka (dakle dovoljna je i biopsija), a takođe je brža od Ramanspektroskopije za ex vivo analizu. FTIR spektroskopija ima prednost u analizi tkiva, tečnosti i ćelija (145).

IR zračenje podstiče vibracije kovalentnih veza molekula unutar uzorka koji ga apsorbuje. Talasna dužina IR zračenja koje se apsorbuje zavisi od prirode kovalentne veze (vrste atoma u vezi i vrste veze) i jačine bilo koje međumolekulske interakcije. Različite biomolekularne komponente daju karakteristične spektre koji se mogu smatrati jedinstvenim za svaku od njih, omogućavajući time merenje složenih molekularnih vibracionih režima koji sadrže dragocene informacije o promenama koje se dešavaju unutar tkiva usled različitih bolesti (151-153). Kada se adekvatno namesti aparatura i podese parametri merenja, ova metoda je veoma jednostavna za rukovanje i krajnje ekonomična. Budući da priprema uzorka nije zahtevna i ne traži posebne tretmane, IR spektroskopija bi omogućila brzu dijagnozu (145). Prilikom dobijanja uzoraka za bilo koju od već ustanovljenih dijagnostičkih procedura, kao što su klasična patohistološka ili histohehemijska analiza, delovi tih uzoraka se mogu iskoristiti za FTIR spektroskopiju i na taj način bi se dobili dodatni korisni podaci, koji bi pomogli u razlikovanju vrste/prirode polipa kolorektuma (154, 155).

Savremeni trendovi idu ka tome da se u bliskoj budućnosti razviju dijagnostički instrumenti za karcinom, zasnovani na FTIR spektroskopiji, na različitim nivoima u tkivima, od biopsije do in situ dijagnoze kod pacijenata u operacionoj sali (145). FTIR spektroskopija se može koristiti, ne samo za razlikovanje zdravog tkiva od karcinoma, već i za razumevanje osnovnih procesa karcinogeneze, kao što su promene koncentracije metabolite (156, 157) i promene u sekundarnoj strukturi biomolekula (DNK) pre razvoja histološke manifestacije bolesti (158-160). Ono čemu se teži kod upotrebe FTIR-a, a što bi svakako imalo prednost u odnosu na već postojeće dijagnostičke metode, je identifikacija jednog, zajedničkog markera različitih karcinoma, bez obzira na njihovo poreklo i prirodu. Ova mogućnost je izneta u nekim od prethodnih istraživanja, koja su se bavila istraživanjem jedinstvenog porekla karcinoma korišćenjem FTIR-a (161). Dostupnost velike količine podataka o spektrima, računarskih metoda i neuronskih mreža, kao i višestruke dijagnostičke talasne dužine bi verovatno mogle to da omoguće (162-164).

1.6.5.1. Prednosti FTIR spektroskopije

Kako je prevalenca karcinoma debelog creva velika (1), brzi način za ranu i sigurnu dijagnozu bi dao značajan doprinos u smanjenju mortaliteta. Veoma značajno dostignuće predstavljaju pionirski rezultati u in situ dijagnostici karcinoma kolona koristeći FTIR (165), a takođe je postignut napredak i u identifikaciji, klasifikaciji i predviđanju eventualnog nastanka karcinoma u bioptatima kolona i rektuma (145). Osim karcinoma kolona, FTIR spektroskopija je korišćena za otkrivanje raka u drugim organima/tkivima, kao što su grlić materice (145), želudac (166), jednjak (167) i oralna sluznica (168). Osim toga što je za FTIR potrebna vrlo mala količina uzorka (nekoliko mikrolitara ili čak nekoliko ćelija), dodatna je prednosti i ta što FTIR ne zahteva zasebno prikupljanje uzoraka, već se mogu koristiti mali delovi uzoraka koji su prikupljeni već ustanovljenim načinima za standardne dijagnostičke procedure (145). Ovo je posebno korisno za karcinome organa kao što su štitna žlezda, prostata i koštana srž, gde se mogu izvršiti iglene biopsije ili kada su samo male količine uzoraka dostupne za analizu. Mikroskopske količine limfocita su analizirane FTIR spektroskopijom u cilju identifikacije i ocene tipa leukemije (149), a isto se može primeniti i na brisu cerviksa kojim se takođe dobija mala količina uzorka (169). Osim postavljanja same dijagnoze, tj. razlikovanja benignog od malignog, precizno određivanje stadijuma i gradusa premalignog i malignog tkiva je takođe veoma važno kako bi lečenje bilo uspešno, jer bi pogrešno, neprecizno određivanje stadijuma ili gradusa dovelo do pogrešne prognoze (145). Različite vrste polipa uspešno su procenjivane pomoću FTIR-mikrospektroskopije (MSP) i neuronskih mreža (146). Po sličnom principu su klasifikovane i različite faze cervikalne intraepitelne neoplazije (170), a takođe je pokazano da je i razlikovanje melanoma od nevusa pomoću FTIR-MSP izvodljivo sa uspehom (171).

Kao što je jasno prikazano da FTIR spektroskopija može razlikovati normalna od karcinomskih tkiva, kao i različite graduse maligniteta, tako bi bilo moguće izračunati opseg širenja karcinoma i premalignih stanja pomoću biopsija na pravilnim razmacima od glavne tumorske mase; kao i ponovno procenjivanje resekcione margine za svakog pojedinačnog pacijenta (145). U slučaju poremećene histologije kolona i rektuma, abnormalne kriptе se mogu identifikovati u vrlo ranoj fazi onkogeneze (147, 172). Upotreba veoma osetljivih postupaka kao što je FTIR može razlikovati i različita stanja, koja mogu inicijalno ličiti na karcinom ili se mogu razviti u karcinom (npr. atrofični gastritis ili inflamatorne bolesti creva) od samog karcinoma (148). Dosadašnja otkrića vezana za FTIR daju nadu da bi se ova metoda mogla koristiti u budućnosti za predviđanje relapsa karcinoma i početka maligne faze u razvoju tumora (145). Takva primena će zavisiti od visoke tačnosti i predvidljivosti spektroskopije u tandemu sa naprednim računarskim metodama, kao npr. neuronskim mrežama (145).

1.6.5.2. Budućnost infracrvene spektroskopije u dijagnostici kolorektalnog karcinoma

Pokazalo se da FTIR spektroskopija daje važne podatke u vezi sa promenama biohemijskog sastava ćelija i tkiva, posebno tokom karcinogeneze. Nakon što se detaljno uporedi i utvrdi efikasnost FTIR-a sa već prihvaćenim dijagnostičkim metodama, možda će moći i da ih zameni u budućnosti, posebno kada se uzmu u obzir ograničenja trenutnih metoda, kao što su potrebno vreme i novac. FTIR se, prema pojedinim autorima, nameće kao korak između standardne mikroskopije i složenih, molekularno bioloških metoda, u cilju smanjenja potrebnih uzoraka za detaljnu analizu (145). Metoda bi naročito bila korisna u identifikaciji suptilnih biohemijskih promena koje nisu dale svoju morfološku manifestaciju vidljivu histološkim analizama, prilikom dijagnoze premalignih stanja, kao i u analizi resekcionih margina uzoraka (147). U tom pogledu, mapiranje tkiva udaljenih od glavne tumorske mase FTIR-om bi pomoglo hirurzima u operacionoj sali pri preciznom određivanju resekcionih margina. Dostupnost intenzivnih IR snopova iz sinhrotrona pomogla je u rasvetljavanju biohemijskih promena unutar pojedinačnih ćelija i razumevanju ćelijskog ciklusa, rasta i ćelijske smrti na molekularnom nivou (173). Slično ovim principima, spektralne promene usled mikrobnih infekcija (174) ili malignitetima indukovane genetske promene (175), mogle bi u budućnosti pomoći da se definišu spektralne promene karcinoma do nivoa njegovog uzroka (145). Prema tome, potencijalna svestranost FTIR spektroskopije mogla bi da se koristi za razjašnjavanje više aspekata karcinoma u kraćem vremenskom periodu, koristeći varijacije pri različitim talasnim dužinama. Daljim razvojem optičkih vlakana i smanjivanjem smetnji koje stvara voda u tkivima, došlo bi se do revolucionarnih promena u razvoju endoskopskih dijagnostičkih instrumenata zasnovanih na IR spektroskopiji, te bi rutinska kontrola progresije ili recidiva bolesti bila podnošljivija i za pacijente i za hirurge, jer bi se izbegavale invazivne hirurške intervencije (145, 176).

Napredak u razvoju softvera i metoda izračunavanja će svakako omogućiti rutinsku upotrebu FTIR spektroskopije u dijagnozi, praćenju, možda čak i predviđanju nastanka karcinoma. Dalja istraživanja u različitim oblastima kao i saradnja fizičara, informatičkih stručnjaka, patologa, onkologa i hirurga mogu od FTIR spektroskopije da naprave novo, moćno sredstvo u lečenju malignih bolesti.

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Ciljevi ovog istraživanja bili su da se, u odnosu na pol, starosnu dob pacijenta i stadijum tumora, odrede:

1. Morfometrijska, teksturna i fraktalna analiza digitalizovanih mikrografa.
2. Koncentracija mikro- i makroelemenata u tumorskom tkivu kolona/rektuma i zdravoj mukozi.
3. Parametri oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite u tumorskom tkivu kolona/rektuma i zdravoj mukozi.
4. Koncentracija masnih kiselina u tumorskom tkivu kolona/rektuma i zdravoj mukozi.
5. Dužina telomera u tumorskom tkivu kolona/rektuma, zdravoj mukozi i perifernim leukocitima.
6. Spektri apsorbiranih talasnih dužina infracrvenom spektroskopijom i time odrediti biohemijski sastav u tumorskom tkivu kolona/rektuma i zdravoj mukozi.

3. MATERIJAL I METODE

Ovo istraživanje je bilo dizajnirano i realizovano po tipu studije preseka. Pacijenti uključeni u istraživanje su bili lečeni u Klinici za hirurgiju „Nikola Spasić“ Kliničko-bolničkog centra Zvezdara. Morfometrijska, teksturna i fraktalna analiza je bila sprovedena u Institutu za fiziku u Beogradu, kao i analiza uzoraka infracrvenom spektroskopijom. Merenje koncentracije mikroelemenata i makroelemenata je bilo sprovedeno u Institutu za higijenu i tehnologiju mesa. Parametri oksidativnog i nitrozativnog stresa su određivani u Institutu za biohemiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Koncentracija masnih kiselina je merena u Institutu za medicinska istraživanja Univerziteta u Beogradu. Merenje dužine telomera u tkivnim uzorcima i uzorcima krvi rađeno je u Stomatološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu.

3.1. Studijski pacijenti

U ovom istraživanju su uključeni pacijenti koji su bili hospitalizovani na Klinici za hirurgiju „Nikola Spasić“ Kliničko-bolničkog centra (KBC) Zvezdara u Beogradu. Uključeno je ukupno 111 pacijenata. Broj pacijenata je određen na osnovu broja pacijenata u prethodnih pet godina iz grupa kod kojih je manje zastupljen ovaj tip tumora. Kriterijumi za uključivanje u studiju su bili: prethodno patohistološki verifikovan karcinom kolona ili rektuma, starost preko 18 godina. Kriterijumi za isključenje iz studije su bili: starost ispod 18 godina, poznata istorija HIV, HBV, HCV ili sifilisa potvrđena od strane pacijenta. Pre uključivanja u istraživanje svi pacijenti su potpisali informisani pristanak.

3.2. Protokol istraživanja

Svi postupci su odobreni od strane Etičkog odbora KBC Zvezdara, Beograd (Odluka sednice održane dana 29.06.2016.), kao i od strane Etičke komisije Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu (13222/III-13, 17.03.2021.).

Nakon prijema pacijenata i potpisivanja informisanog pristanka, od pacijenata je uzimana potrebna količina krvi za određivanje hematoloških i biohemijskih parametara. Navedene analize su urađene u Službi za laboratorijsku dijagnostiku KBC Zvezdara. Za uzimanje uzoraka krvi od pacijenata korišćena je standardna oprema Klinike za hirurgiju. Nakon hirurške resekcije kolona/rektuma, resekat je obilno ispiran fiziološkim rastvorom (Hemofarm, Vršac, Srbija), potom je u sterilnim uslovima uzimano oko 6 grama tumorskog tkiva (ne ugrožavajući definitivnu patohistološku dijagnozu), kao i 6 grama zdrave mukoze, što je moguće više udaljene od tumorskog tkiva, a minimalno 20cm. Svi uzorci su stavljani u sterilne tube (Microcentrifuge tubes with lid, PP, 2,0ml, Brand GMBH and Co KG, Wertheim, Nemačka) i potom čuvani u tečnom azotu do transporta i skladištenja u zamrzivaču na -80°C. Vreme od hirurške devaskularizacije preparata do potapanja u tečni azot iznosilo je najviše 30 minuta. Pacijenti uključeni u studiju su razvrstani u četiri grupe: muškarci do 65 godina starosti, muškarci preko 65 godina starosti, žene do 65 godina starosti i žene preko 65 godina starosti.

Delovi tumorskog tkiva i zdrave mukoze su korišćeni za određivanje:

1. koncentracije makro- i mikroelemenata,
2. koncentracije masnih kiselina,
3. parametara oksidativnog stresa,
4. parametara antioksidativne zaštite,
5. dužine telomera,
6. biohemijskih sastava uzoraka pomoću infracrvene spektroskopije.

Stadijumi karcinoma kolona/rektuma koji su se koristili u istraživanju, određivani su pomoću patološkog TNM stadijuma. Patološki TNM stadijum tumora je utvrđivan nakon makroskopskog i mikroskopskog pregleda hirurškog resekata. Mikroskopski pregled podrazumeva patohistološku evaluaciju uzoraka tkiva koja su obrađena na standardan način (fiksirana u formalinu, ukalupljena u parafinu) i obojena hematoksilin-eozin metodom.

Korišćenjem Olympus BX43 mikroskopa (Olympus, Tokyo, Japan) sa uvećanjem 1000×, Olympus DP70 kamere (Olympus BX50, Tokyo, Japan), i Analysis 5.0 softvera (SoftImaging System, Olympus), histološke sekcije su digitalizovane u visokoj rezoluciji, 4080×3072 piksela. Time je obezbeđeno 11,76 piksela po mikrometru za digitalnu analizu strukturnih i teksturnih osobina.

Za potrebe uzorkovanja korišćen je sterilan instrumentarijum Klinike za hirurgiju i kanister za tečni azot zapremine 6 litara (U.S. Solid 6L Liquid Nitrogen Dewar Tank, SKU JFLNT00002, GTIN-12 (U.P.C.) 888107027959, Model USS-LNT00002). Tečni azot (Gourmet N- E 941, klasifikacija CLP/GHS H281, CAS broj 7727-37-9, EC broj 231-783-9, koncentracija 100%) je nabavljen od proizvođača, firme MESSER TECHOGAS A.D. Rakovica, Beograd, Srbija.

3.3. Određivanje hematoloških i biohemijskih parametara

Određivanje krvne slike (leukociti ($10^9/l$), eritrociti ($10^{12}/l$), hemoglobin (g/dl), hematokrit (%), MCV (Mean corpuscular volume - prosečna zapremina eritrocita) (fl), MCH (mean corpuscular hemoglobin - prosečna količina hemoglobina u eritrocitu) (pg), MCHC (mean corpuscular hemoglobin concentration - srednja koncentracija hemoglobina na decilitar eritrocita) (g/dl), trombociti ($10^9/l$), RDW SD (red cell distribution width standard deviation - raspodela eritorcita po zapremini standardna devijacija) (fl), RDW CV (red cell distribution width coefficient of variation - raspodela eritorcita po zapremini koeficijent varijacije) (%), PDW (platelet distribution width - raspodela trombocita po zapremini) (fl), MPV (mean platelet volume - prosečna zapremina trombocita) (fl), PCT (plateletcrit - procenat krvi koji zauzimaju trombociti) (%), neutrofili (%), limfociti (%), monociti (%), eozinofili (%), bazofili (%), neutrofili ($10^9/l$), limfociti ($10^9/l$), monociti ($10^9/l$), eozinofili ($10^9/l$), bazofili ($10^9/l$), IG (Immature Granulocytes - nezreli granulociti apsolutni broj) ($10^9/l$), IG (Immature Granulocytes - nezreli granulociti u procentima) (%) je rađeno na hematološkom brojaču XN-1000 firme Sysmex (Kobe, Japan), metodom fluorescentne protočne citometrije.

Određivanje biohemijskih parametara (bilirubin ukupni ($\mu\text{mol}/l$), bilirubin direktni ($\mu\text{mol}/l$), ukupni proteini (g/l), albumini (g/l), mokraćna kiselina ($\mu\text{mol}/l$), kreatinin ($\mu\text{mol}/l$), urea (mmol/l), glukoza (mmol/l), holesterol (mmol/l), trigliceridi (mmol/l), HDL-holesterol (High-density lipoprotein - lipoproteini velike gustine) (mmol/l), LDL - holesterol (low-density lipoprotein - lipoproteini male gustine) (mmol/l), K (kalijum - mmol/l), Na (natrijum - mmol/l), Cl (hlor - mmol/l), Ca (kalcijum - mmol/l), fosfor (mmol/l), Mg (magnezijum - mmol/l), bikarbonati (mmol/l), Fe (gvožđe - $\mu\text{mol}/l$), UIBC (unsaturated iron-binding capacity - nezasićeni kapacitet vezivanja gvožđa) ($\mu\text{mol}/l$), TIBC (total iron-binding capacity - ukupni kapacitet vezivanja gvožđa) ($\mu\text{mol}/l$), saturacija (%), feritin (ng/ml), AST (aspartat aminotransferaza) (U/l), ALT (alanin aminotransferaza)(U/l), ALP (alkalna fosfataza) (U/l), GGT (gama-glutamil transpeptidaza) (U/l), LDH (laktat dehidrogenaza) (U/l), amilaza (U/l), lipaza (U/l), CRP (C reaktivni protein) (mg/l)) je rađeno na biohemijskom analizatoru Beckman Coulter (Brea, Kalifornija, SAD) AU 480/680 spektrofotometrijskom metodom.

Parametri hemostaze (protrombinsko vreme (s), INR (international normalised ratio), Quick protrombinsko vreme (%), aPTT (activated partial thromboplastin time - aktivirano parcijalno tromboplastinsko vreme) (s), aPTT R (activated partial thromboplastin time ratio - odnos aktiviranog parcijalnog tromboplastinskog vremena) (R), fibrinogen C (g/l), trombinsko vreme (s) i trombinsko vreme (R)) su rađeni na aparatu BCS XP firme Siemens (Minhen, Nemačka), metodom koagulometrije.

Hormoni (testosteron, progesteron i estradiol), kao i tumorski markeri (CEA i CA 19-9) su određeni na aparatu Cobas e411 rotor, firme Roche (Bazel, Švajcarska), metodom ECLIA (elektrohemiluminiscentni imunoesej).

3.4. Patohistološka analiza

Nakon prijema i makroskopskog opisa hirurških resekata kolona ili rektuma, uzorkovani su reprezentativni isečci tumora, regionalni limfnih čvorovi i resekcione linije preparata. Tkivni isečci su fiksirani u neutralnom puferisanom formalinu u automatskom tkivnom procesoru 24h, nakon toga su kalupljeni u parafinske blokove, sečeni na rezove debljine 5 μm i bojeni Hematoksilin-Eozin (Bio-Optica, Milano, Italija) metodom. Patohistološke preparate je analizirao isti patolog na mikroskopu Olympus BX41 (Olympus, Tokio, Japan).

3.5. Morfometrijska, teksturna i fraktalna analiza digitalizovanih mikrografa

Analize digitalizovanih mikrografa bile su u celini fokusirane na analizu osobina jedara ćelija tumorskog tkiva, kod kojih se sa napredovanjem tumora uočava promena veličine i oblika, a dolazi i do promena u arhitekturi hromatina unutar jedara što se može registrovati preko izmenjene kompleksnosti strukture hromatina i preko razlika u statističkim parametrima tekstura. Uzimajući patohistološke analize kao zlatni standard, a sa osnovnim ciljem da se utvrdi koji parametri slike bi mogli biti najviše od koristi kada je u pitanju dijagnostika kolorektalnog karcinoma, izdvojeno je po 50 reprezentativnih jedara tumorskog tkiva i po 50 reprezentativnih jedara zdrave mukoze, za svaki od četiri TNM stadijuma. Za precizno izdvajanje jedara korišćen je softver ImageJ (NIH, Bethesda, MD, USA). Izdvojena jedra su preneti na belu podlogu i snimljena kao zasebne slike veličine 500×500 piksela.

3.5.1. Morfometrijska analiza

Morfometrijska analiza jedara precizno kvantifikuje parametre kao što su površina (*Area*), izduženost (*Aspect Ratio*) i ispunjenost oblika (*Solidity*). Kako kod kancerogenih oboljenja neki ili većina ovih parametara mogu biti izmenjeni, interesantno je uporediti razlike u zavisnosti od TNM stadijuma i značaj pojedinačnih parametara u opštoj proceni stanja. Neki od primera upotrebe morfometrijskih parametara mogu se naći u literaturi (177-179). Ovde je izračunavanje morfometrijskih parametara jedara sprovedeno korišćenjem softvera ImageJ (NIH, Bethesda, MD, USA). Određivani su površina, obim konture jedra, aproksimacija konture elipsom, izduženost, ispunjenost, cirkularnost. Izduženost odnosno aspect ratio se određuje direktno na osnovu elipsoidalnog fita, kao odnos velike i male poluose takve elipse. Površina (*Area*), najmanja konveksna površina koja obuhvata jedro (*Convex area*), i obim (*Perimeter*) se koriste u izračunavanju cirkularnosti (*Circularity*) i ispunjenosti (*Solidity*), prema ispod navedenim formulama.

$$Circularity = 4\pi \times \frac{Area}{(Perimeter)^2} \quad (1)$$

$$Solidity = \frac{Area}{Convex Area} \quad (2)$$

3.5.2. Analiza karakteristika teksture

Za analizu karakteristika teksture korišćena je metoda određivanja GLCM, odnosno gray-level-co-occurrence matrice (matrica združenog pojavljivanja nivoa sivog), koja radi sa monohromatskim ili grayscale slikama (180). Na osnovu izračunate matrice koja odgovara teksturi jedra, može se izračunati preko deset statističkih karakteristika (Haralick statistical features) za opis i upoređivanje tekstura, čime se približno makroskopski može proceniti arhitektura hromatina.

Korišćen je softver na osnovu metoda opisanih u (180), koji je prilagođen za rad sa već izdvojenim jedrima na beloj podlozi (Institut za fiziku Beograd), kao što je detaljnije opisano u radu (181). Razmatrani su prostorni rasporedi tačaka pod uglom 0° , 45° , 90° , 135° , na udaljenostima od 1 px do 16 px (piksela), dok su razlike u intenzitetima piksela kvantifikovane pomoću 16 nivoa sivog. Verovatnoća pojedine kombinacije navedena je kao $p(i, j)$ i odnosi se na piksele i i j . Srednje vrednosti intenziteta piksela označene su kao μ_i , a standardne devijacije kao σ_i . Izračunato je po četiri statistička parametra koji se verovatno i najčešće koriste, a to su kontrast (*Contrast*), korelacija (*Correlation*), energija (*Energy* ili *ASM*), i homogenost (*Homogeneity*). Neke od ovih osobina se same ili u kombinaciji sa brojnim drugim parametrima koriste i u automatizovanim analizama tekstura, videti na primer (182, 183).

$$Contrast = \sum_{n=0}^{N_g-1} n^2 \left\{ \sum_{i=1}^{N_g} \sum_{j=1}^{N_g} p(i, j) \Big|_{|i-j|=n} \right\}. \quad (3)$$

$$Correlation = \sum_{i=1}^{N_g} \sum_{j=1}^{N_g} \frac{(i - \mu_i)(j - \mu_j)p(i, j)}{\sigma_i \sigma_j}. \quad (4)$$

$$ASM = \sum_{i=1}^{N_g} \sum_{j=1}^{N_g} p(i, j)^2. \quad (5)$$

$$Homogeneity = \sum_{i=1}^{N_g} \sum_{j=1}^{N_g} \frac{p(i, j)}{1 + |i - j|}. \quad (6)$$

3.5.3. Fraktalna analiza

Kao korisni parametri za kvantifikovanje strukturne složenosti izdvojenih jedara pokazali su se i fraktalna dimenzija i lakunarnost (181, 184, 185). Prednost fraktalne analize u ovakvim istraživanjima je u tome što mnogi prirodni procesi, pa i biološki, ispoljavaju multifraktalni karakter. Na primer, fraktalna dimenzija kvantifikuje iskrzanost kontura objekata i stepen grananja. Lakunarnost kao parametar drugog reda odgovara prostornoj nehomogenosti u smislu rasporeda i veličine praznina u fraktalnim obrascima. Kako bi se procenili ovi parametri, celine od interesa, u ovom slučaju izdvojena jedra, se prekrivaju mrežama promenljive veličine, ε , i prebrojava se prosečan broj tačaka obuhvaćen ćelijom mreže. Na osnovu toga se procenjuje verovatnoća nalaženja m tačaka u ćeliji veličine ε , $P(m, \varepsilon)$, i momenti prvog i višeg reda, $M^q(\varepsilon)$.

$$M(\varepsilon) = \sum_m m P(m, \varepsilon), \quad M^2(\varepsilon) = \sum_m m^2 P(m, \varepsilon). \quad (7)$$

Kada se podaci prikažu u zavisnosti od veličine ćelije mreže i pronade odgovarajuća regresiona kriva, može se proceniti fraktalna dimenzija, D . Lakunarnost, L , se procenjuje kada se na sličan način uzme u obzir i momenat drugog reda. Ukoliko slike nisu binarizovane, već monohromatske, u svim zbirovima se vrši skaliranje intenzitetom piksela za svaki piksel koji se uzima u obzir.

$$D = \lim_{\varepsilon \rightarrow 0} \frac{\ln M(\varepsilon)}{\ln \varepsilon}, \quad \lambda(\varepsilon) = \frac{\langle M^2(\varepsilon) \rangle - \langle M(\varepsilon) \rangle^2}{\langle M(\varepsilon) \rangle^2}, \quad L \approx \lim_{\varepsilon \rightarrow 0} \frac{\ln \lambda(\varepsilon)}{\ln \varepsilon}. \quad (8)$$

Promene ovih parametara ukazuju na promene u strukturnoj i teksturnoj složenosti jedra. Za izračunavanje fraktalne dimenzije i lakunarnosti korišćen je FracLac plugin za ImageJ (FracLac, A. Karperien, Charles Sturt University, Australija).

3.6. Koncentracija mikro- i makroelemenata

U ispitivanim uzorcima određena je koncentracija sledećih devetnaest elemenata:

Fe (gvožđe),
Zn (cink),
Cu (bakar),
Mn (mangan),
Se (selen),
Cr (hrom),
Co (kobalt),
Ni (nikl),
Na (natrijum),
K (kalijum),
Mg (magnezijum),
Ca (kalcijum),
Cd (kadmijum),
Pb (olovo),
Hg (živa),
As (arsen),
U (uranijum),
Sn (kalaj) i
Al (aluminijum).

Zamrznuti uzorci su odmrzavani na temperaturi od +4°C dan pre analiziranja, a potom su homogenizovani. Homogenizacija je urađena ultrazvučnim homogenizerom (Bandelin Sonoplus, Bandelin Electronic, Berlin, Nemačka) tokom 60 sekundi na najvećoj jačini. Količina od otprilike 0.5g odmrznutog, homogenizovanog tkiva svakog uzorka je stavljena u teflonsku posudu sa 1.5ml azotne kiseline (67% Trace Metal Grade, Fisher Scientific, Bishop, UK) i 1.5ml vodonik peroksida (30 % analytical grade, Sigma-Aldrich, St. Louis, MA, SAD) za mikrotalasnu digestiju. Program uređaja za mikrotalasnu digestiju (Start D, Milestone, Sorisole, Italija) se sastojao od tri koraka: zagrevanje od 5 minuta od sobne temperature do 180°C, 10 minuta održavanja temperature od 180°C, potom 20 minuta ventiliranja. Nakon hlađenja, digestirani uzorci su kvantitativno prenešeni u jednokratne posude i rastvoreni do 100ml dejonizovane vode, koja je napravljena uz pomoć sistema za prečišćavanje vode (Purelab DV35, ELGA, Buckinghamshire, Velika Britanija). Analiza svih devetnaest elemenata je sprovedena pomoću metode induktivno-kuplovane plazme sa masenim spektrometrom (ICP-MS) "iCap Q" (ThermoScientific, Bremen, Nemačka). Najzastupljeniji izotopi su korišćeni za kvantifikaciju. Pozicija plamenika, jonska optika i detektor su svakodnevno podešavani koristeći rastvor za podešavanje (Tune B, Thermo Scientific, Bremen, Nemačka), kako bi se optimizovali mehanički i električni parametri i smanjila mogućnost interference. Osnovni uslovi rada mernih instrumenata su bili: RF snaga (1550 W), protok gasa za hlađenje (14 l/min), protok nebulizatora (1 l/min), protok kolizionog gasa (1 ml/min), način rada (Kinetic Energy Discrimination-KED), vreme zadržavanja (10ms). Standardni rastvori koji sadrže 1000mg/l svakog od elemenata (Fe, Zn, Cu, Mn, Se, Cr, Co, Ni, Na, K, Mg, Ca, Cd, Pb, Hg iAs) su kupljeni od proizvođača Reagecon (Shannon, Co. Clare, Irska). Ovi rastvori su korišćeni za pravljenje standarda za kalibracione krive od pet tačaka, uključujući i nulu. Tokom očitavanja svakog uzorka, u sistem se paralelno uvodio i rastvor internog standarda, koji je obuhvatao elemente niskih, srednjih i visokih masa (⁶Li, ⁴⁵Sc, ⁷¹Ga, ⁸⁹Y, ²⁰⁹Bi). Softver za akviziciju podataka očitavao je automatski vrednosti ispitivanih elemenata i vrednosti za elemente iz internog standarda. Rezultati su iskazivani kao procentualni udeo prvog očitavanja. Softver je, na osnovu očitanih vrednosti, automatski korigovao dobijene koncentracije elemenata u uzorku za procenat umanjenja ili povećanja intenziteta internog standarda. Ovakav način analize je omogućio kompenzaciju eventualnih promena u sprovodnom i detekcionom sistemu uređaja u realnom vremenu. Svi rastvori (standardni, interni i uzorci) su pripremani u 2% rastvoru azotne kiseline.

Kvalitet analitičkog procesa verifikovan je analizom sertifikovanog referentnog materijala NIST 1577c (goveđa jetra, Gaithersburg, MD, SAD). Referentni materijal je pripremljen kao ispitivani uzorak koristeći mikrotalasni digestor. Izmerene koncentracije su korigovane za faktor odgovora unutrašnjih standarda koristeći metodu interpolacije i bili su opsegu sertifikovanih vrednosti za sve izotope (tabela 3.6.1. Sertifikovane vrednosti i izmerene vrednosti elemenata (NIST 1577c, Gaithersburg, MD, SAD)). Nisu dobijene informacije za Hg, Al, Sn and U u referentnom materijalu, i stoga su analitički povrati od 97% do 105% utvrđeni korišćenjem vrhova uzoraka.

Tabela 3.6.1. Sertifikovane vrednosti i izmerene vrednosti elemenata (NIST 1577c, Gejtersberg, Merilend, SAD).

Elements	Certified value* (µg/kg)	Analysed value** (µg/kg)	Recovery (%)
As	19,3±1,4	20,5±1,1	106,2
Cd	97±1,4	97,9±2,6	100,9
Pb	62,8±1,0 (mg/kg)	63,3±2,6 (mg/kg)	100,8 (%)
Cu	275,2±4,6	271,9±5,7	98,8
Fe	197,94±0,65	197,43±5,21	99,7
Zn	181,1±1,0	180,9±1,8	99,9
Mn	10,46±0,47	10,55±0,25	100,9
Cr	53±14	51±2,8	96,2
Co	0,3±0,018	0,31±0,016	103,3
Ni	44,5±9,2	52,7±4,3	118,4
Se	2,031±0,045	2,055±0,066	101,2
K	10230±640	10540±300	103,0
Na	2033±64	2011±140	98,9
Ca	131±10	125±4	95,4
Mg	620±42	631±19	101,8

* Sertifikovane vrednosti date od strane proizvođača.

** Vrednosti su prikazane kao srednja vrednost±standardna devijacija.

3.7. Određivanje parametara oksidativnog stresa

Određivani su sadržaj lipidnih peroksida (malondialdehid), aktivnost katalaze, koncentracije nitrita, kao i relativne vrednosti ovih parametara prema koncentraciji proteina po Lowry-ju.

Homogenizacija tkiva:

Aktivnost katalaze, sadržaj lipidnih peroksida (MDA) i koncentracija NO ispitivana je na oko 300mg tkiva tumora i zdravog tkiva kolona/rektuma, koje je homogenizovano u 3 mL kalijum-hlorida (KCl 0,16 mol/L) čime je dobijen 10% homogenat. Homogenizacija je urađena ultrazvučnim homogenizerom (Bandelin Sonoplus, Bandelin Electronic, Berlin, Nemačka) tokom 60 sekundi na najvećoj jačini. Potrebna gramaža tkiva je uzimana u sterilnim uslovima, pincetom i skalpelom, dok je potrebna zapremina rastvora KCl-a uzimana pipetom sa sterilnim nastavcima. Nakon izvršene homogenizacije, 1 mL homogenata je iskorišćen za određivanje aktivnosti katalaze. Ostatak homogenata korišćen je za određivanje sadržaja lipidnih peroksida i koncentracija NO.

3.7.1. Određivanje sadržaja lipidnih peroksida - MDA

Lipidna peroksidacija označava oštećenje lipidnih komponenti ćelijske membrane delovanjem slobodnih kiseoničnih radikala. Peroksidacijom masnih kiselina sa 3 ili više dvostrukih veza nastaje malondialdehid (MDA) koji se, kao pokazatelj intenziteta lipidne peroksidacije i oksidativnog stresa, može određivati u plazmi i urinu (186).

Za merenje lipidne peroksidacije korišćena je široko prihvaćena reakcija u kojoj: MDA reaguje sa tiobarbiturnom kiselinom (TBA, 3,75g/L) u uslovima povišene temperature i kiselog pH (trihlorsirćetna kiselina, TCA 150 g/L) i daje konjugat crvene boje čiji je maksimum apsorpcije na 532 nm. TBA može reagovati sa drugim aldehydima i nekim šećerima, a opisana reakcija je široko prihvaćena. Da bi se odredio sadržaj MDA korišćen je nerazblažen homogenat. Epruvete uzorka (tumor/zdravo tkivo) i slepe probe su pripremljene na način prikazan u tabeli br. 3.7.1.1.

Tabela 3.7.1.1. Način određivanja MDA.

Reagens	Uzorak	Slepa proba
Homogenat	1mL	
dH ₂ O		1mL
TCA	0,5mL	0,5mL
TBA	0,5mL	0,5mL

Zatvorene epruvete stavljene su u vodeno kupatilo u trajanju od 15 minuta na 100°C. Nakon inkubacije epruvete su ohlađene, pa centrifugirane 10 minuta na 3000 obrtaja. Nakon inkubacije i centrifugiranja očitana je apsorbancija na čitaču za mikrotitarske ploče na 535 nm (Sunrise, TECAN, Dorset, Velika Britanija). Za određivanje koncentracija lipidnih peroksida korišćen je nanomolarni apsorpcioni koeficijent uz korišćenje sledeće formule:

$$MDA = \frac{(A_{uz}-A_{sp})}{\epsilon} \times \frac{tV}{pV} \times R \times 10$$

Pri čemu je:

- A_{uz} - apsorbancija uzorka
- A_{sp} - apsorbancija slepe probe
- ε - molarni apsorpcioni koeficijent za MDA-TBA konjugat - 0.156mL/(nmol x cm)
- tV - ukupna zapremina - 2mL
- pV - zapremina homogenata - 1mL
- R - razblaženje homogenata - 2
- 10 - prevođenje na g tkiva

3.7.2. Određivanje aktivnosti katalaze

Katalaza je jedan od enzima antioksidativne zaštite ćelije i katališe prevođenje dva molekula vodonik peroksida (H_2O_2) u vodu (H_2O) i molekulski kiseonik (O_2):



Ovo je reakcija na kojoj je zasnovan princip najvećeg broja metoda u kojima se određuje katalazna aktivnost. Meri se kao brzina smanjenja koncentracije H_2O_2 u inkubacionoj mešavini.

Katalaza iz homogenata tkiva tumora/zdravog tkiva razlaže vodonik peroksid (supstrat). Pretpostavka je da je aktivnost katalaze proporcionalna količini utrošenog H_2O_2 u jedinici vremena (min). Na osnovu razlike u sadržaju H_2O_2 u inkubacionoj smeši pre i posle dodavanja enzima, izračunava se enzimska aktivnost. Koncentracija H_2O_2 se određuje kolorimetrijski u prisustvu amonijum molibdata ($[(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \times 4\text{H}_2\text{O}]$, 34,4 mmol/L). Vodonik peroksid sa amonijum molibdatom gradi žuto obojeno kompleksno jedinjenje čija se apsorbanca meri na 410 nm (187).

Za određivanje aktivnosti katalaze u uzorku (tumor/zdravo tkivo) je korišćen 10 puta razblažen homogenat. Ovako razblaženom homogenatu je dodat apsolutni etanol u odgovarajućem odnosu (1 mL homogenata + 10 μL apsolutnog etanola). Ovako pripremljen homogenat je razblažen dalje destilovanom vodom u odnosu 1:200.

U tabeli br. 3.7.2.1. prikazan je način pripreme epruveta uzoraka, kontrole i slepe probe.

Tabela 3.7.2.1. Način određivanja aktivnosti katalaze.

Reagens	Uzorak	Kontrola	Slepa proba
H_2O_2 (0,3g/L)	1mL	1mL	
d H_2O			1mL
Preinkubacija 5 minuta, 37°C			
Homogenat	0,1mL		
d H_2O		0,1mL	0,1mL
Inkubacija 10 minuta 37°C			
Amonijum molibdat (34,4mmol/L)	0,5mL	0,5mL	0,5mL

Jedinica katalazne aktivnosti (U) definisana je kao količina enzima koja katališe reakciju razgradnje jednog nmol H_2O_2 u minuti. Aktivnost katalaze je izračunata prema sledećoj formuli:

$$\text{Aktivnost katalaze (U/g)} = \frac{(\text{Ak}-\text{Asp})-(\text{Auz}-\text{Asp})}{\epsilon \times t} \times \frac{1,6}{0,1} \times R \times 10$$

Pri čemu je:

- Ak - apsorbanca kontrole
- Auz - apsorbanca uzorka
- Asp - apsorbanca slepe probe
- ϵ - molarni apsorpcioni koeficijent – 22.2L/($\mu\text{mol}/\text{cm}$)
- t - vreme, 10 min
- 1,6 - ukupna zapremina reakcione smeše
- 0,1 - zapremina homogenata
- R - razblaženje homogenata – 200
- 10 - prevođenje na g tkiva

3.7.3. Određivanje koncentracije nitrita Gris-ovom reakcijom

Koncentracija nitrita, kao merilo produkcije NO i efektorske funkcije makrofaga, određuje se Grisovom reakcijom (188). Nerazblaženi uzorci homogenata tumora/zdravog tkiva (zapremine po 50 μ l) se nalivaju u bunare ploče sa 96 bunarića. Potom se u svaki bunar ploče doda po 50 μ l Grisovog reagensa (0,1% rastvor N-1-naftilendiamin dihidrohlorida i 1% rastvor sulfanilamida u 5% H_3PO_4). Uzorci se inkubiraju 10 min na sobnoj temperaturi, a apsorbancija razvijene boje se meri na 540 nm na automatskom čitaču za mikrotitarske ploče (Sunrise, TECAN, Dorset, Velika Britanija). Izračunavanje koncentracije nitrita se vrši u odnosu na standardnu krivu. Ona se konstruiše na osnovu apsorbancija poznatih koncentracija $NaNO_2$. U ovoj analizi, standardna kriva je obuhvatila opseg od 0-500 pg/mL.

3.7.4. Određivanje koncentracije proteina po Lowry-ju

Određivanje koncentracije proteina po Lowry-ju se bazira na biuretskoj reakciji sa dodatnim koracima i reagensima koji povećavaju senzitivnost za detekciju i omogućavaju određivanje niskih koncentracija proteina (5-100 μ g) (189). U biuretskoj reakciji, joni bakra reaguju sa atomima azota peptidne veze u baznoj sredini (optimalno pH za izvođenje metode iznosi 10 - 10,5) pri čemu nastaje kompleksno jedinjenje koje sadrži Cu^{2+} da bi u daljoj reakciji došlo do redukcije Cu^{2+} u Cu^{1+} . Step en redukcije jona bakra je proporcionalan koncentraciji proteina obzirom da je poznato da cistein, cistin, triptofan, tirozin i peptidna veza mogu da redukuju Cu^{2+} u Cu^{1+} . Detekciju Cu^{1+} omogućava Folin-Ciocalteu reagens (fosfomolibdenska/fosfovolfram kiselina) koji sa Cu^{1+} u baznoj sredini formira komplekszeleno-plave boje čiji se intenzitet apsorbance meri na 650nm i 750nm.

Izračunavanje koncentracije proteina se vrši u odnosu na standardnu krivu. Ona se konstruiše na osnovu apsorbancija poznatih koncentracija proteina (albumin seruma govečeta, engl. Bovine serum albumine, BSA). U ovoj analizi, standardna kriva je obuhvatila opseg koncentracija BSA 0-1000 μ g/mL.

Reagensi

- A. 2% Na_2CO_3 u 0.1 N NaOH
 - B. 1% NaK Tartarat u H_2O
 - C. 0.5% $CuSO_4 \cdot 5 H_2O$ u H_2O
 - D. Reagens I: 48 ml reagens A, 1 ml reagens B i 1 ml reagens C
 - E. Reagens II- 1 deo folin-fenol [2 N]: 1 deo H_2O
- BSA Standard - 1 mg/ ml

Po 200 μ l svakog uzorka i BSA standarda (0-1000 μ g/mL) i negativnih kontrola je pipetirano u duplikatu u zasebne epruvete. Po dodavanju 4,5ml reagens A u sve epruvete, i inkubacije u trajanju od 10 minuta (37 °C), u sve epruvete je dodato po 0,5mL reagens B i sve epruvete su inkubirane 30 minuta (37 °C). Apsorbance su očitavane na 650nm, a koncentracija proteina izračunata korišćenjem standardne krive.

3.8. Određivanje koncentracije masnih kiselina

Za određivanje koncentracije masnih kiselina korišćena je uprošćena metoda Berstada i saradnika (190) za direktnu transesterifikaciju ukupnih lipida u tumorskoj i zdravoj mukozi. Oko 30mg tkiva je direktno metilovano sa 2ml 3N MeOH/HCl, na 85°C tokom sat vremena. Metil estri masnih kiselina su ekstrahovani sa heksanom i neutralisani sa KOH u vodi. Odvajanje metil estara je izvršeno gasnim hromatografom (Shimadzu, Kyoto, Japan), koji je opremljen sa injektorom i plamenim detektorom jonizacije. Dalje odvajanje metil estara je urađeno na kapilarnom stubu RTX 2330 (60 m X 0,25 mm sa 0,20 μ m film) (RESTEK, Bellefonte, PA, SAD) koristeći helijum kao gas nosač. Injektor i detektor temperature su bili namešteni na 220°C i 260°C redom. Temperatura stuba

je inicijalno bila nameštena na 100°C 5 minuta, potom je povećavana na 175°C, brzinom od 100°C/min, a zatim brzinom od 30°C/min do 220°C, i na toj temperaturi se držala 35min. Analiza za svaki uzorak je urađena u duplikatu. Svaka masna kiselina je identifikovana prema retencionom vremenu PUFA-2 standardne mešavine (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD). Sadržaj pojedinačnih masnih kiselina je izražen kao procenat ukupnog masnokiselinskog sastava.

3.9. Određivanje dužine telomera u tkivnim uzorcima

Uzorci zdravog i tumorskog tkiva su homogenizovani u TRIzol rastvoru (Life Technologies, Karlsbad, SAD), nakon čega je izolovana DNK. Dodavanjem apsolutnog etanola i centrifugiranjem izdvojeni su peleti DNK. Postupak ispiranja DNK peleta urađen je korišćenjem rastvora natrijum citrata u 10% etanolu, potom korišćenjem 75% etanola i naizmeničnim centrifugiranjem na 4 stepena Celzijusove skale. Izolovana DNK je resuspendovana u 8mM rastvoru natrijum hidroskida uz korekciju pH rastvora.

Relativna dužina telomera u 111 uzoraka tkiva kolorektalnog karcinoma i zdrave mukoze je određena pomoću relativnog odnosa broja telomernih ponovaka naspram endogene kontrole tj. gena prisutnog u jednostrukoj dozi (engl. relative telomere-to-single copy gene (T/S) ratio) putem qPCRa, na osnovu ranije opisane metode uz manje modifikacije (191). Kao endogena kontrola je korišćen gen za β -globin (HBG). Zbog razlike u temperaturnim profilima, qPCR reakcija je izvođena posebno za telomere i posebno za HBG. Sekvence prajmera i β -globina su:

5'CGGTTTGGTTTGGGTTTGGGTTTGGGTTTGGGTTTGGGTT3'(Tel1),
5'GGCTTGCCTTACCCTTACCCTTACCCTTACCCTTACCCT3'(Tel2),
5'TCTGACACAACCTGTGTTCACTAGC3'(HBG1),
5'CACCAACTTCATCCACGTTACCC3'(HBG 2).

Real-time PCR je urađen na aparatu Line-Gene K Fluorescence Quantitative PCR Detection System (Hangzhou Bioer Technology Co., Ltd., Šangaj, Kina). Za dva odvojena merenja qPCR, korišćeno je 25 μ l reakcione smeše, koja se sastojala od 12,5 μ l SYBRGreen/ROX, Master Mix 2X (Thermo Fisher Scientific Inc., MA, SAD), prajmera za telomere ili prajmera HBG; I 10 ng DNK. U svakoj qPCR reakciji korišćena je referentna tumorska DNK (293T) u serijskom razblaženju od 2,5 do 40 ng/ μ l, kako bi se dobila standardna kriva i pratila efikasnost reakcije. Temperaturni profil za qPCR za određivanje telomera je bio sledeći: 95°C 5 min, potom 30 ciklusa na 95°C tokom 15s i 56°C tokom 1min. Za β -globin (HBG) profil ciklusa je bio 95°C tokom 5 min, koji je potom praćen sa 35 ciklusa na 95°C tokom 15s 54°C tokom 1 min. Svi uzorci su rađeni u duplikatu.

Nagib standardne krive za obe qPCR reakcije je iznosio između -3,2 i -3,7, dok je koeficijent linearne korelacije (R^2) za svaku standardnu krivu bio $\geq 0,98$. Ct vrednosti (srednja vrednost) dobijene za telomere i HBG korišćene su za računanje T/S odnosa (broj telomernih ponovaka/broj gena prisutnog u jednoj kopiji). Relativni T/S odnos dobijen je upotrebom $T/S = 2^{-\Delta\Delta Ct}$ formule, gde je $\Delta\Delta Ct = (Ct_{telomere} - Ct_{HBG})$ uzorka - $(Ct_{telomere} - Ct_{HBG})$ referentne DNK (razblaženje od 10 ng na standardnoj krivi). Ovim postupkom je dobijena relativna dužina telomera (RDT) za svaki uzorak.

3.10. Određivanje dužine telomera u uzorcima krvi

Genomska DNK iz krvi je izolovana korišćenjem metode izolovanja (192), dok je za određivanje relativne dužine telomerakorišćena ista metoda, kao i za određivanje relativne dužine telomera u tkivnim uzorcima.

3.11. Infracrvena spektroskopija

Nakon opisanog uzimanja uzoraka, tkivo je prvo sečeno u sitne delove i potom homogenizovano ultrazvučnim homogenizerom (Bandelin Sonoplus, Bandelin Electronic, Berlin, Nemačka) tokom 60 sekundi na najvećoj jačini i potom razmazivano na predmetno staklo. Tkivo je onda sušeno u suvom sterilizatoru (Instrumentaria, Sesvete, Hrvatska) na 60 stepeni tokom 120 minuta. Dehidrirano tkivo je potom sastrugano skalpelom i prenešeno u tube zapremine 1,5ml. Prah kalijum bromida se sušio na 160°C tokom 5 sati. Procesuirano tkivo i isušen kalijum bromid suizmešani u odnosu d=1:350, koristeći 2mg tkiva i 0,7g KBr, kao i tri puta veći odnos, 3d, kada se koristilo 6mg tkiva. Koristeći uvek 0,12g mešavine i pritisak od 2 tone po cm², prašak se komprimovao u tablete prečnika 11mm. Opciono, nakon 24 sata tablete su mlevene i ponovo komprimovane u nove tablete istog prečnika. Infracrveno transmisijsko merenje je izvođeno na sobnoj temperaturi na NicoletNexus 470 Fourier-transformacijskom infracrvenom spektrometru (ThermoFisherScientific, Waltham, MA, SAD). Kalijum bromid delilac snopa i DTGS detektor su bili korišćeni da se pokriju talasne dužine između 450 i 4000 cm⁻¹. Transmisioni spektar je zabeležen sa rezolucijom od 2cm⁻¹ i sa 128 interferometar skenerom dodatim za svaki spektar.

3.12. Statistička analiza podataka

Za analizu rezultata ove studije korišćene su deskriptivne i analitičke statističke metode.

Apsolutni i relativni brojevi (n, %), mere centralne tendencije (aritmetička sredina, medijana) i mere disperzije (standardna devijacija) su korišćeni od deskriptivnih statističkih metoda. Kao analitičke statističke metode korišćeni su testovi razlike, od kojih t test i ANOVA kao parametarski i Hi-kvadrat test, Mann-Whitney U test i Wilcoxon test kao neparametarski testovi. Izbor testa koji je korišćen za ispitivanje razlike odabiran je na osnovu dobijenih informacija o tipu podataka i raspodele. Parametarski testovi korišćeni su za varijable čija je raspodela podataka pokazivala normalnu distribuciju, dok su neparametarski korišćeni za varijable čija je raspodela podataka pokazivala neparametarsku distribuciju. Normalnost raspodele ispitivana je na osnovu deskriptivnih parametara, testova normalnosti raspodele, kao što je Kolmogorov-Smirnov test i grafičkim metodama: histogram, boxplot, QQ plot. Rezultati su prikazani tabelarno i grafički. Svi podaci obrađeni su u SPSS 21.0.0.0 (IBM Corp. Released 2012. IBM SPSS Statistics for MacOS, Version 21.0.0.0 Armonk, NY: IBM Corp.) softverskom paketu.

4. REZULTATI

Nakon istraživanja sprovedenih na ukupno 111 uzoraka zdravog i tumorskog tkiva dobijeni su rezultati koji su sistematično predstavljeni u sledećim poglavljima.

4.1. Koncentracija mikro- i makroelemenata u tumorskom tkivu kolona/rektuma i zdravoj mukozi

Od 59 uzoraka, 29 (49,2%) su bili muškarci, dok je 30 uzoraka (50,8%) pripadalo ženskim pacijentima. Srednja vrednost godina bila je 67 ± 10 godina. Ispitanici su podeljeni u dve starosne grupe: sredovečni (≤ 65 godina) i stariji (> 65 godina). U odnosu na godine i pol, pacijenti su svrstani u četiri grupe stariji muškarci, sredovečni muškarci, starije žene i sredovečne žene. Histološki tip kod svih pacijenata je bio adenokarcinom. Kod većine pacijenata se radilo o trećem stadijumu kolorektalnog karcinoma. Karakteristike pacijenata kod kojih je ispitivana koncentracija mikro- i markoelemenata su prikazane u tabeli 4.1.1. Koncentracije izmerenih elemenata u tumorskom i zdravom tkivu prikazane su u tabeli 4.1.2. Cink je bio u značajno nižoj koncentraciji u tumorskom tkivu, dok su bakar, magnezijum, selen i kalcijum pokazali značajno više koncentracije u tumorskom tkivu u odnosu na zdravu mukozu. Kalijum je bio u značajno višoj koncentraciji u tumorskom tkivu, dok su natrijum i kadmijum bili u značajno nižoj koncentraciji u tumorskom tkivu, u odnosu na zdravu mukozu. Hrom i živa su pokazali značajno niže koncentracije u kolorektalnom tumorskom tkivu, dok nije bilo razlike u koncentracijama mangana, gvožđa, aluminijuma, uranijuma, olova, arsena, kobalta, nikla i kalaja između tumorskog i zdravog tkiva.

Tabela 4.1.1. Karakteristike pacijenata kod kojih je ispitivana koncentracija mikro- i markoelemenata.

Pol	muški	29 (49,2 %)
	ženski	30 (50,8 %)
Starost: $\bar{X} \pm SD$ godina	67 \pm 10	
sredovečni, n (%) (godine)	29 (49,2%) (59 \pm 7)	
stariji, n (%) (godine)	30 (50,8%) (74 \pm 6)	
Tumorska lokalizacija, n (%)	kolon	37 (62,7 %)
	kolorektalni spoj	5 (8,5 %)
	rektum	16 (27,1 %)
	Sinhroni tumor	1 (1,7 %)
Histološki tip	adenokarcinom	59 (100 %)
Stadijum tumora, n (%)	I	15 (25,4 %)
	II	15 (25,4 %)
	III	25 (42,4 %)
	IV	4 (6,8 %)

Tabela 4.1.2. Koncentracije izmerenih mikro- i makroelemenata u tumorskom tkivu i zdravoj mukozi.

Element	Koncentracija u tumorskom tkivu		Koncentracija u zdravoj mukozi		p vrednost
	\bar{X}	SD	\bar{X}	SD	
Na[mg/kg]	1600,11	340,85	1879,77	331,65	<0,0001* ^a
Mg[mg/kg]	144,8112	50,14	107,6	30,29	<0,0001* ^a
K[mg/kg]	2391,64	611,6	1780,2	333,93	<0,0001* ^a
Cu[μ g/kg]	1469,83	581,8	1257,15	370,08	0,011* ^a
Zn[mg/kg]	16,96	3,43	19,22	4,8	<0,0001* ^a
Se[μ g/kg]	165,63	63,9	108,4	39,13	<0,0001* ^a
Ca[mg/kg]	135,23	95,3	87,12	18,87	<0,001* ^b
Mn[μ g/kg]	156,3	119,28	152,11	98,29	0,821 ^b
Fe[mg/kg]	23,33	18,97	22,46	12,76	0,546 ^b
Cd[μ g/kg]	38,57	38,57	73,09	53,45	<0,0001* ^b
Al[μ g/kg]	154,95	328,47	276,01	471,78	0,117 ^a
Pb[μ g/kg]	10,27	14,32	12,5	13,03	0,345 ^a
U[μ g/kg]	0,57	0,24	0,72	0,77	0,118 ^a
As[μ g/kg]	1,36	1,43	1,59	1,74	0,315 ^a
Hg[μ g/kg]	0,78	0,7	2,73	4,35	<0,0001* ^a
Cr[μ g/kg]	7,89	19,74	23,75	43,08	0,013* ^a
Co[μ g/kg]	5,1	19,67	4,3	3,73	0,758 ^a
Ni[μ g/kg]	675,42	4870,47	113,71	430,1	0,382 ^a
Sn[mg/kg]	0,26	0,35	0,44	1,07	0,231 ^a

* Označava statistički značajnu razliku

^a t-test za vezane parove^b Wilcoxon Signed Ranks Test

Razlike u koncentracijama ispitivanih elemenata u tumorskom i zdravom tkivu kod muškaraca i žena su prikazane u tabelama 4.1.3. i 4.1.4. Statistička analiza nije pokazala značajnu razliku koncentracija izmerenih elemenata između tumorskog tkiva i zdrave mukoze unutar polova, osim za kalcijum, koji je bio značajno veći u tumorskom tkivu muškaraca u odnosu na zdravu mukožu. Razlike u koncentracijama ispitivanih elemenata između tumorskog tkiva i zdrave mukoze kod grupe sredovečnih i starijih pacijenata su prikazane u tabelama 4.1.5. i 4.1.6. Takođe, nije bilo statistički značajne razlike u koncentracijama elemenata između malignih tkiva i zdrave mukoze unutar starijih i sredovečnih pacijenata. Odnos Cu/Zn je bio značajno veći u tumorskom tkivu nego u zdravoj mukozi ($p < 0,001$) što je prikazano u tabeli 4.1.7. Ovaj trend statistički značajne razlike odnosa Cu/Zn se pokazao i kod muških pacijenata, kako kod sredovečnih, tako i kod starijih pacijenata. Sa druge strane, među ženskom populacijom pacijenata, kao i kada se poredi ovaj odnos između polova i starosnih grupa, nije bilo statistički značajne razlike u odnosu Cu/Zn (Tabela 4.1.7). Bitno je istaći, da je odnos Cu/Zn bio statistički značajno veći kod pacijenata trećeg i četvrtog stadijuma u odnosu na pacijente sa nižim stadijumima (stadijumi I i II) (Grafikon 4.1.1.). Kada se uzmu svi pacijenti u obzir, odnos Cu/Zn je bio različit između svih stadijuma, ali nije postojala statistički značajna razlika ($p > 0,05$; Grafikon 4.1.2.). Interesantan je rezultat koji je pokazao da se kod pacijentkinja pokazala značajna razlika u Cu/Zn odnosu kada se on poredio između stadijuma kolorektalnog karcinoma, sa najvećom vrednošću u stadijumu IV ($p = 0,02$, One-Way ANOVA, post-hoc analizom je pokazana statistički značajna razlika između stadijuma I i stadijuma IV; Grafikon 4.1.3.). Nije bilo statistički značajne razlike u koncentraciji ni jednog izmerenog elementa u tumorskom tkivu između bilo koje od četiri formirane grupe na osnovu godina i pola (rezultati nisu prikazani). Korelacije koncentracija elemenata u tumorskom tkivu i koncentracije elemenata u zdravom tkivu, kao i između tumorskog i zdravog tkiva su prikazane u tabelama 4.1.8. i 4.1.9. Ni jedan element nije korelirao sa godinama pacijenata.

Tabela 4.1.3. Koncentracije ispitivanih elemenata u tumorskom tkivu i zdravoj mukozi kod muških pacijenata.

Element	Koncentracija u tumorskom tkivu		Koncentracija u zdravoj mukozi		p vrednost
	\bar{X}	SD	\bar{X}	SD	
Na[mg/kg]	1580,41	318,86	1872,16	257,30	<0,0001* ^a
Mg[mg/kg]	150,76	61,00	111,85	34,24	<0,0001* ^a
K[mg/kg]	2419,35	627,85	1848,52	333,93	<0,0001* ^a
Cu[μ g/kg]	1569,92	642,88	1278,96	344,56	0,033* ^a
Zn[mg/kg]	16,68	3,71	20,53	4,98	0,001* ^a
Se[μ g/kg]	175,23	68,57	120,98	43,90	0,001* ^a
Ca[mg/kg]	162,48	123,61	87,84	14,55	0,001* ^a
Mn[μ g/kg]	157,62	115,82	141,72	86,62	0,358 ^a
Fe[mg/kg]	24,24	15,93	22,96	15,93	0,496 ^a
Cd[μ g/kg]	35,40	39,67	77,50	60,42	<0,0001* ^a
Al[μ g/kg]	193,06	388,59	209,28	379,86	0,614 ^a
Pb[μ g/kg]	12,73	16,13	12,58	11,75	0,648 ^a
U[μ g/kg]	0,55	0,17	0,73	0,92	0,465 ^a
As[μ g/kg]	1,15	1,00	1,80	2,34	0,070 ^a
Hg[μ g/kg]	0,90	0,89	2,91	3,38	0,001* ^a
Cr[μ g/kg]	7,23	16,02	24,87	45,36	0,015* ^a
Co[μ g/kg]	2,45	1,49	3,96	2,94	0,003* ^a
Ni[μ g/kg]	43,26	98,32	184,69	604,43	0,144 ^a
Sn[mg/kg]	0,20	0,00	0,51	1,41	0,109 ^a

* Označava statistički značajnu razliku

^a Wilcoxon Signed Ranks Test

Tabela 4.1.4. Koncentracije ispitivanih elemenata u tumorskom tkivu i zdravoj mukozi kod ženskih pacijenata.

Element	Koncentracija u tumorskom tkivu		Koncentracija u zdravoj mukozi		p vrednost
	\bar{X}	SD	\bar{X}	SD	
Na[mg/kg]	1619,15	365,28	1887,14	394,91	<0,0001 ^{*a}
Mg[mg/kg]	139,07	36,97	103,49	25,84	<0,0001 ^{*a}
K[mg/kg]	2364,85	604,97	1714,14	302,97	<0,0001 ^{*a}
Cu[μ g/kg]	1373,09	508,18	1236,07	397,95	0,178 ^a
Zn[mg/kg]	17,23	3,18	17,95	4,32	0,622 ^a
Se[μ g/kg]	156,36	58,70	96,23	29,83	<0,0001 ^{*a}
Ca[mg/kg]	108,91	44,21	86,41	22,50	0,022 ^{*a}
Mn[μ g/kg]	155,03	124,50	162,16	108,91	0,600 ^a
Fe[mg/kg]	22,45	21,75	21,99	15,02	0,943 ^a
Cd[μ g/kg]	41,62	37,89	68,82	46,38	0,001 ^{*a}
Al[μ g/kg]	118,11	259,11	340,50	545,05	0,072 ^a
Pb[μ g/kg]	7,90	12,13	12,43	14,35	0,085 ^a
U[μ g/kg]	0,59	0,29	0,73	0,66	0,138 ^a
As[μ g/kg]	1,54	1,74	1,33	0,83	0,563 ^a
Hg[μ g/kg]	0,65	0,42	2,56	5,17	0,009 ^{*a}
Cr[μ g/kg]	7,49	22,53	22,70	41,58	0,005 ^{*a}
Co[μ g/kg]	7,65	27,53	4,64	4,38	0,758 ^a
Ni[μ g/kg]	1286,51	6829,99	45,10	85,65	0,686 ^a
Sn[mg/kg]	0,33	0,49	0,38	0,59	0,753 ^a

* Označava statistički značajnu razliku

^a Wilcoxon Signed Ranks Test

Tabela 4.1.5. Koncentracije elemenata u tumorskom tkivu i zdravoj mukozi kod ispitanih sredovečnih pacijenata.

Element	Koncentracija u tumorskom tkivu		Koncentracija u zdravoj mukozi		p vrednost
	\bar{X}	SD	\bar{X}	SD	
Na[mg/kg]	1606,15	332,15	1859,33	348,83	0,001* ^a
Mg[mg/kg]	138,25	38,99	103,11	21,59	<0,0001* ^a
K[mg/kg]	2363,06	624,77	1754,03	327,23	<0,0001* ^a
Cu[μ g/kg]	1440,73	660,06	1218,20	331,71	0,004* ^a
Zn[mg/kg]	16,86	3,69	19,47	4,03	0,005* ^a
Se[μ g/kg]	164,13	53,58	104,13	30,28	<0,0001* ^a
Ca[mg/kg]	137,19	113,77	84,96	18,28	0,007* ^a
Mn[μ g/kg]	125,17	41,98	157,30	101,85	0,123 ^a
Fe[mg/kg]	21,30	7,86	20,65	8,27	0,737 ^a
Cd[μ g/kg]	40,38	40,49	71,07	49,72	<0,0001* ^a
Al[μ g/kg]	216,69	408,58	247,36	499,61	0,958 ^a
Pb[μ g/kg]	10,14	13,89	10,54	9,79	0,733 ^a
U[μ g/kg]	0,55	0,23	0,71	0,91	0,465 ^a
As[μ g/kg]	1,33	1,30	1,66	1,80	0,132 ^a
Hg[μ g/kg]	0,83	0,76	3,26	4,42	0,001* ^a
Cr[μ g/kg]	3,86	6,87	26,09	51,50	0,001* ^a
Co[μ g/kg]	7,62	28,03	4,69	4,58	0,033* ^a
Ni[μ g/kg]	1348,26	6943,71	157,07	592,27	0,753 ^a
Sn[mg/kg]	0,32	0,49	0,50	1,41	0,893 ^a

* Označava statistički značajnu razliku

^a Wilcoxon Signed Ranks Test

Tabela 4.1.6. Koncentracije elemenata u tumorskom tkivu i zdravoj mukozi kod ispitivanih starijih pacijenata.

Element	Koncentracija u tumorskom tkivu		Koncentracija u zdravoj mukozi		p vrednost
	\bar{X}	SD	\bar{X}	SD	
Na[mg/kg]	1594,26	354,62	1899,53	318,86	0,001* ^a
Mg[mg/kg]	151,15	58,95	111,94	36,67	<0,0001* ^a
K[mg/kg]	2419,26	607,95	1805,47	343,91	<0,0001* ^a
Cu[μ g/kg]	1497,97	504,63	1294,80	405,83	0,102 ^a
Zn[mg/kg]	17,04	3,21	18,97	5,48	0,141 ^a
Se[μ g/kg]	167,08	73,41	112,51	46,26	0,001* ^a
Ca[mg/kg]	133,34	75,22	89,19	19,48	0,002* ^a
Mn[μ g/kg]	186,38	157,63	147,09	96,18	0,221 ^a
Fe[mg/kg]	25,27	25,53	24,20	15,91	0,221 ^a
Cd[μ g/kg]	36,80	37,21	75,03	57,60	<0,0001* ^a
Al[μ g/kg]	95,26	217,04	303,69	450,03	0,013* ^a
Pb[μ g/kg]	10,39	14,96	14,38	15,46	0,153 ^a
U[μ g/kg]	0,58	0,24	0,72	0,63	0,080 ^a
As[μ g/kg]	1,37	1,57	1,51	1,70	0,390 ^a
Hg[μ g/kg]	0,71	0,63	2,22	4,28	0,004* ^a
Cr[μ g/kg]	11,78	26,48	21,39	33,36	0,041* ^a
Co[μ g/kg]	2,65	1,63	3,92	2,68	0,008* ^a
Ni[μ g/kg]	25,00	0,00	71,78	166,11	0,109 ^a
Sn[mg/kg]	0,20	0,00	0,38	0,59	0,068 ^a

* Označava statistički značajnu razliku

^a Wilcoxon Signed Ranks Test

Tabela 4.1.7. Razlike u odnosu Cu/Zn između tumorskog tkiva i zdrave mukoze.

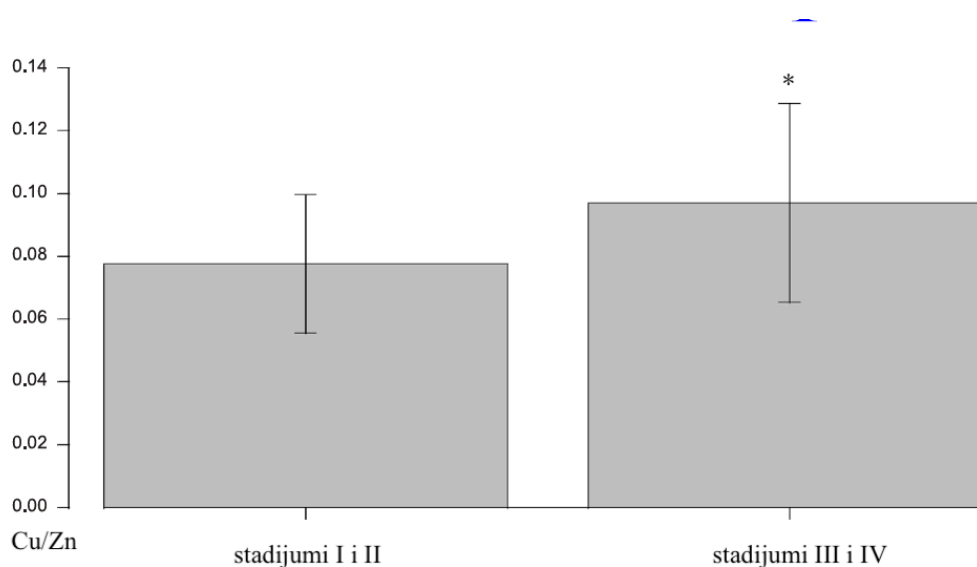
	Cu/Zn odnos [ppb] u tumorskom tkivu ($\bar{X}\pm SD$)	Cu/Zn odnos [ppb] u zdravoj mukozi ($\bar{X}\pm SD$)	p vrednost
svi pacijenti	0,087±0,027	0,069±0,026	<0,001 ^{*a}
muškarci	0,093±0,027	0,065±0,038	<0,001 ^{*a}
žene	0,081±0,029	0,073±0,031	0,158 ^a
sredovečni pacijenti	0,086±0,031	0,064±0,020	0,003 ^{*b}
stariji pacijenti	0,089±0,026	0,073±0,031	0,017 ^a

^bWilcoxon Signed Rank Test

^{*}označava statistički značajnu razliku

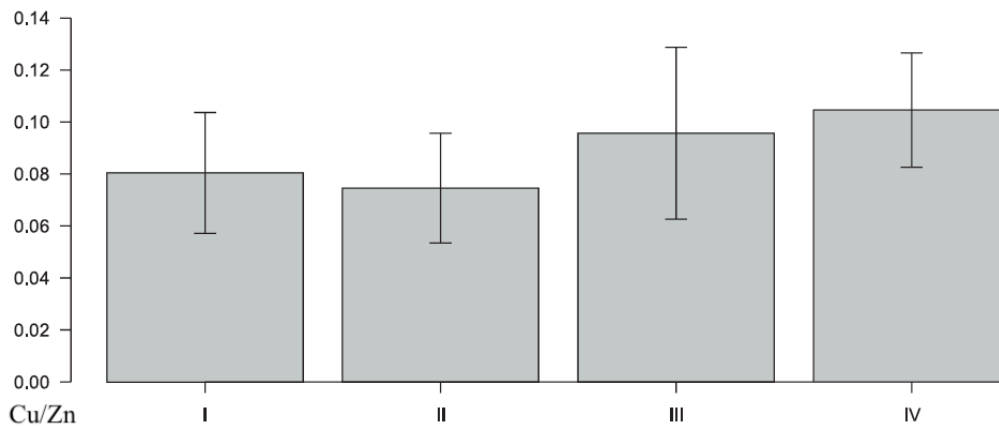
^at-test za vezane parove

Grafikon 4.1.1. Razlika u odnosu Cu/Zn između nižih (stadijum I i II) i viših (stadijuma III i IV) stadijuma kolorektalnog karcinoma.



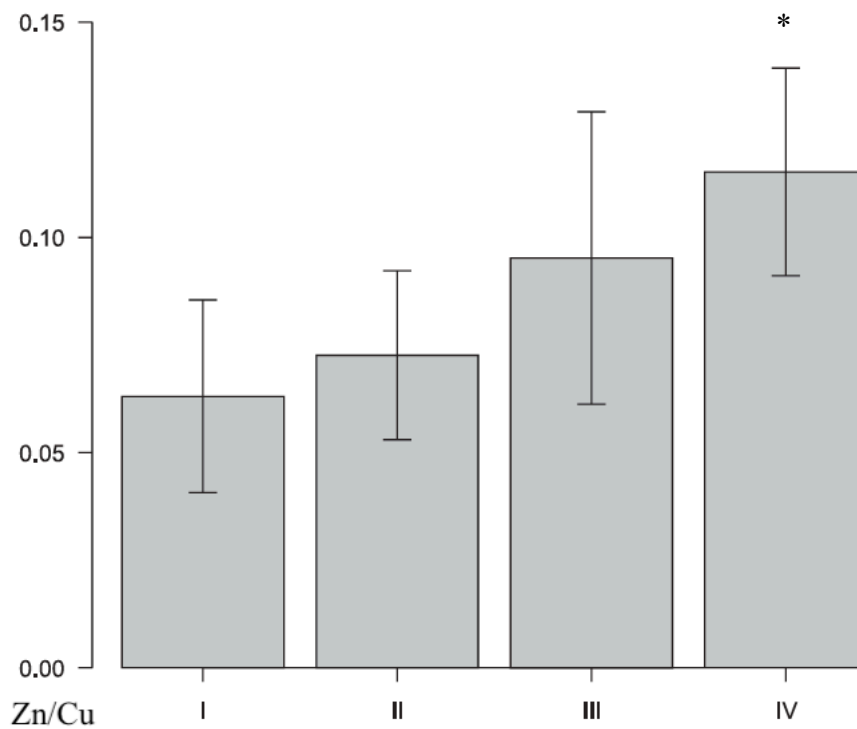
^{*}označava statistički značajnu razliku, $p < 0,01$.

Grafikon 4.1.2. Razlika u odnosu Cu/Zn između stadijuma kolorektalnog karcinoma.



* $p=0,065$ (One-Way ANOVA), post-hoc analizom nije pokazana statistički značajna razlika između grupa.

Grafikon 4.1.3. Cu/Zn odnos kroz stadijume I-IV kod pacijentkinja.



* $p=0,02$ (One-Way ANOVA), post-hoc analizom je pokazana statistički značajna razlika između stadijuma I i stadijuma IV

Tabela 4.1.8. Značajne korelacije* elemenata unutar tumorskog tkiva I zdrave mukoze kod svih ispitivanih pacijenata.

Unutar tumorskog tkiva		Unutar zdrave mukoze	
Element	Koeficijent korelacije	element	Koeficijent korelacije
		Ca-Cr	0,444
		Ca-Cu	0,406
		Ca-Fe	0,388
		Ca-Mg	0,332
		Ca-Mn	0,257 ^a
		Co-Cr	0,437
		Co-Fe	0,279 ^a
		Cr-Fe	0,410
		Cr-Na	-0,291 ^a
Cu-K	0,468	Cu-K	-0,285 ^a
Cu-Mg	0,672	Cu-Mg	0,478
		Cu-Mn	0,449
Cu-Na	-0,279 ^a		
Cu-Se	0,285 ^a	Cu-Se	0,495
Cu-Zn	0,377 ^a		
K-Mg	0,745	K-Mg	0,600
K-Na	-0,743		
K-Se	0,581	K-Se	0,433
K-Zn	0,432	K-Zn	0,800
		Mg-Mn	0,275 ^a
Mg-Se	0,351	Mg-Se	0,427
Mg-Zn	0,390	Mg-Zn	0,360
Na-Se	-0,437		
		Mn-Zn	-0,316
Se-Zn	0,292 ^a	Se-Zn	0,353
		As-Cu	-0,300 ^a
		As-Fe	0,273 ^a
		As-Mn	-0,419
As-K	-0,300		
Cd-K	-0,290 ^a		
Cd-Mg	-0,307		
Cd-Na	0,275 ^a		
Cd-Se	-0,337		
		Hg-Se	0,293 ^a
As-Cd	0,329 ^a		
As-Hg	0,400 ^a		

* značajnost korelacije na nivou $p < 0,01$, ukoliko nije naglašeno drugačije; Spearman korelacija.

^a značajnost korelacije na nivou $p < 0,05$; Spearman korelacija.

Tabela 4.1.9. Korelacije* elemenata između tumorskog tkiva i zdrave mukoze.

		Koncentracije elemenata u zdravom tkivu													
		Al	As	Ca	Cd	Cr	Cu	Fe	Hg	K	Mg	Mn	Na	Pb	Se
Koncentracije elemenata u tumorskom tkivu	Al														
	As		0,26												
	Ca			-0,28											-0,27
	Cd				0,46 ^a			0,29							
	Cr							0,28							
	Cu	0,28		0,27											
	Fe	-0,29	-0,31									0,31			
	Hg								0,59 ^a						
	K														
	Mn														
	Na						-0,3 ^a						0,33		
	Pb		-0,26												
	Se										0,28				0,32
	Zn				0,30										0,31

* Korelacije su značajne na nivou $p < 0,05$, ukoliko nije drugačije naznačeno; Spearmanova korelacija,

^a Korelacije su značajne na nivou $p < 0,01$; Spearmanova korelacija.

4.2. Parametri oksidativnog stresa u krvi, tumorskom tkivu kolona/rektuma i zdravoj mukozi

Parametri oksidativnog stresa su ispitivani kod 41 pacijenta, od kojih je 20 (49%) muškaraca i 21 (51%) žena. Prosečna starost pacijenata je bila $65,2 (\pm 10,45)$ godine, najmlađi je imao 40 godina, a najstariji 83. Ispitanici su podeljeni u dve starosne grupe: sredovečni (≤ 65 godina) i stariji (> 65 godina); sredovečnih je bilo 21 (51%), prosečne starosti $57,24 \pm 7,42$; a starijih 20 (49%), prosečne starosti $73,55 \pm 5,35$ godine. U odnosu na godine i pol, pacijenti su svrstani u četiri grupe: stariji muškarci 9 (22%), prosečne starosti $73,22 \pm 5,00$ godine; sredovečni muškarci 11 (27%), prosečne starosti $58,00 \pm 7,00$ godine; starije žene 11 (27%), prosečne starosti $73,82 \pm 5,86$ godine; i sredovečne žene 10 (24%), prosečne starosti $56,40 \pm 8,12$ godine. Histološki tip kolorektalnog karcinoma kod svih pacijenata je bio adenokarcinom, a većina su bili gradusa II (76%). Petnaest (37%) pacijenata je imalo karcinom desnog kolona, 14 (34%) levog kolona, 11 (27%) rektuma/analnog kanala i jedan (2%) pacijent je imao sinhrono tumore kolona. Uzimajući u obzir modifikovanu Astler-Coller skalu, bilo je 5 (12%) pacijenata sa stadijumom A, 19 (46%) sa stadijumom B, 13 (32%) sa stadijumom C i 4 (10%) sa stadijumom D. Prema AJCC skali bilo je 10 (24%) pacijenata sa stadijumom I, 14 (34%) sa stadijumom II, 13 (32%) sa stadijumom III i 4 (10%) pacijenta sa stadijumom IV. Karakteristike pacijenata kod kojih su ispitivani parametri oksidativnog stresa su prikazani u tabeli 4.2.1.

Tabela 4.2.1. Karakteristike ispitivanih pacijenata (parametri oksidativnog stresa).

Pol		
muškarci		20 pacijenata (49%)
žene		21 pacijentkinja (51%)
Godine starosti		
	broj (procenat)	$\bar{X} \pm SD$ (p vrednost)
Studijska grupa	41 (100%)	65,2 ± 10,45
Sredovečni pacijenti	21 (51%)	57,24 ± 7,42(0,00) ^{Aφ}
Stariji pacijenti	20 (49%)	73,55 ± 5,35(0,00) ^{Bφ}
Sredovečni muškarci	11 (27%)	58 ± 7 (0,00) ^{A¶}
Stariji muškarci	9 (22%)	73,22 ± 5(0,00) ^{B¶}
Sredovečne žene	10 (24%)	56,4 ± 8,12 (0,00) ^{A¶}
Starije žene	11 (27 %)	73,82 ± 5,86 (0,00) ^{B¶}
Histološki gradus		
Gradus I		7 (17,1%)
Gradus II		31 (75,6%)
Gradus III		3 (7,3%)
T stadijum		
T1		4 (9,8%)
T2		8 (19,5%)
T3a		7 (17,1%)
T3b		15 (36,6%)
T3c		6 (14,6%)
T4		1 (2,4%)
Lokalizacija tumora		
Desni kolon		15 (36,6%)
Levi kolon		14 (34,1%)
Rektum i analni kanal		11 (26,8%)
Sinhroni tumor		1 (2,4%)
Modifikovana Astler-Coller skala		
A		5 (12,2%)
B		19 (46,3%)
C		13 (31,7%)
D		4 (9,8%)
AJCC stadijumi		
I		10(24,4%)
II		14(34,1%)
III		13 (31,7%)
IV		4 (9,8%)

^φ T test za nezavisne uzorke; [¶] One Way ANOVA; Različita slova u superskriptu označavaju statistički značajnu razliku između grupa.

Iz seruma venske krvi svih pacijenata sa dijagnozom KRK je izmeren nivo mokraćne kiseline. Nivo se kretao od 117 $\mu\text{mol/l}$ do 602 $\mu\text{mol/l}$, dok je prosečna vrednost bila 336,8 \pm 117,7 $\mu\text{mol/l}$. Prosečna vrednost kod muškaraca je bila 410,1 \pm 109,9 $\mu\text{mol/l}$, a kod žena 267,0 \pm 75,9 $\mu\text{mol/l}$. Rezultati su prikazani u tabeli 4.2.2. Rezultati nisu pokazali statistički značajne razlike između pacijenata sa različitim stadijumom tumora (uključujući i modifikovanu Astler-Coller i AJCC skalu), takođe ni zasebni T, N i M stadijum nisu uticali na nivo mokraćne kiseline u krvi, kao ni drugi ispitivani patohistološki parametri, kao što su prisustvo tumor badinga (izolovane pojedinačne ćelije karcinoma ili grupe do četiri ćelije, koje se nalaze duž linije invazije tumora), tumorskih depozita (tumorsko tkivo u perikoličnom/perirektalnom masnom tkivu koje je potpuno odvojeno od glavne tumorske mase, ne pokazuje rezidualno tkivo limfnog čvora, ali se nalazi u slivu limfne drenaže primarnog karcinoma), peritumorski limfocitni odgovor, intratumorski limfocitni odgovor, venska invazija, perineuralna invazija, limfo-vaskularna invazija, nisu pokazali uticaj na nivo mokraćne kiseline u serumu. Nije bilo statistički značajne povezanosti između mokraćne kiseline i ispitivanih parametara oksidativnog i nitrozativnog stresa (MDA, katalaza, NO). Poređenjem dužine telomera u leukocitima periferne krvi i nivoa mokraćne kiseline u serumu pokazana je pozitivna korelacija ($p=0,037$, Pearsonov koeficijent korelacije +0,331), dok nije bilo značajne povezanosti sa vrednostima dužine telomera u tumorskom tkivu i zdravoj mukozi. Rezultati nisu prikazani.

Tabela 4.2.2. Vrednosti mokraćne kiseline u serumu venske krvi pacijenata (oksidativni stres).

pol		$\bar{X}\pm\text{SD}$ (p vrednost)
muškarci		410,1 \pm 109,9 $\mu\text{mol/l}$ (0,00) ^{AΦ}
žene		267,0 \pm 75,9 $\mu\text{mol/l}$ (0,00) ^{BΦ}
Godine starosti		
	broj (procenat)	$\bar{X}\pm\text{SD}$ (p vrednost)
Studijska grupa	41 (100%)	336,8 \pm 117,7 $\mu\text{mol/l}$ $\mu\text{mol/l}$
Sredovečni pacijenti	21 (51%)	341,1 \pm 122,3 $\mu\text{mol/l}$
Stariji pacijenti	20 (49%)	332,2 \pm 115,8 $\mu\text{mol/l}$
Sredovečni muškarci	11 (27%)	417,1 \pm 102,8 $\mu\text{mol/l}$ (0,00) ^{AΨ}
Stariji muškarci	9 (22%)	401,6 \pm 123,8 $\mu\text{mol/l}$ (0,00) ^{AΨ}
Sredovečne žene	10 (24%)	257,6 \pm 81,6 $\mu\text{mol/l}$ (0,00) ^{BΨ}
Starije žene	11 (27%)	275,5 \pm 73,1 $\mu\text{mol/l}$ (0,00) ^{BΨ}

^{Φ} T test za nezavisne uzorke; ^{Ψ} One Way ANOVA; Različita slova u superskriptu označavaju statistički značajnu razliku između grupa.

Prvo su svi uzorci tumorskog tkiva i zdrave mukoze analizirani direktno i merena je koncentracija malondialdehida (MDA, nmol/g), koncentracija azot monoksida (pg/ml) i aktivnost katalaze (U/g tkiva). Potom je u svim uzorcima izmerena koncentracija proteina po Lowry-ju (Tabela 4.2.3.) i na osnovu tih rezultata je izračunata relativna koncentracija MDA i NO, kao i relativna aktivnost katalaze. Statističkom analizom (t test za vezane parove i Wilcoxon signed rank test) nađena je statistički značajna razlika u koncentraciji MDA (tumorska tkiva su pokazala značajno veće koncentracije u odnosu na zdravu mukoze), kako u direktno izmerenim koncentracijama ($p=0,016$), tako i u izračunatim, relativnim koncentracijama ($p=0,000$). Nije bilo statistički značajne razlike između tumorskog tkiva i zdrave mukoze, u koncentracijama NO, kao ni u aktivnosti katalaze, niti u direktno izmerenim vrednostima, ni u relativno izračunatim koncentracijama. Rezultati su prikazani u tabelama 4.2.4. i 4.2.5.

Tabela 4.2.3. Koncentracija proteina po Lowry-ju.

n=41	Min	Max	\bar{X}	SD	p vrednost
Tumorsko tkivo ($\mu\text{g/ml}$)	314,01	2064,27	783,87 ^φ	426,37	0,749
Zdrava mukoza ($\mu\text{g/ml}$)	182,88	1798,88	810,93 ^φ	421,29	0,749

^φ T test za vezane uzorke; n - broj ispitanika.

Tabela 4.2.4. Direktne koncentracije MDA, NO i aktivnost katalaze u tumorskom tkivu i zdravoj mukozii.

Direktna koncentracija/aktivnost			
	Tumorsko tkivo	Zdrava mukoza	
	$\bar{X}\pm\text{SD}$	$\bar{X}\pm\text{SD}$	p vrednost
MDA (nmol/g)	25,66 ± 22,34 [¶]	15,22 ± 10,24 [¶]	0,016
Katalaza (U/g)	86,12 ± 42,96 ^φ	76,96 ± 38,33 ^φ	0,289
NO (pg/ml)	3523,65 ± 2636,06 ^φ	5,04 ± 3,11 ^φ	0,240

^φ T test za vezane uzorke; [¶]Wilcoxon signed rank test.

Tabela 4.2.5. Relativne koncentracije MDA, NO i aktivnost katalaze u tumorskom tkivu i zdravoj mukozii.

Relativna koncentracija/aktivnost			
	Tumorsko tkivo	Zdrava mukoza	
	$\bar{X}\pm\text{SD}$ (p vrednost)	$\bar{X}\pm\text{SD}$ (p vrednost)	p vrednost
MDA (nmol/g)	0,034 ± 0,022 ^{φA}	0,020 ± 0,010 ^{φB}	0,000
Katalaza (U/g)	0,133 ± 0,08 ^{φA}	0,121 ± 0,103 ^{φA}	0,498
NO (pg/ml)	5,04 ± 3,11 ^{φA}	4,49 ± 2,38 ^{φA}	0,326

^φ T test za vezane uzorke; Različita slova u superskriptu označavaju statistički značajnu razliku između grupa.

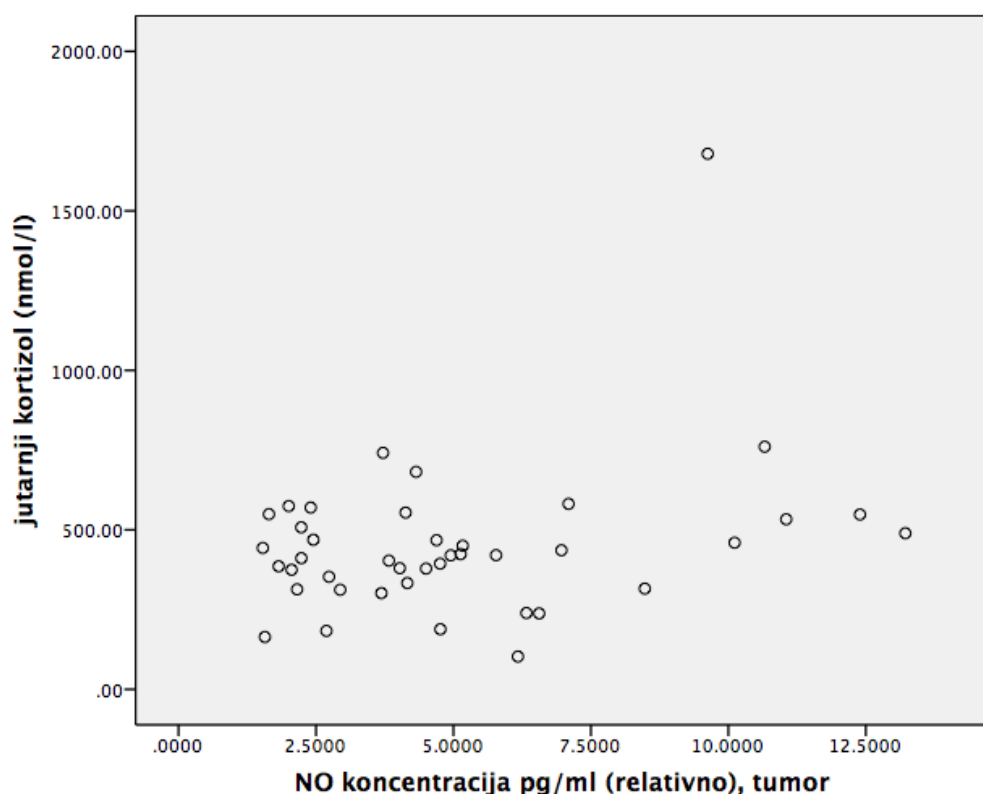
Pearson-ovim testom pokazana je pozitivna korelacija između godina starosti i aktivnosti katalaze u tumorskom tkivu izmerenom direktnom metodom ($p=0,025$, koeficijent korelacije $+0,342$), kao i pozitivna korelacija između godina starosti i direktne koncentracije NO u zdravom tkivu ($p=0,008$, koeficijent korelacije $+0,409$).

Tumorsko tkivo pacijentkinja je imalo značajno veću relativnu koncentraciju NO ($p=0,038$), kao i značajno veću koncentraciju katalaze ($p=0,03$); dok je tumorsko tkivo muških pacijenata imalo veću koncentraciju MDA izmerenu direktnom analizom ($p=0,01$). Rezultati nisu prikazani.

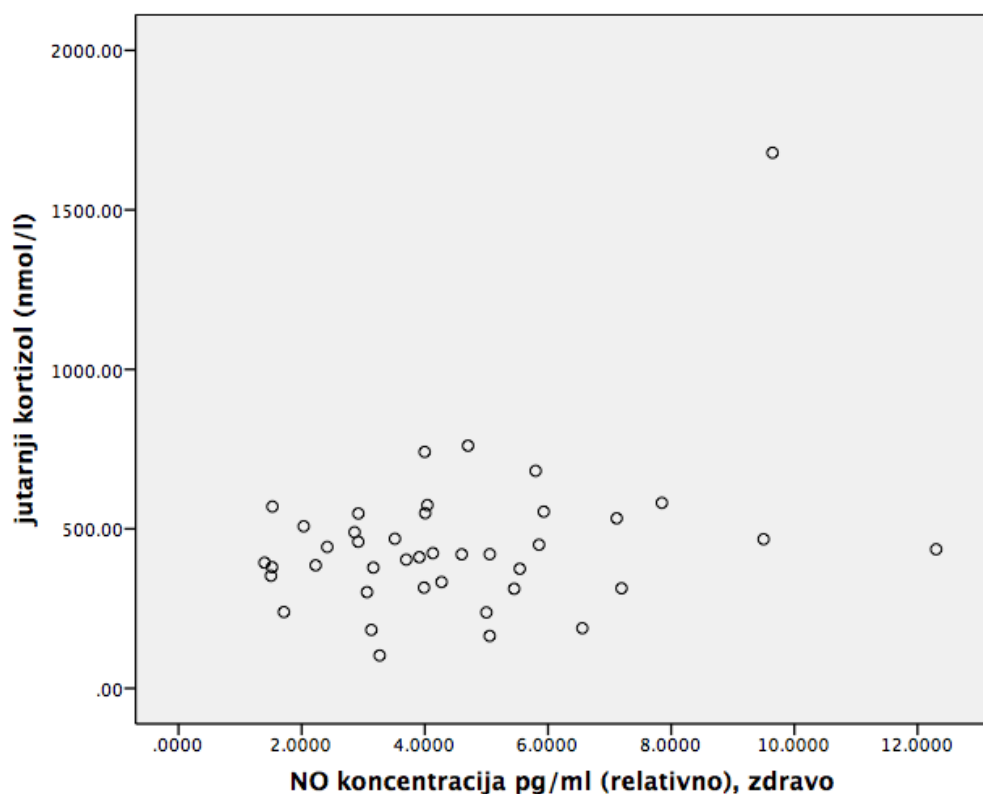
Upoređivanjem grupa sredovečnih pacijenata sa starijima, rezultati su pokazali značajno veću direktnu koncentraciju NO u zdravom tkivu kod starijih pacijenata ($p=0,029$), dok su sredovečni pacijenti imali značajno veću relativnu koncentraciju MDA u zdravom tkivu u odnosu na stariju grupu pacijenata ($p=0,026$). Rezultati nisu prikazani.

Podelom pacijenata na četiri grupe u odnosu na pol i godine starosti nađena je značajna razlika u relativnoj aktivnosti katalaze u tumorskom tkivu ($p=0,046$) i to između sredovečnih žena koje su pokazale veću aktivnost katalaze u odnosu na sredovečne muškarce, dok između ostalih grupa nije bilo značajne razlike. Vrednosti relativno izmerene aktivnosti katalaze su iznosile: 0,86 U/g kod sredovečnih muškaraca, 0,126 U/g kod starijih muškaraca, 0,188 U/g kod sredovečnih žena, 0,136 U/g kod starijih žena. Stariji muškarci imali značajno veću koncentraciju proteina po Lowry-ju ($p=0,01$) u odnosu na sredovečne žene, dok između drugih grupa nije bilo značajne razlike. Vrednosti koncentracija proteina po Lowry-ju iznosile su: 867,43 $\mu\text{g/ml}$ kod sredovečnih muškaraca, 1108,627 $\mu\text{g/ml}$ kod starijih muškaraca, 505,779 $\mu\text{g/ml}$ kod sredovečnih žena, 687,385 $\mu\text{g/ml}$ kod starijih žena. Nađena je i značajna razlika u koncentraciji MDA merenoj kako direktnom analizom ($p=0,004$) tako i u relativnoj koncentraciji ($p=0,003$), ali u zdravom tkivu. Što se tiče direktne koncentracije MDA, sredovečne žene su imale veću koncentraciju u odnosu na sve tri ostale grupe pacijenata. A kada je o relativnoj koncentraciji MDA u zdravom tkivu reč, takođe su sredovečne žene imale veću koncentraciju u odnosu na sve ostale grupe pacijenata. Rezultati nisu prikazani.

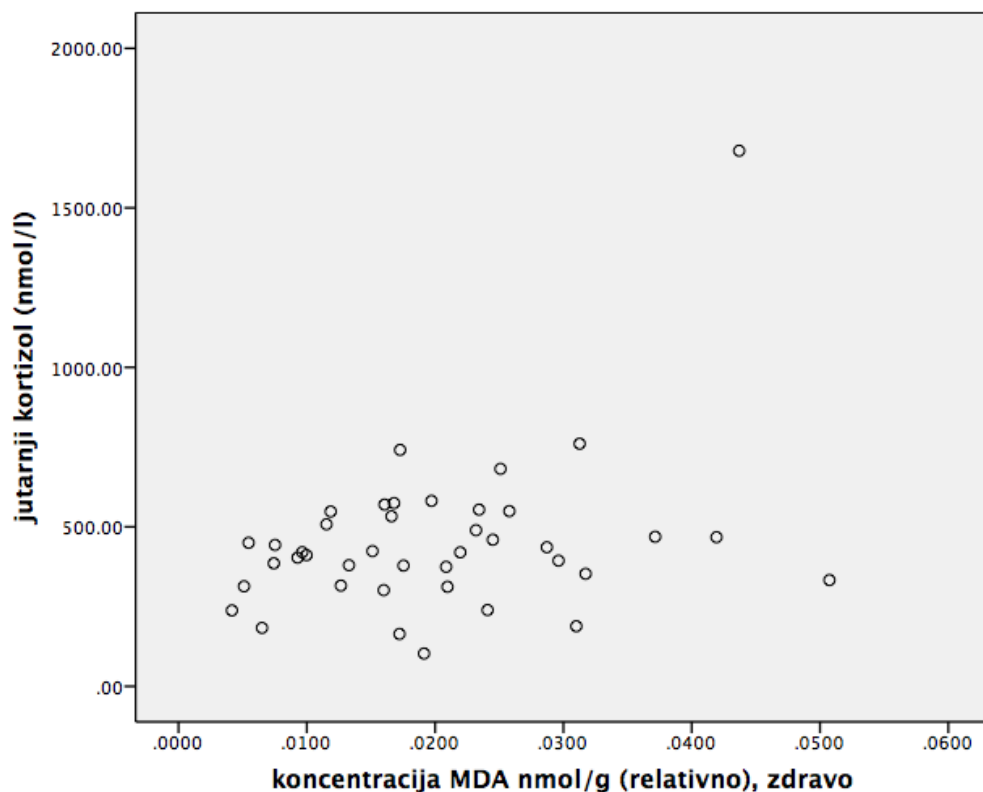
Poredeći nivoe hormona stresa kortizola u serumu sa koncentracijama MDA, katalaze i NO u tkivnim uzorcima, dobijena je statistički značajna pozitivna korelacija sa relativnim koncentracijama NO i u tumorskom ($p=0,047$, Pearson-ov koeficijent korelacije +0,312) i u zdravom tkivu ($p=0,034$, Pearson-ov koeficijent korelacije +0,332) (Grafikoni 4.2.1. i 4.2.2.); dok je značajna korelacija nađena i između kortizola i relativne koncentracije MDA u zdravom tkivu ($p=0,024$, Pearson-ov koeficijent korelacije +0,349) (Grafikon 4.2.3).



Grafikon 4.2.1. Korelacija kortizola i relativno izmerene koncentracije NO u tumorskom tkivu.
* $p=0,047$, Pearson-ov koeficijent korelacije +0,312.



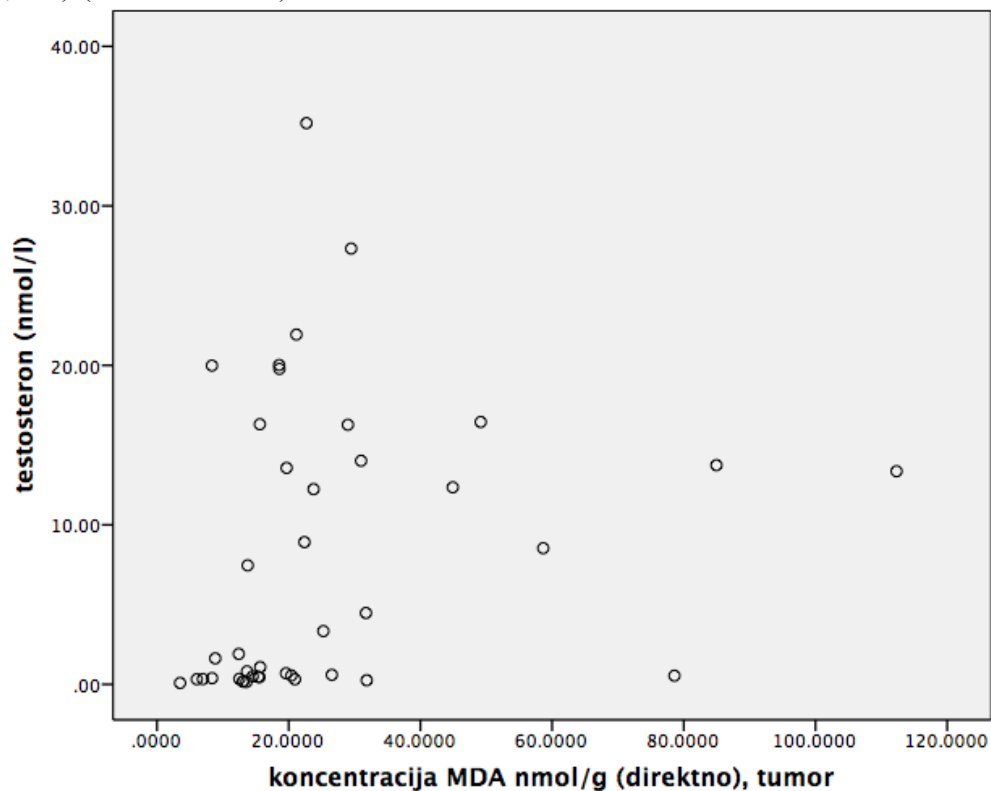
Grafikon 4.2.2. Korelacija kortizola i relativno izmerene koncentracije NO u zdravoj mukozi.
 * $p=0,034$, Pearson-ov koeficijent korelacije $+0,332$.



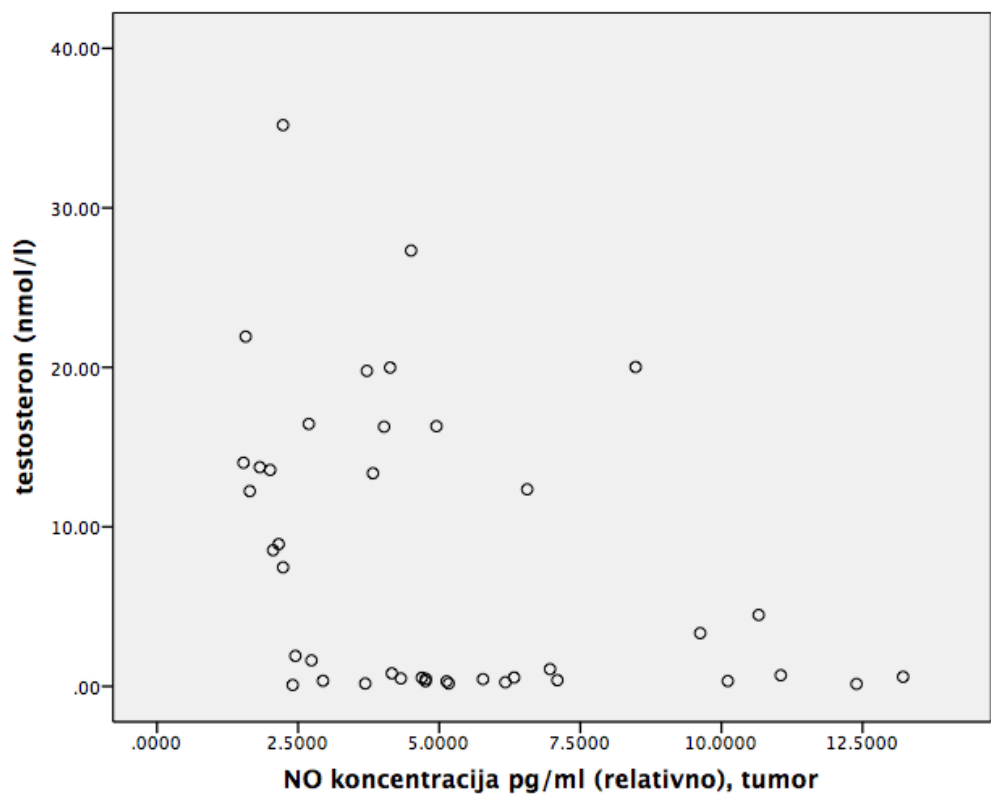
Grafikon 4.2.3. Korelacija kortizola i relativno izmerene koncentracije MDA u zdravoj mukozi.
 * $p=0,024$, Pearson-ov koeficijent korelacije $+0,349$.

Prilikom poređenja serumskih nivoa polnih hormona testosterona i estradiola i tkivnih koncentracija parametara oksidativnog i nitroaktivnog stresa, pokazana je statistički značajna korelacija jedino između testosterona i direktno izmerene koncentracije MDA u tumorskom tkivu

($p=0,002$, Spearman-ov koeficijent korelacije $+0,469$) (Grafikon 4.2.4.) i između testosterona i relativne koncentracije NO u tumorskim tkivima ($p=0,008$, Spearman-ov koeficijent korelacije $-0,409$) (Grafikon 4.2.5).

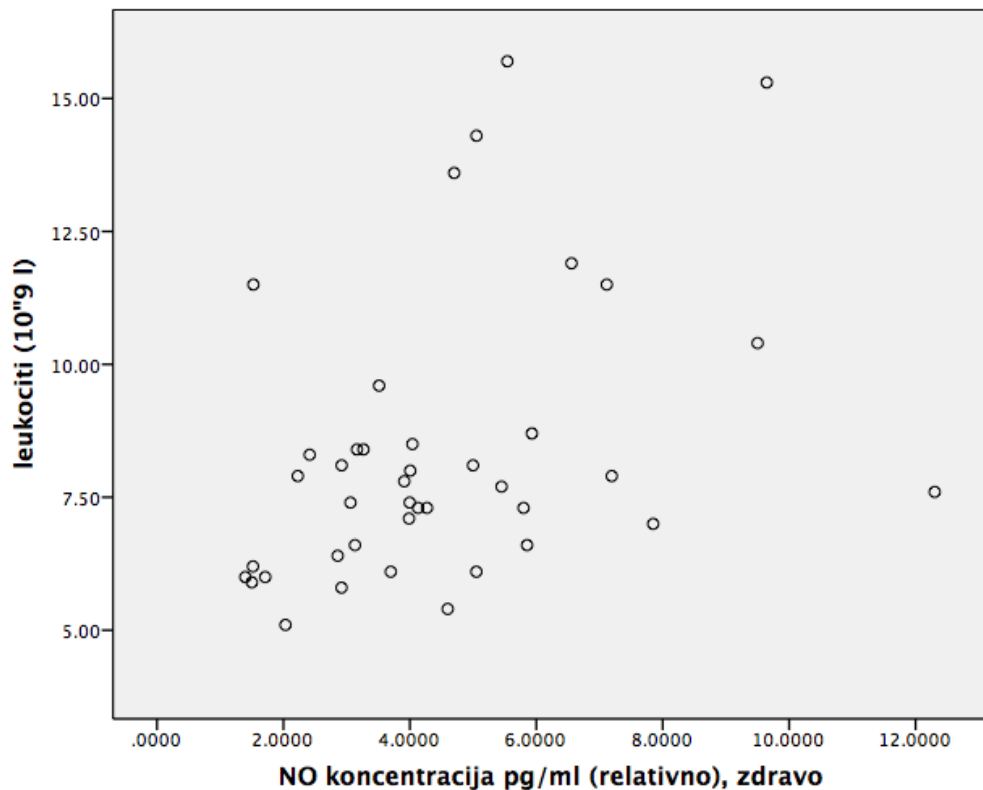


Grafikon 4.2.4. Korelacija testosterona i direktno izmerene koncentracije MDA u tumorskom tkivu.
* $p=0,002$, Spearman-ov koeficijent korelacije $+0,469$.

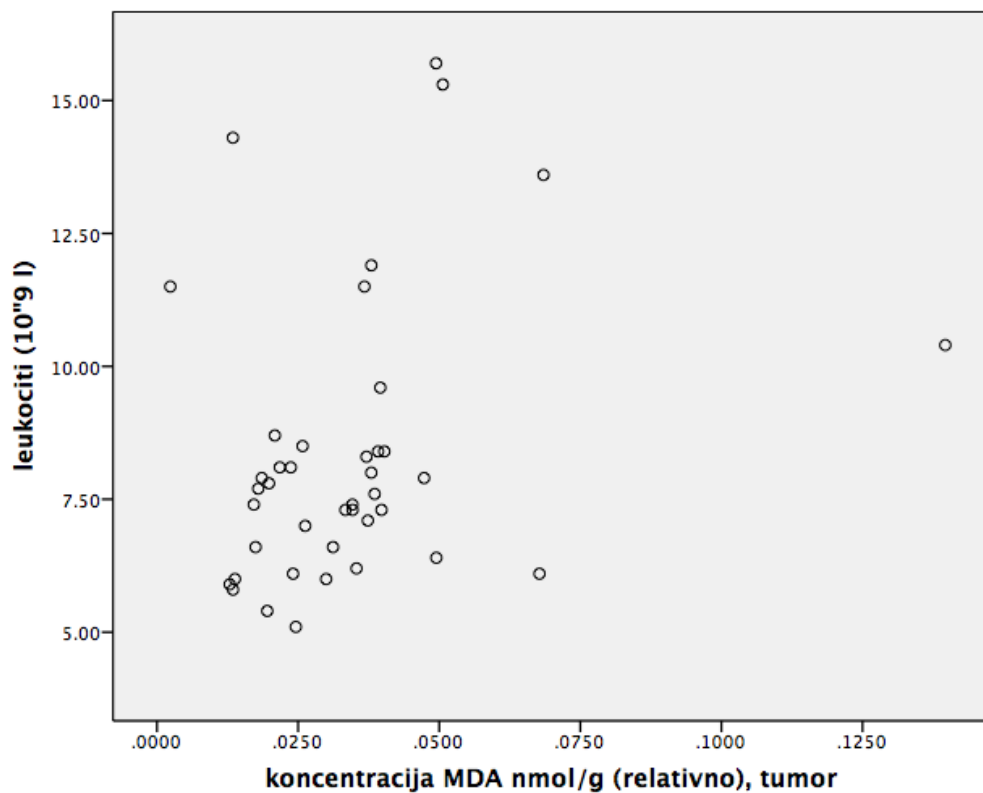


Grafikon 4.2.5. Korelacija testosterona i relativno izmerene koncentracije NO u tumorskom tkivu.
* $p=0,008$, Spearman-ov koeficijent korelacije $-0,409$.

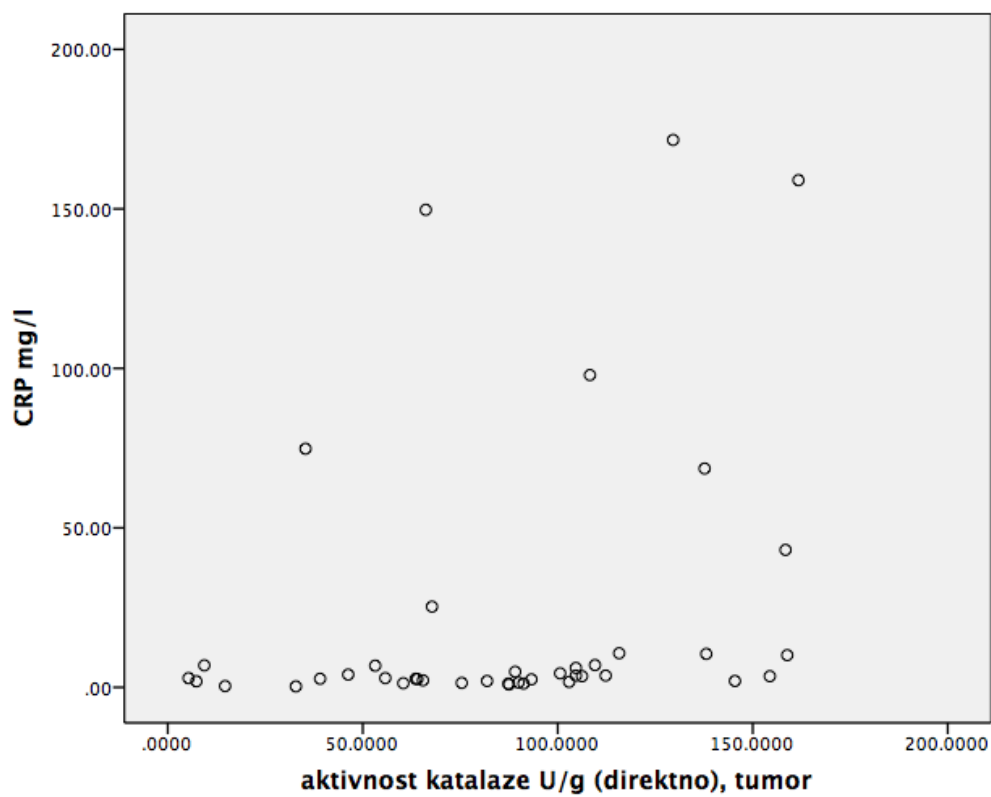
Poredeći laboratorijske parametre inflamacije, nivo leukocita periferne krvi (Le) i C reaktivni protein (CRP), dobijeni su sledeći rezultati: statistički značajne korelacije Le sa relativnim koncentracijama NO u zdravom tkivu ($p=0,005$, Spearman-ov koeficijent korelacije $+0,430$) (Grafikon 4.2.6.), Le i relativne koncentracije MDA u tumorskom tkivu ($p=0,038$, Spearman-ov koeficijent korelacije $+0,325$) (Grafikon 4.2.7.), CRPa sa direktno izmerenom aktivnošću katalaze u tumorskom tkivu ($p=0,007$, Spearman-ov koeficijent korelacije $+0,414$) (Grafikon 4.2.8.).



Grafikon 4.2.6. Korelacija leukocita i relativno izmerene koncentracije NO u zdravoj mukozii.
* $p=0,005$, Spearman-ov koeficijent korelacije $+0,430$.



Grafikon 4.2.7. Korelacija leukocita i relativno izmerene koncentracije MDA u tumorskom tkivu.
 * $p=0,038$, Spearman-ov koeficijent korelacije $+0,325$.



Grafikon 4.2.8. Korelacija CRP-a i direktno izmerene koncentracije katalaze u tumorskom tkivu.
 * $p=0,007$, Spearman-ov koeficijent korelacije $+0,414$.

Rezultati našeg istraživanja pokazuju da lokalizacija tumora, njegova konfiguracija, površina, kao i histološki gradus tumora ne utiču na vrednosti MDA, katalaze i NO u tkivnim uzorcima. Rezultati nisu prikazani.

Jednosmernom ANOVA analizom i post hoc analizom pokazana je značajna razlika između intratumorskog limfocitnog odgovora i relativne koncentracije NO u tumoru ($p=0,002$), i to između grupe sa izraženim i grupe sa umerenim intratumorskim limfocitnim odgovorom, gde je grupa sa izraženim odgovorom imala značajno veće koncentracije NO. Između ostalih ispitivanih parametara i intratumorskog limfocitnog odgovora, kao i između peritumorskog limfocitnog odgovora i ispitivanih parametara oksidativnog i nitrozativnog stresa, nije nađena statistički značajna razlika. Rezultati nisu prikazani.

Poređenjem brojnih patohistoloških parametara (mucinozna komponenta, prisustvo limfo-vaskularne invazije, venske invazije, perineuralne invazije, prisustvo tumorskih depozita, tumor badinga, način rasta tumora prema okolini) i parametara oksidativnog i nitrozativnog stresa nije nađena statistički značajna korelacija. Rezultati nisu prikazani.

Ispitivanjem našeg studijskog uzorka, T, N i M stadijumi tumora nisu pokazali uticaj na neki od ispitivanih parametara (MDA, katalaza i NO); takođe ni gradusi modifikovane Astler-Coller skale nisu pokazali značajnu razliku u koncentracijama MDA; katalaze i NO. Nije bilo statistički značajne razlike ni između stadijuma tumora određenih prema TNM AJCC klasifikaciji (rezultati nisu prikazani).

Poređenjem parametara oksidativnog stresa (MDA, katalaza i NO) sa relativnim dužinama telomera u perifernim leukocitima pacijenata, tumorskog tkiva i zdrave mukoze, jedina značajna korelacija postojala je između telomera zdrave mukoze koncentracije NO merene direktnom metodom ($p=0,006$, Pearsonov koeficijent korelacije $+0,420$). Između ostalih parametara nije uočena statistički značajne povezanost.

4.3. Koncentracija masnih kiselina u tumorskom tkivu kolona/rektuma i zdravoj mukozi.

Koncentracija masnih kiselina je analizirana kod 52 pacijenta. Dvadeset sedam pacijenata (52%) su bili muškarci i 25 (48%) su bile žene, sa prosečnom starošću od $65,79 \pm 9,95$ godina. U odnosu na godine starosti, svi pacijenti su podeljeni u dve grupe: sredovečni pacijenti (≤ 65 godina) i stariji pacijenti (>65 godina). Uzimajući u obzir godine starosti i pol pacijenata, podeljeni su pacijente u četiri grupe: sredovečne muškarce ($59,21 \pm 6,67$), starije muškarce ($73,08 \pm 6,22$), sredovečne žene ($58,43 \pm 7,61$) i starije žene ($74,91 \pm 5,28$). Kod svih ispitanika se radilo o kolorektalnom adenokarcinomu. Karakteristike ispitivanih pacijenata su prikazane u tabeli 4.3.1.

Tabela 4.3.1. Karakteristike ispitivanih pacijenata (masne kiseline).

Pol			
muškarci	27 pacijenata (52%)		
žene	25 pacijentkinja (48%)		
Godine starosti			
	broj (procenat)	$\bar{X} \pm SD$	p vrednost
Studijska grupa	52 (100%)	65,79 ± 9,95	
Sredovečni pacijenti	28 (53,8%)	58,82 ± 7,03 ^{Aφ}	0,000
Stariji pacijenti	24 (46,2%)	73,92 ± 5,76 ^{Bφ}	
Sredovečni muškarci	14 (26,9%)	59,21 ± 6,67 ^{A¶}	0,000
Stariji muškarci	13 (25%)	73,08 ± 6,22 ^{B¶}	
Sredovečne žene	14 (26,9%)	58,43 ± 7,61 ^{A¶}	
Starije žene	11 (21,2%)	74,91 ± 5,28 ^{B¶}	
T stadijum			
T1	4 (7,7%)		
T2	11 (21,2%)		
T3a	7 (13,5%)		
T3b	21 (40,4%)		
T3c	8 (15,4%)		
T4	1 (1,9%)		
Lokalizacija tumora			
Desni kolon	18 (34,6%)		
Levi kolon	17 (32,7%)		
Rektum i analni kanal	17 (32,7%)		

^φ T test za nezavisne uzorke; [¶] One Way ANOVA; Različita slova u superskriptu označavaju statistički značajnu razliku između grupa.

U sklopu rutinske preoperativne pripreme pacijenata iz krvnih uzoraka je određivana i koncentracija holesterola, triglicerida, HDL i LDL holesterola u serumu. Rezultati su prikazani u tabeli 4.3.2.

Tabela 4.3.2. Koncentracije holesterola, triglicerida, HDL i LDL holesterola u serumu.

Serumski lipidi	Serumske vrednosti ($\bar{X}\pm SD$)				p vrednost
	Sredovečni muškarci	Stariji muškarci	Sredovečne žene	Starije žene	
holesterol (mmol/l)	4,6469±1,1522 ^{AB}	3,9250±1,0418 ^A	5,1000±1,5389 ^B	4,9424±1,0677 ^B	0,001 [¶]
trigliceridi (mmol/l)	1,5125±0,7682 ^A	1,1778±0,4043 ^A	2,2600±1,4456 ^B	1,4939±0,6368 ^A	0,004 [§]
HDL (mmol/l)	1,0491±0,2376	1,0178±0,2871	1,0460±0,3178	1,1864±0,3561	>0,05 [¶]
LDL (mmol/l)	2,9188±1,0275 ^{AB}	2,3806±0,8611 ^A	2,8300±1,3211 ^{AB}	3,0848±0,9595 ^B	0,032 [¶]

P vrednosti se odnose na poređenja između četiri grupe formirane na osnovu pola i godina starosti za svaki mereni parameter zasebno ([§] Kruskal Wallis H; [¶] One Way ANOVA). Različita slova u superskriptu označavaju statistički značajnu razliku između grupa.

Koncentracije masnih kiselina u tumorskom tkivu i zdravoj mukozi su pokazane u tabeli 4.3.3. 18 0, 18 1 n7, 20 3, 20 4, 22 4, 22 5, 22 6, SFA, PUFA, n6, n3 i AA/EPA su bile prisutne u značajno većoj koncentraciji u tumorskom tkivu ($p=0,000$) u odnosu na zdravu mukozi. 20 5 se takođe nalazila u značajno većoj koncentraciji u tumorskom tkivu sa nivoom značajnosti od $p=0,009$. Sa druge strane, 18 1 n9, 18 2, 18 3 n3, MUFA, n6/n3 su bile prisutne u statistički značajno većoj koncentraciji u zdravom tkivu ($p=0,000$). Statistički značajna razlika nije uočena za 16 0 i 16 1 masnu kiselinu.

Tabela 4.3.3. Koncentracije masnih kiselina u tumorskom tkivu i zdravoj mukozi.

Masna kiselina	Uzorak tkiva				p vrednost
	Zdrava mukoza (n=52)		Tumorsko tkivo (n=52)		
	\bar{X} (%)	SD (%)	\bar{X} (%)	SD (%)	
16 0	21,9992	1,9022	22,2856	1,6396	>0,05 [¶]
16 1	2,8590	1,7488	2,9334	1,5199	>0,05 [¶]
18 0	8,2536	3,2279	10,9093	2,2786	0,000 [¶]
18 1 n9	32,4104	6,2650	25,8700	3,9382	0,000 [¶]
18 1 n7	2,7491	2,7203	3,0897	1,8469	0,011 [§]
18 2	21,9036	3,3823	19,1348	2,9437	0,000 [¶]
18 3 n6	0,1000	0,2117	0,1160	0,2044	>0,05 [§]
18 3 n3	0,2498	0,1304	0,1340	0,1004	0,000 [¶]
20 3	0,8825	0,3452	1,7051	0,9955	0,000 [§]
20 4	6,3274	3,1998	10,3003	2,7010	0,000 [¶]
20 5	0,1980	0,1578	0,2463	0,1362	0,009 [¶]
22 4	0,7162	0,3038	1,2023	0,443	0,000 [¶]
22 5	0,3422	0,1340	0,5697	0,6810	0,000 [§]
22 6	0,7988	0,4217	1,5073	0,6535	0,000 [¶]
SFA	30,2528	2,7269	33,1948	2,1142	0,000 [¶]
MUFA	38,0184	6,7331	31,8932	4,1679	0,000 [¶]
PUFA	31,5185	5,5299	34,9158	3,3675	0,000 [¶]
n6	29,9298	5,1622	32,4585	3,1233	0,000 [¶]
n3	1,5887	0,5938	2,4573	1,1054	0,000 [§]
n6/n3	20,6419	6,5965	15,1415	5,9387	0,000 [¶]
AA/EPA	43,4658	31,7646	51,4524	22,3807	0,000 [§]

p vrednost se odnosi na poređenje između dve grupe za svaku masnu kiselinu zasebno ([§] Wilcoxon sign rank test; [¶] T test za vezane uzorke).

Poređen je i sastav masnih kiselina između muškaraca i žena u tumorskom i u zdravom tkivu (rezultati nisu prikazani). Od svih masnih kiselina, samo je oleinska (18 1 n9) bila statistički u značajno većoj koncentraciji u zdravoj mukozi muških pacijenata u odnosu na žene ($p=0,033$), a mono-nezasićene masne kiseline su bile u statistički značajno nižoj koncentraciji u zdravoj mukozi žena ($p=0,021$). Kod svih ostalih masnih kiselina koje su bile merene, nije bilo statistički značajne razlike u koncentracijama u tumorskom tkivu i zdravoj mukozi.

Kada je bio poređen sastav masnih kiselina u tumorskom tkivu i zdravoj mukozi između sredovečnih i starijih pacijenata, samo su palmitinska (16 0), palmitoleinska (16 1), stearinska (18 0) i linolna kiselina (18 2) pokazale značajnu razliku u uzorcima zdrave mukoze. Sredovečni pacijenti su imali veće koncentracije palmitinske i palmitoleinske kiseline, dok su stariji pacijenti imali veće koncentracije stearinske i linolne kiseline. Nije bilo statistički značajne razlike kod drugih masnih kiselina u zdravoj mukozi između sredovečnih i starijih pacijenata; ni jedan uzorak tumorskog tkiva nije pokazao statistički značajnu razliku ni za jednu od ispitivanih masnih kiselina (rezultati nisu prikazani).

Nije bilo statistički značajne razlike ni za jednu masnu kiselinu, između bilo koje dve od četiri formirane grupe na osnovu pola i godina starosti, u tumorskom tkivu; dok je u zdravom tkivu bilo statistički značajne razlike za sledećih pet masnih kiselina: 18 0, 18 2, MUFA, PUFA, n6 (rezultati nisu prikazani).

Gradus tumora nije značajno uticao na sastav masnih kiselina, osim za palmitoleinsku kiselinu, kod koje se pokazala statistički značajna razlika ($p=0,018$) između gradusa 1 i gradusa 3, ali ne i između gradusa 1 i 2, kao ni između gradusa 2 i 3. (Tabela 4.3.4.).

Tabela 4.3.4. Razlike u sastavu masnih kiselina između različitih tumorskih gradusa.

Masna kiselina	Uzorka tkiva			
	Tumorsko tkivo			p vrednost
	gradus 1	gradus 2	gradus 3	
	\bar{X} (SD) %	\bar{X} (SD) %	\bar{X} (SD) %	
16 0	21,7694 (0,7803)	22,3587 (1,8007)	22,8593 (1,0444)	>0,05 [¶]
16 1	4,2087 (2,3448) ^A	2,6790 (1,1724) ^{AB}	2,4996 (1,1038) ^B	0,018[¶]
18 0	11,0383 (1,8615)	11,0319 (2,3640)	8,8870 (1,7471)	>0,05 [¶]
18 1 n9	25,5965 (3,5990)	25,5542 (3,8397)	30,9022 (3,9852)	>0,05 [¶]
18 1 n7	4,1127 (3,5983)	2,9278 (1,2073)	2,1794 (0,5479)	>0,05 [¶]
18 2	17,1763 (1,7248)	19,4369 (3,0321)	20,9815 (2,3665)	>0,05 [¶]
18 3 n6	0,0776 (0,0377)	0,1289 (0,2314)	0,0598 (0,0427)	>0,05 [§]
18 3 n3	0,1128 (0,0772)	0,1370 (0,1082)	0,1577 (0,0413)	>0,05 [§]
20 3	1,6435 (0,4342)	1,7553 (1,1113)	1,2212 (0,1206)	>0,05 [§]
20 4	10,5915 (1,7859)	10,4585 (2,8297)	7,3170 (1,7025)	>0,05 [¶]
20 5	0,2807 (0,1385)	0,2458 (0,1378)	0,1495 (0,0826)	>0,05 [¶]
22 4	1,2213 (0,2728)	1,2041 (0,4913)	1,1213 (0,0970)	>0,05 [¶]
22 5	0,5193 (0,1331)	0,5870 (0,7752)	0,4906 (0,1066)	>0,05 [§]
22 6	1,6514 (0,8236)	1,4949 (0,6303)	1,2405 (0,4755)	>0,05 [¶]
SFA	32,8077 (1,7228)	33,3906 (2,1557)	31,7463 (2,6280)	>0,05 [¶]
MUFA	33,9179 (3,6979)	31,1610 (4,0869)	35,5812 (3,6057)	>0,05 [¶]
PUFA	33,2745 (3,4773)	35,4484 (3,3016)	32,7392 (1,8312)	>0,05 [¶]
n6	30,7103 (2,7479)	32,9837 (3,1453)	30,7008 (1,3192)	>0,05 [¶]
n3	2,5641 (0,9982)	2,4647 (1,1650)	2,0383 (0,6264)	>0,05 [§]
n6/n3	13,5016 (5,6195)	15,4577 (6,1723)	15,8448 (3,9123)	>0,05 [¶]
AA/EPA	44,2071 (17,6360)	52,7881 (23,6174)	55,3802 (18,8931)	>0,05 [¶]

[§] Kruskal Wallis H; [¶] One Way ANOVA

Poređenje masnokiselinskog sastava kod tumorskih uzoraka sa nižom (0-50%) i višom (50%-100%) mucinoznom komponentom nije pokazalo statistički značajnu razliku ni kod jedne od merenih masnih kiselina (rezultati nisu prikazani). Takođe, sastav masnih kiselina nije pokazao značajne razlike između različitih modifikovanih Astler-Coller gradusa (rezultati nisu prikazani).

Ispitivan je bio i odnos stearinske i oleinske kiseline, tzv. Saturacioni Indeks (SI). Statistički značajna razlika uočena je u vrednostima SI, gde su tumorska tkiva pokazala statistički značajno veći SI u odnosu na zdrava tkiva ($p=0,000$), tabela 4.3.5.

Tabela 4.3.5. Vrednosti saturacionog indeksa (SI) u tumorskom i zdravom tkivu.

SI (\bar{X} (SD))	Vrsta tkiva		
	Tumorsko tkivo	Zdrava mukoza	p vrednost
	0,4377 (0,12715)	0,2767 (0,15732)	0,000 ^φ

SI- saturacioni indeks, ^φ T test za vezane uzorke

U odnosu na pol, godine starosti, gradus tumora, mucinoznu komponentu i modifikovani Astler-Coller gradus, nije uočena značajna razlika između uzoraka. Vrednost SI u odnosu na peritumorski limfocitni odgovor, bilo je statistički značajno različit između grupe u kojoj nije bilo peritumorskog limfocitnog odgovora i grupe sa izraženim peritumorskim limfocitnim odgovorom, sa većom vrednosti SI u potonjoj grupi ($p=0,024$) (Tabela 4.3.6). Takođe je vrednost SI bila značajno veća u grupi bez venske invazije u odnosu na grupu uzoraka sa izraženom venskom invazijom ($p=0,002$) (Tabela 4.3.7.)

Tabela 4.3.6. Vrednosti Saturacionog Indeksa (SI) u odnosu na peritumorski limfocitni odgovor.

SI (\bar{X} (SD))	Peritumorski Limfocitni Odgovor			
	Nema odgovora	Blag do umeren odgovor	Izražen odgovor	p vrednost
	0,3689 (0,1482) ^A	0,4467 (0,1111) ^{AB}	0,5244 (0,1007) ^B	0,024 [¶]

SI- saturacioni indeks; [¶] One Way ANOVA, Tukey B post hoc test, Različita slova u superskriptu označavaju statistički značajnu razliku između grupa.

Tabela 4.3.7. Vrednosti Saturacionog Indeksa (SI) u odnosu na prisutnost venske infiltracije tumora.

SI (\bar{X} (SD))	Venska infiltracija		
	Nije prisutna	Prisutna	p vrednost
	0,4484 (0,1173)	0,1706 (0,0371)	0,002 ^φ

SI- saturacioni indeks, ^φ T test za nezavisne uzorke

4.4. Dužina telomera u tumorskom tkivu kolona/rektuma, zdravoj mukozi i perifernim leukocitima.

Dužina telomera ispitivana je kod 111 pacijenata. Bilo je 65 muškaraca (58,6%) i 46 (41,4%) žena, sa srednjom vrednosti godina starosti od 67,6 godina. Najmlađi pacijent je imao 32 godine, a najstariji 88 godina. Prema godinama starosti, podelili smo sve pacijente na dve grupe: sredovečne (≤ 65 godina) i starije pacijente (> 65 godina). Uzimajući pol i godine starosti u obzir, naši pacijenti su podeljeni u četiri grupe: sredovećni muškarci ($59,13 \pm 7,16$), stariji muškarci ($73,71 \pm 5,42$), sredovećne žene ($58,67 \pm 7,39$) i starije žene ($73,71 \pm 6,38$). Što se tiče histološkog tipa tumora, kod svih pacijenata se radilo o kolorektalnom adenokarcinomu. Karakteristike studijske populacije su prikazane u tabeli 4.4.1.

Tabela 4.4.1. Karakteristike pacijenata sa izmerenim telomerama.

Pol			
Muškarci		65 patients (58,6%)	
Žene		46 patients (41,4 %)	
Godine			
	Broj pacijenata (procent)	$\bar{X} \pm SD$	p vrednost
Studijska grupa	111 (100%)	$67,60 \pm 9,69$	
Sredovećni pacijenti	46 (41,4 %)	$58,98 \pm 7,16^{\text{p}}$	0,000
Stariji pacijenti	65 (58,6 %)	$73,71 \pm 5,85^{\text{p}}$	
Sredovećni muškarci	31 (27,9 %)	$59,13 \pm 7,16^{\text{A}\ddagger}$	0,000
Stariji pacijenti	34 (30,6 %)	$73,71 \pm 5,42^{\text{B}\ddagger}$	
Sredovećne žene	15 (13,5 %)	$58,67 \pm 7,39^{\text{A}\ddagger}$	
Starije žene	31 (27,9 %)	$73,71 \pm 6,38^{\text{B}\ddagger}$	
T stadijum tumora			
T1		6 (5,4 %)	
T2		33 (29,7 %)	
T3a		10 (9,0 %)	
T3b		37 (33,3 %)	
T3c		20 (18,0 %)	
T4		5 (4,5 %)	
Lokalizacija tumora			
Desni kolon		41 (36,9 %)	
Levi kolon		34 (30,6 %)	
Rektum i analni kanal		34 (30,6 %)	
Sinhroni tumor		2 (1,5 %)	

^p T test za nezavisne uzorke; [†] One Way ANOVA; Različita slova u superskriptu označavaju statistički značajnu razliku između grupa.

Dužina telomera bila je merena u perifernim leukocitima onkoloških pacijenata, u tumorskom tkivu i u zdravoj mukozi. Relativna dužina telomera je bila statistički značajno veća u tumorskom tkivu u poređenju sa zdravom mukozom ($p=0,000$, Friedman ranks ANOVA; $p=0,042$ u Wilcoxon sign rank test-u), i u odnosu na periferne leukocite ($p=0,000$, i u Friedman ranks ANOVA-i i Wilcoxon sign rank test-u), i značajno veća u perifernim leukocitima u odnosu na zdravu mukozu ($p=0,000$). Rezultati su prikazani u tabeli 4.4.2.

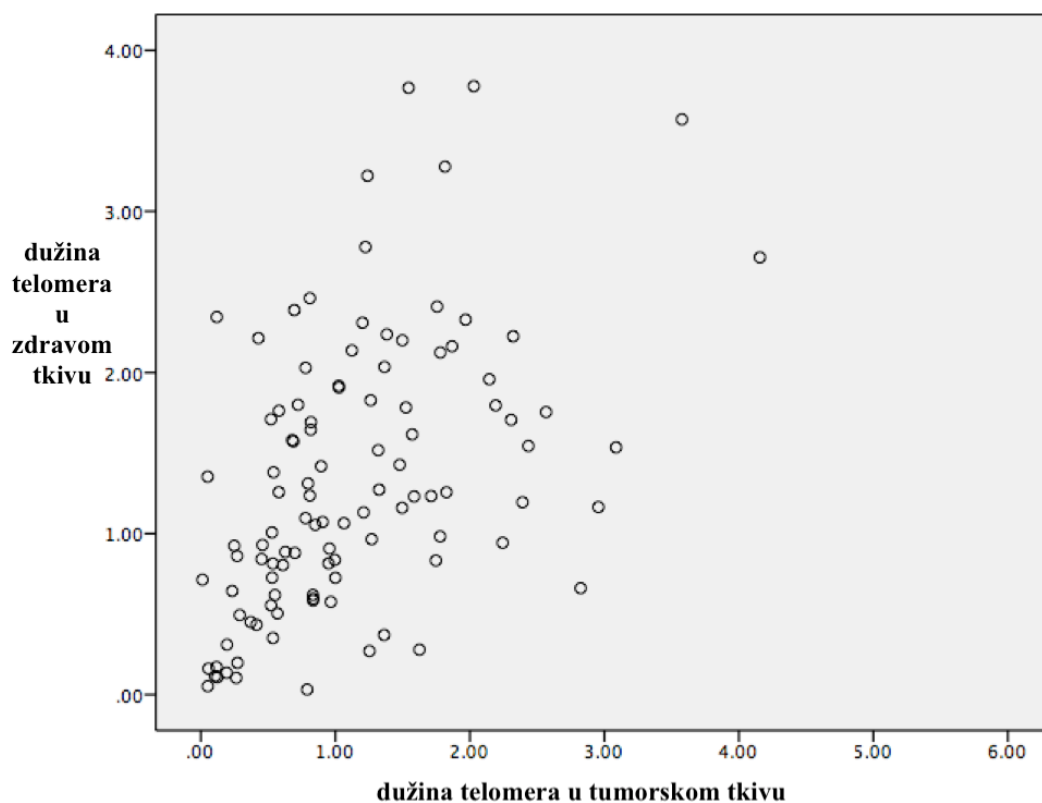
Tabela 4.4.2. Dužina telomera u tumorskom tkivu, zdravoj mukozi i perifernim leukocitima.

Relativna dužina telomera	$\bar{X} \pm SD$	p vrednost	Poređenje	p vrednost
Relativna dužina telomera u tumorskom tkivu (TT)	2,3376 ± 7,3839	0,000 [∞]	TT/THM	0,042 [§]
Relativna dužina telomera u zdravoj mukozi (THM)	1,5333 ± 1,6418	0,000 [∞]	THM/TPL	0,000 [§]
Relativna dužina telomera u perifernim leukocitima (TPL)	1,8876 ± 0,9696	0,000 [∞]	TT/TPL	0,000 [§]

[§] Wilcoxon sign rank test

[∞] Friedman ranks ANOVA

Takođe je ustanovljena jaka pozitivna korelacija između relativne dužine telomera u tumorskom tkivu i relativne dužine telomera u zdravoj mukozi ($p=0,000$, koeficijent korelacije 0,539, Spearman-ova neparametarska korelacija). Rezultati su prikazani na grafikonu 4.4.1.



Grafikon 4.4.1. Korelacija RTL u tumorskom tkivu i zdravoj mukozi.

* $p=0,000$, Spearman-ova korelacija, koeficijent korelacije 0,539.

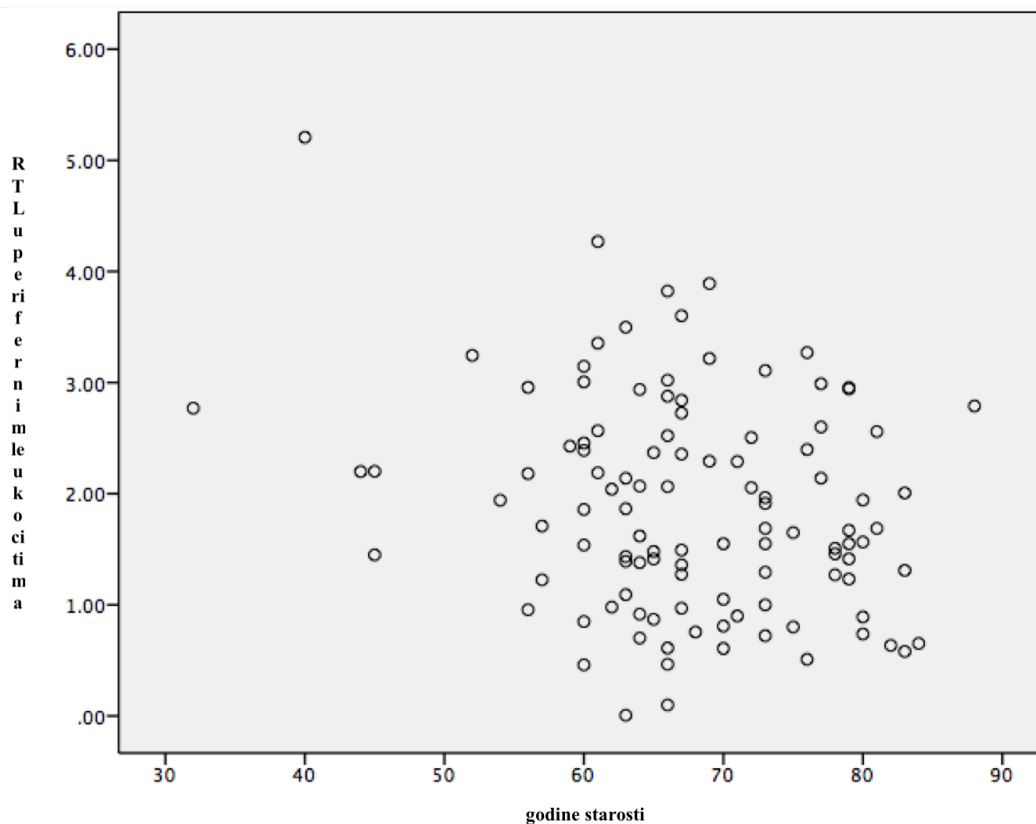
Daljim statističkim ispitivanjem uočeno je da pol pacijenata ne utiče na relativnu dužinu telomera u perifernim leukocitima, tumorskom tkivu i zdravoj mukozi. Ukoliko se uporedi relativna dužina telomera između dve formirane starosne grupe (sredovečni i stariji pacijenti), ne pronalazi se statistički značajna razlika između bilo koje dve od tri grupe uzoraka (tumorsko tkivo, zdrava mukoza, periferni leukociti). Relativna dužina telomera svake od četiri grupe (sredovečni muškarci, stariji muškarci, sredovečne žene i starije žene) nije bila statistički značajno različita, tabela 4.4.3.

Tabela 4.4.3. Dužina telomera u perifernim leukocitima, zdravoj mukozi i tumorskom tkivu u četiri grupe pacijenata formirane prema polu i godinama starosti.

	Sredovečni muškarci ($\bar{X} \pm SD$)	Stariji muškarci ($\bar{X} \pm SD$)	Sredovečne žene ($\bar{X} \pm SD$)	Starije žene ($\bar{X} \pm SD$)	p vrednost
Relativna dužina telomera u perifernim leukocitima (TPL)	1,9676 ± 0,9278	1,7334 ± 0,8545	2,1236 ± 1,2271	1,8726 ± 1,0179	0,599 [†]
Relativna dužina telomera u tumorskom tkivu (TT)	2,8828 ± 9,3631	3,0634 ± 9,8271	1,2243 ± 0,8784	1,5349 ± 1,8618	0,883 [§]
Relativna dužina telomera u zdravoj mukozi (THM)	1,7716 ± 2,5653	1,4472 ± 0,9154	1,4588 ± 0,9092	1,4255 ± 1,3830	0,822 [§]

[†] One Way ANOVA, [§] Kruskal Wallis H

Značajna negativna korelacija je nađena između relativne dužine telomera u perifernim leukocitima i godina starosti pacijenta ($p=0,012$, Pearson-ova korelacija, koeficijent korelacije -0,211) (grafikon 4.4.2), međutim nije nađena značajna korelacija drugih uzoraka (tumorskog tkiva i zdrave mukoze) sa godinama starosti pacijenata (rezultati nisu prikazani).

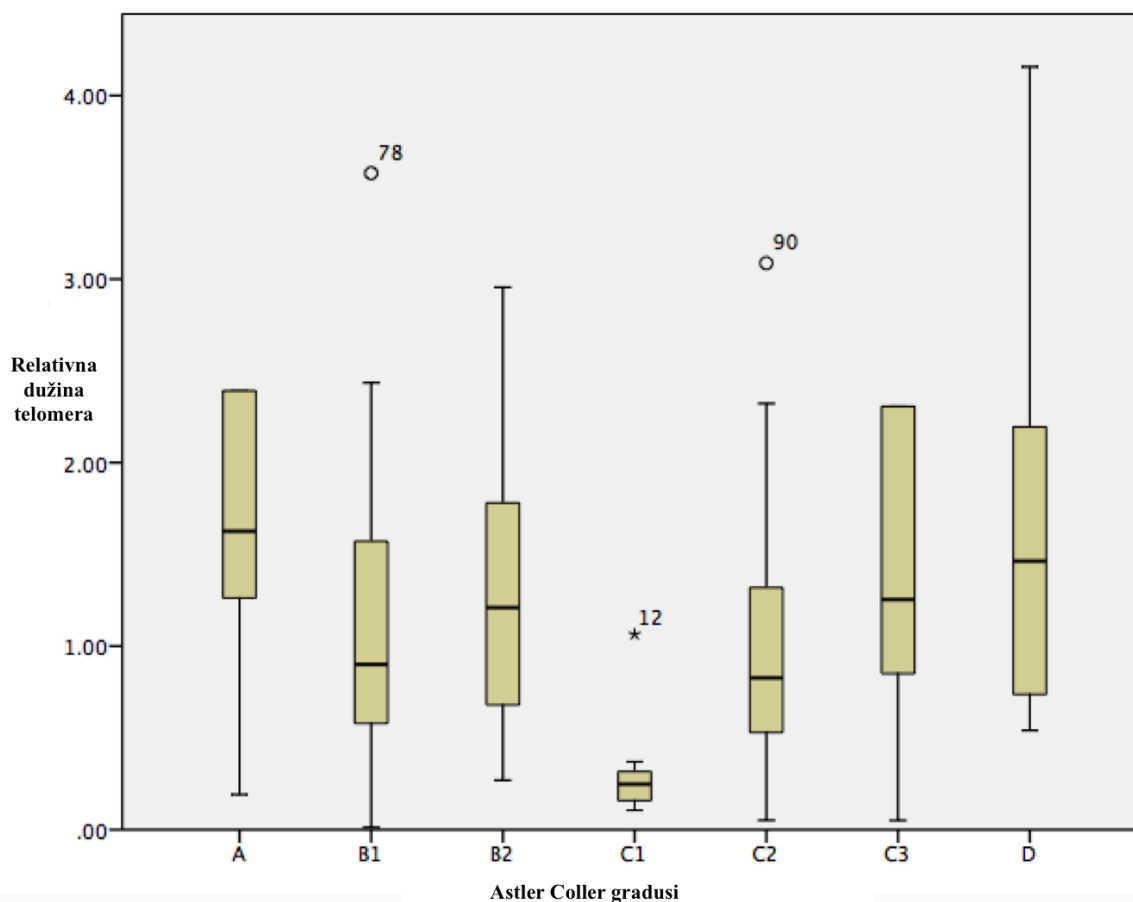


Grafikon 4.4.2. Negativna korelacija između relativne dužine telomera u perifernim leukocitima pacijenata i godina starosti.

* $p=0,012$, Pearson-ova korelacija, koeficijent korelacije -0,211.

Patohistološke karakteristike tumora, kao što su lokalizacija tumora, tip rasta tumora (polipoidni ili ulcerozni) i histološki gradus tumora nisu uticali na relativnu dužinu telomeru ni u jednom tipu uzoraka. Patohistološke karakteristike tumorskog tkiva koje govore u prilog imunskog odgovora pacijenta na tumorsko tkivo, peritumorski limfocitni odgovor, kao i intratumorski limfocitni odgovor nisu imali uticaja na dužinu telomera u tumorskom tkivu, zdravoj mukozi niti u perifernim leukocitima. Ostale patohistološke karakteristike tumorskog tkiva kao što su mucinozna komponenta tumora, limfo-vaskularna invazija, venska invazija, perineuralna invzija, tip rasta tumora, prisustvo tumor badinga nisu uticale na relativnu dužinu telomera u perifernim leukocitima, zdravoj mukozi niti tumorskom tkivu. Između različitih T stadijuma, kao i između N stadijuma, nije bilo statistički značajne razlike u relativnoj dužini telomera perifernih leukocita, tumorskog tkiva niti zdrave mukoze.

Sa druge strane, relativna dužina telomera je bila statistički značajno različita između različitih stadijuma modifikovane Astler Coller skale, grafikon 4.4.3. Kruskal Wallis H neparametarska ANOVA je pokazala statistički značajnu razliku između različitih gradusa ($p=0,017$). Dok je daljom analizom Mann Withney U testom pokazana značajna razlika između C1 MAC gradusa u odnosu na sve ostale graduse.

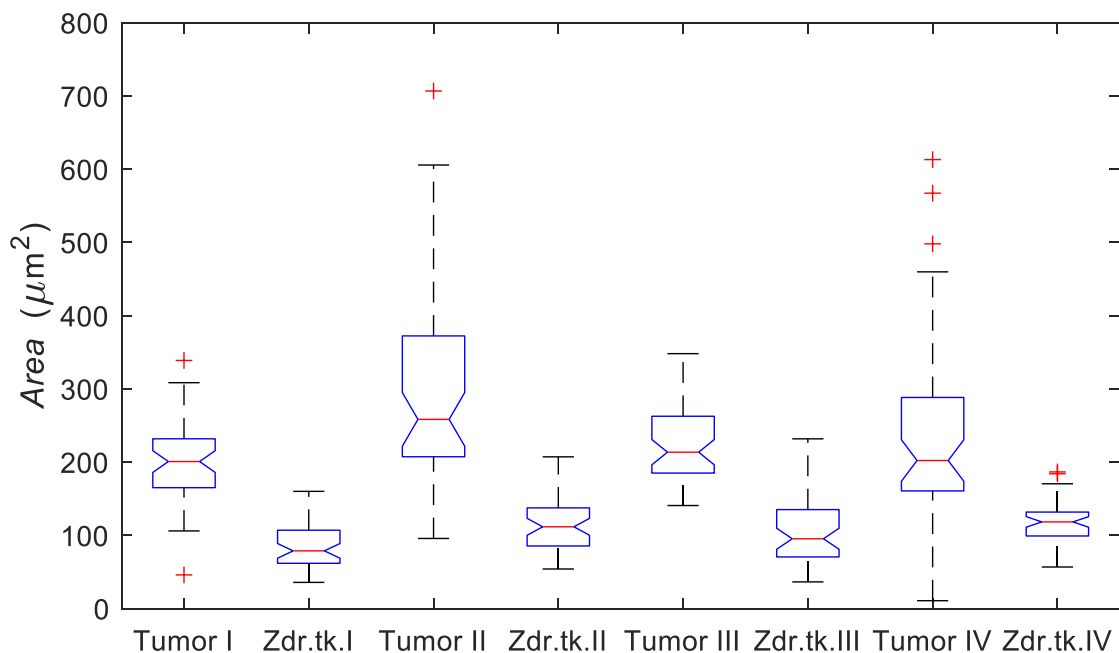


Grafikon 4.4.3. Relativna dužina telomera kod različitih Astler Coller gradusa.

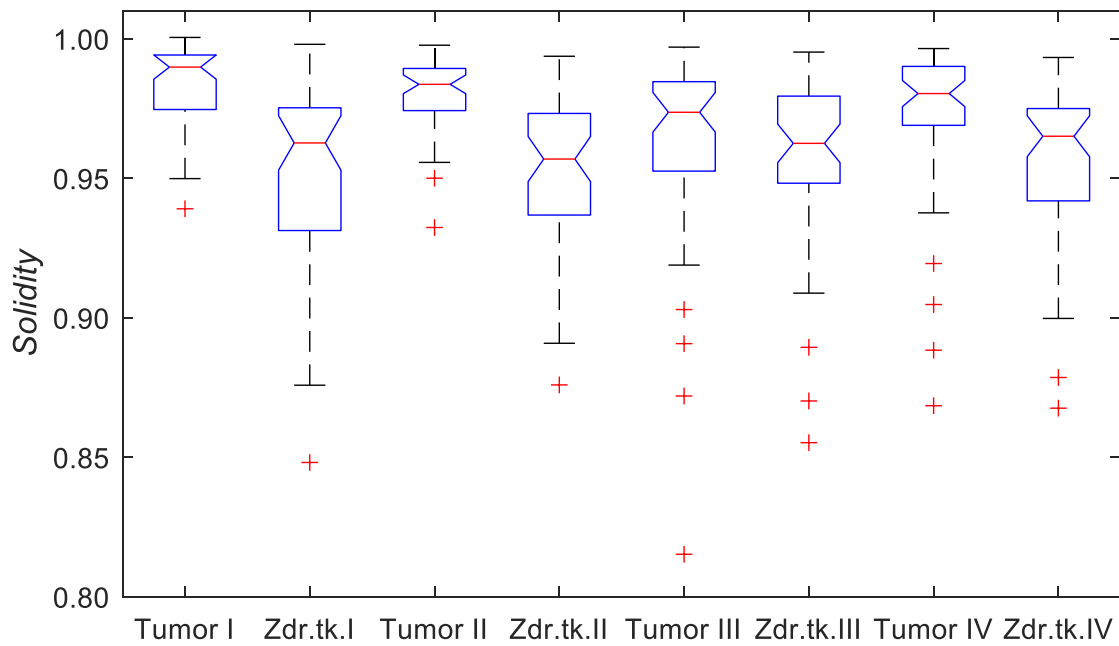
Kruskal Wallis H neparametarska ANOVA je pokazala statistički značajnu razliku između različitih gradusa ($p=0,017$). Dok je daljom analizom Mann Withney U testom pokazana značajna razlika između sledećih MAC gradusa: A/C1 ($p=0,022$), B1/C1 ($p=0,022$), B2/C1 ($p=0,001$), C1/C2 ($p=0,004$), C1/C3 ($p=0,023$), C1/D ($p=0,004$).

4.5. Morfometrijski, teksturni i fraktalni parametri

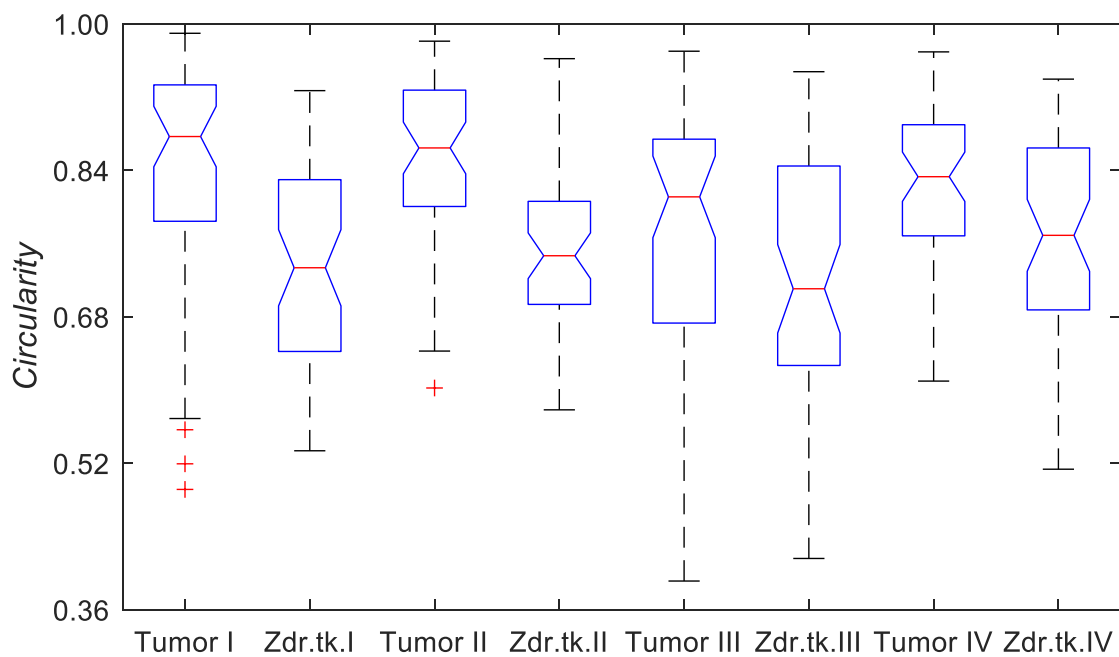
Prvi morfometrijski parametar kod koga se uočavaju značajne razlike između tumorskog i mukoznog tkiva je veličina jedara, koja u μm^2 za zdravu mukožu iznosi $84,60 \pm 30,58$, $116,31 \pm 38,19$, $107,25 \pm 47,09$ i $119,04 \pm 29,51$, redom za četiri stadijuma. Veličina jedara tumorskog tkiva u μm^2 je procenjena na $200,27 \pm 54,33$, $294,32 \pm 123,67$, $224,73 \pm 50,73$ i $237,98 \pm 127,87$, za prvi, drugi, treći i četvrti stadijum, respektivno. Sve razlike između zdrave mukoze i tumorskog tkiva su statistički značajne ($p < 0,0001$). Primećuje se blago povećanje kod zdrave mukoze sa porastom stadijuma, ali ne i statistički značajno (grafikon 4.5.1). Ni trend porasta veličine jedara tumorskog tkiva sa povećanjem broja stadijuma nije statistički značajan, ali se može uočiti (grafikon 4.5.1). Drugi zanimljiv parametar je *Solidity* (konveksnost), kod prvog i drugog stadijuma postoje statistički značajne razlike između jedara tumorskog tkiva i zdrave mukoze ($p < 0,0001$). Kod tumorskog tkiva *Solidity* iznosi $0,98 \pm 0,02$, $0,98 \pm 0,01$, a kod zdrave mukoze $0,95 \pm 0,03$, $0,95 \pm 0,03$, za prvi odnosno za drugi stadijum (grafikon 4.5.2). Kod viših stadijuma značajne razlike se ne uočavaju usled veće varijabilnosti. Sličan nalaz se opaža i za parametar *Circularity* (cirkularnost). Jedra tumorskog tkiva imaju statistički značajno veću cirkularnost ($p < 0,05$), $0,84 \pm 0,13$ za prvi stadijum i $0,85 \pm 0,09$ za drugi, u odnosu na zdravu mukožu bilo kog stadijuma $0,73 \pm 0,11$, $0,75 \pm 0,10$, $0,72 \pm 0,13$ i $0,76 \pm 0,11$, (grafikon 4.5.3). Kod *Aspect Ratio* parametra uočena je velika varijabilnost; vrednosti se kreću od oko 1 do skoro 3. Srednje vrednosti za tumorsko tkivo su $1,83 \pm 0,73$, $1,67 \pm 0,47$, $2,07 \pm 0,86$ i $1,84 \pm 0,48$, za prvi, drugi, treći i četvrti stadijum, dok u zdravoj mukozi iznose $2,13 \pm 0,64$, $2,02 \pm 0,50$, $2,30 \pm 0,94$ i $2,00 \pm 0,65$, za stadijume redom. Statistički značajna razlika nije ustanovljena.



Grafikon 4.5.1. Veličina jedara kod tumorskog tkiva i zdrave mukoze.



Grafikon 4.5.2. Konveksnost (*Solidity*) kod tumorskog tkiva i zdrave mukoze.

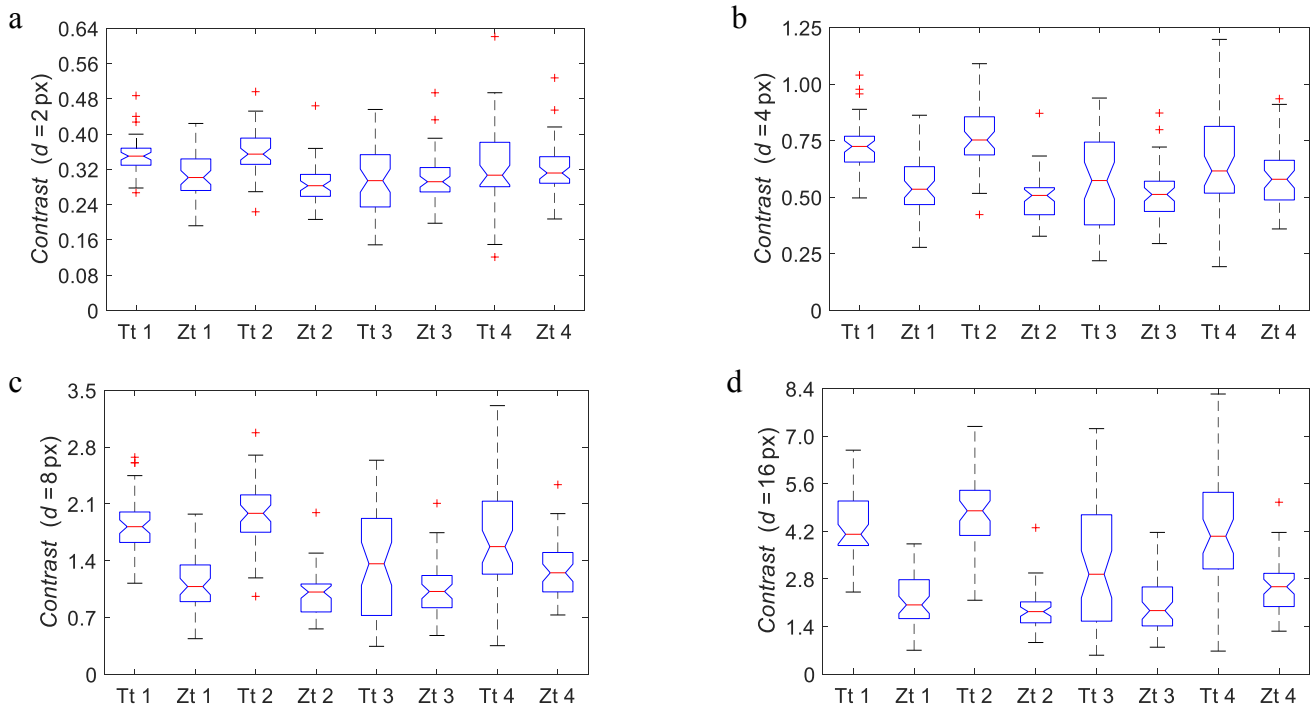


Grafikon 4.5.3. Cirkularnost (*Circularity*) kod tumorskog tkiva i zdrave mukoze.

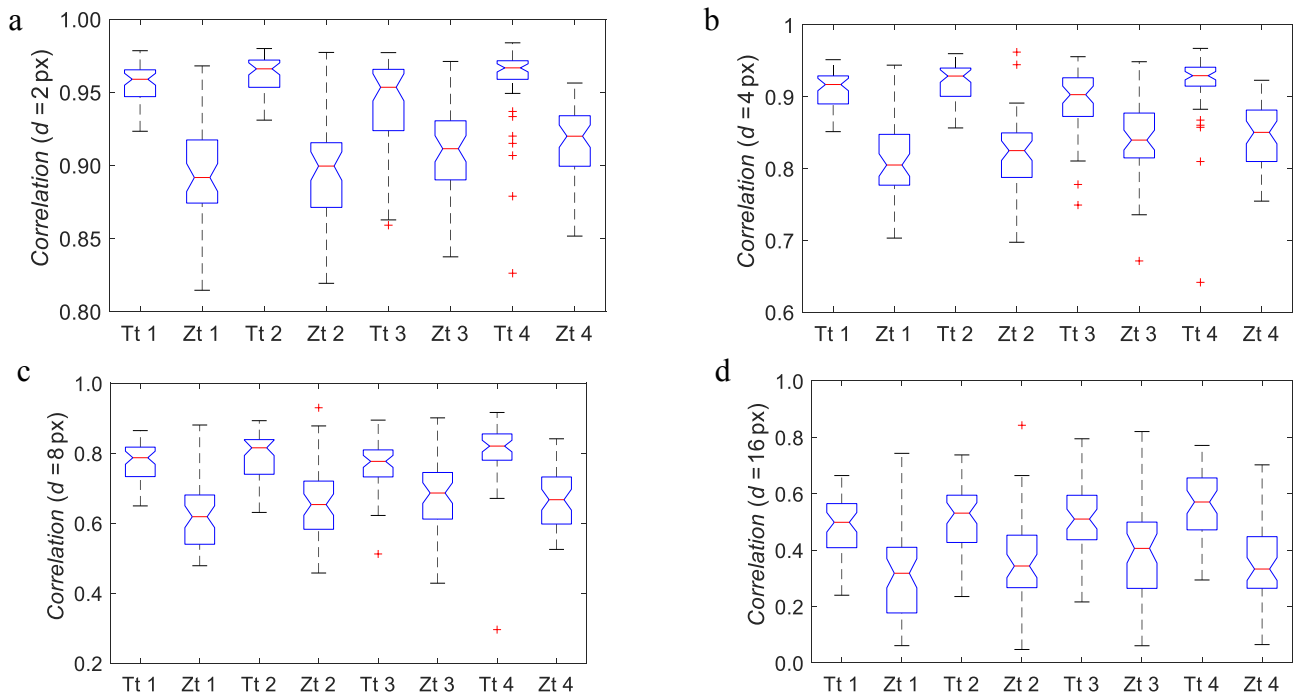
Teksturni GLCM parametri su se pokazali kao potencijalno značajan alat za opis i upoređivanje tekstura tumorskog tkiva i zdrave mukoze u različitim stadijumima. Izračunati su za međusobne udaljenosti piksela od 1 px do 16 px. U Tabeli 4.5.1. uporedno su prikazane srednje vrednosti i standardne devijacije po stadijumima za slučajeve kada je $d=2$ px, $d=4$ px, $d=8$ px, kao i $d=16$ px. Dodatno, statističke raspodele za pomenute slučajeve prikazane su grafički: kontrast (*Contrast*) između posmatrane dve tačke u grafikonu 4.5.4, korelacija (*Correlation*) u grafikonu 4.5.5, energija (*Energy*, odnosno *Angular Second Moment*) u grafikonu 4.5.6, i homogenost teksture (*Homogeneity*) u grafikonu 4.5.7. Kada je $d=2$ px, karakteristike se odnose na piksele mikrografa jedara između kojih se nalazi samo po jedan piksel, znači skoro susedne. Rastojanje $d=16$ px odslikava vrednosti kojima se teži za prostorno udaljene piksele, dok $d=4$ px i $d=8$ px ilustruju karakteristike tekstura koje odgovaraju srednje udaljenim pikselima. Treba istaći sledeća zapažanja. Kod prvog i drugog stadijuma, *Contrast* kod tumorskog tkiva se statistički značajno razlikuje u odnosu na zdravo tkivo u tom i u bilo kom drugom stadijumu ($p<0,05$). Kod trećeg i četvrtog stadijuma nema statistički značajnih razlika između tumorskog tkiva i zdrave mukoze kada je u pitanju *Contrast* bliskih piksela, ali se uočavaju razlike ($p<0,05$) za $d=8$ px i $d=16$ px.

Tabela 4.5.1. Srednje vrednosti i standardne devijacije teksturnih GLCM parametara (srednja vrednost ± standardna devijacija).

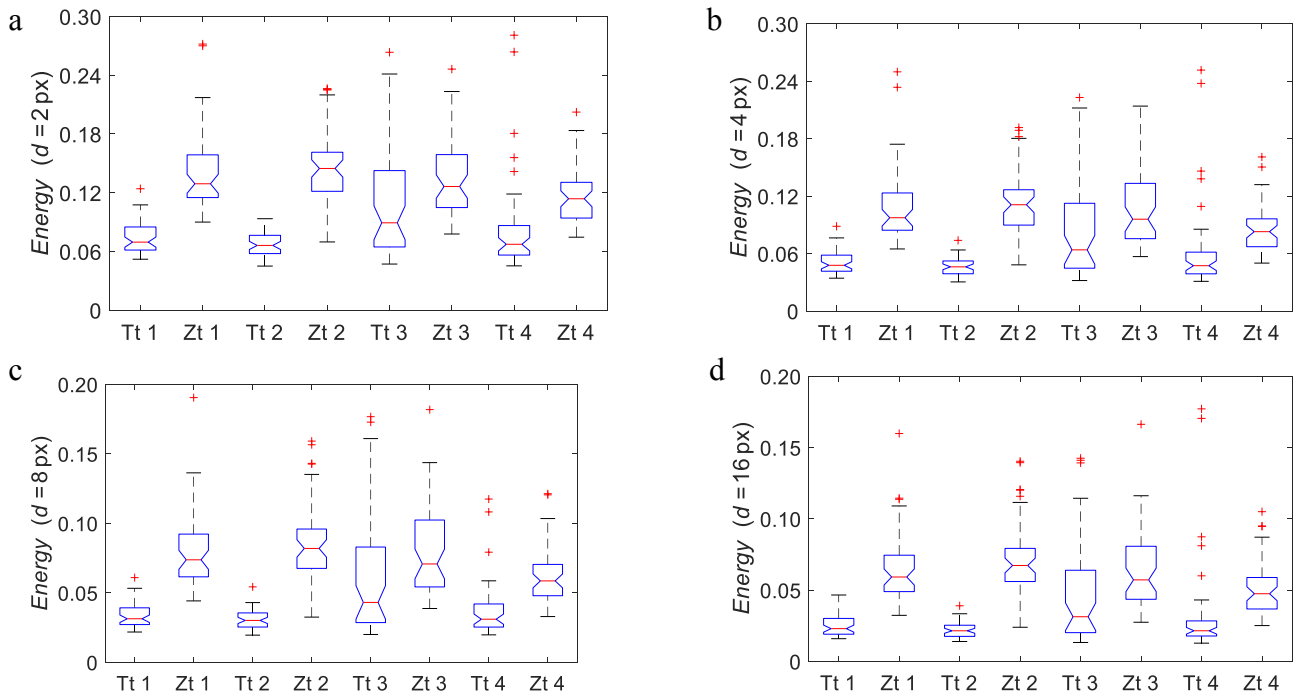
Parametar	Stadijum 1		Stadijum 2		Stadijum 3		Stadijum 4	
	Tumor	Zdravo tkivo	Tumor	Zdravo tkivo	Tumor	Zdravo tkivo	Tumor	Zdravo tkivo
Contr (2px)	0.3501	0.3090	0.3595	0.2847	0.2917	0.2966	0.3330	0.3207
	± 0.0409	± 0.0513	± 0.0517	± 0.0448	± 0.0720	± 0.0546	± 0.0924	± 0.0529
Contr (4px)	0.7270	0.5528	0.7620	0.4921	0.5662	0.5165	0.6855	0.5956
	± 0.1113	± 0.1209	± 0.1332	± 0.0959	± 0.2057	± 0.1168	± 0.2421	± 0.1223
Contr (8px)	1.8351	1.1312	1.9731	0.9752	1.3542	1.0465	1.7328	1.2915
	± 0.3475	± 0.3254	± 0.3904	± 0.2603	± 0.6685	± 0.3351	± 0.7216	± 0.3426
Contr (16px)	4.3689	2.1356	4.7592	1.8347	3.1509	2.0627	4.2212	2.5610
	± 0.9886	± 0.6998	± 1.0256	± 0.6041	± 1.8372	± 0.8351	± 1.8031	± 0.8068
Correl (2px)	0.9562	0.8917	0.9618	0.8952	0.9391	0.9085	0.9585	0.9146
	± 0.0126	± 0.0338	± 0.0124	± 0.0322	± 0.0331	± 0.0332	± 0.0273	± 0.0254
Correl (4px)	0.9100	0.8087	0.9189	0.8201	0.8919	0.8414	0.9185	0.8433
	± 0.0243	± 0.0525	± 0.0269	± 0.0522	± 0.0463	± 0.0523	± 0.0496	± 0.0427
Correl (8px)	0.7756	0.6183	0.7906	0.6493	0.7685	0.6840	0.8068	0.6667
	± 0.0555	± 0.0929	± 0.0664	± 0.0953	± 0.0718	± 0.0949	± 0.0924	± 0.0808
Correl (16px)	0.4819	0.3036	0.5076	0.3604	0.5085	0.3962	0.5586	0.3601
	± 0.1053	± 0.1494	± 0.1217	± 0.1518	± 0.1226	± 0.1610	± 0.1420	± 0.1357
Energy (2px)	0.0741	0.1398	0.0674	0.1473	0.1123	0.1338	0.0877	0.1154
	± 0.0166	± 0.0391	± 0.0123	± 0.0354	± 0.0568	± 0.0388	± 0.0660	± 0.0270
Energy (4px)	0.0513	0.1081	0.0467	0.1142	0.0863	0.1052	0.0670	0.0855
	± 0.0124	± 0.0374	± 0.0092	± 0.0318	± 0.0518	± 0.0362	± 0.0646	± 0.0235
Energy (8px)	0.0342	0.0823	0.0310	0.0867	0.0630	0.0802	0.0495	0.0621
	± 0.0091	± 0.0349	± 0.0068	± 0.0277	± 0.0434	± 0.0320	± 0.0613	± 0.0198
Energy (16px)	0.0250	0.0678	0.0221	0.0713	0.0483	0.0652	0.0378	0.0497
	± 0.0076	± 0.0318	± 0.0055	± 0.0250	± 0.0362	± 0.0283	± 0.0562	± 0.0178
Homog (2px)	0.8359	0.8544	0.8357	0.8650	0.8613	0.8634	0.8485	0.8505
	± 0.0151	± 0.0188	± 0.0181	± 0.0158	± 0.0295	± 0.0188	± 0.0319	± 0.0162
Homog (4px)	0.7341	0.7764	0.7343	0.7916	0.7775	0.7902	0.7566	0.7646
	± 0.0212	± 0.0307	± 0.0263	± 0.0253	± 0.0534	± 0.0324	± 0.0494	± 0.0266
Homog (8px)	0.6119	0.6803	0.6111	0.6978	0.6697	0.6951	0.6405	0.6590
	± 0.0246	± 0.0435	± 0.0309	± 0.0361	± 0.0756	± 0.0480	± 0.0653	± 0.0354
Homog (16px)	0.5035	0.5965	0.5003	0.6129	0.5686	0.6037	0.5289	0.5680
	± 0.0273	± 0.0498	± 0.0303	± 0.0427	± 0.0890	± 0.0573	± 0.0746	± 0.0407



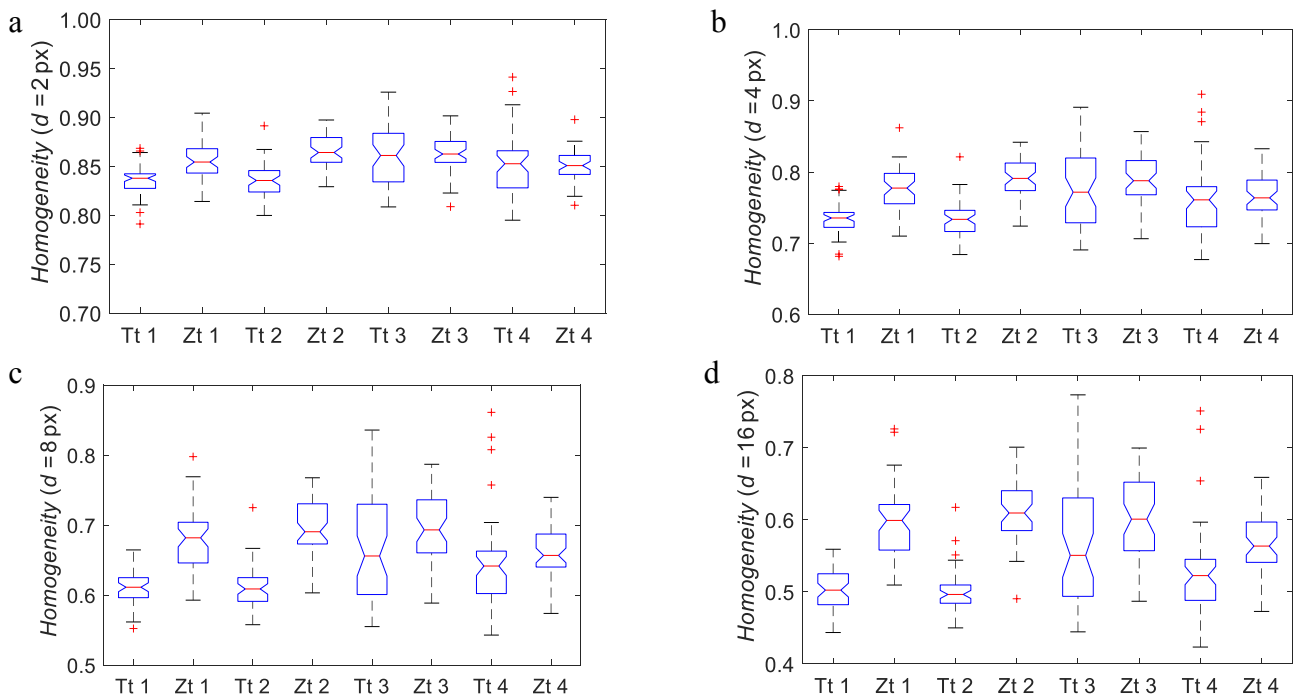
Grafikon 4.5.4. Kontrast (*Contrast*) između posmatrane dve tačke kod tumorskog tkiva i zdrave mukoze.



Grafikon 4.5.5. Korelacija (*Correlation*) kod tumorskog tkiva i zdrave mukoze.



Grafikon 4.5.6. Energija (*Energy*, odnosno Angular Second Moment) kod tumorskog tkiva i zdrave mukoze.



Grafikon 4.5.7. Homogenost teksture (*Homogeneity*) kod tumorskog tkiva i zdrave mukoze.

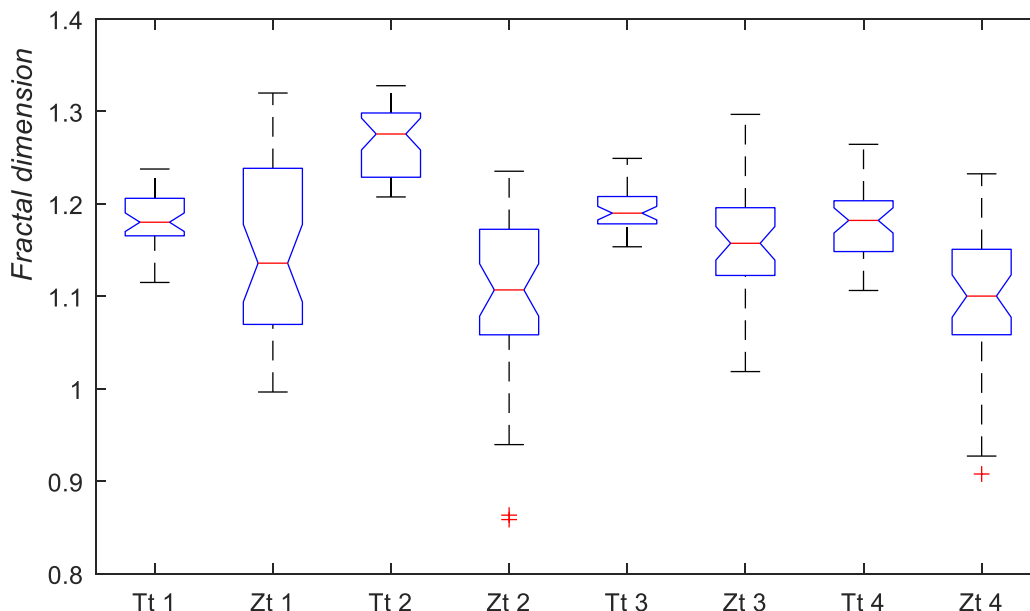
U pogledu korelacije piksela, razlike između tumorskog tkiva i zdrave mukoze su statistički značajne ($p < 0,0005$) za bilo koji stadijum u odnosu na zdravu mukožu u tom i bilo kom drugom stadijumu, za bilo koju udaljenost razmatranih piksela. Nema razlika između tumorskog tkiva za različite stadijume. Korelisanost piksela jedara zdravog tkiva je niža nego kod tumorskog (grafikon 4.5.5), a uočava se trend porasta korelisanosti piksela i kod zdrave mukoze sa porastom stadijuma tumora. Statistički značajne razlike zdrave mukoze u odnosu na zdravu mukožu primećene su u

sledećim slučajevima. Za $d=2$ px, statistički značajno se razlikuje zdrava mukoza pacijenata četvrtog stadijuma KRK u odnosu na zdravu mukoza pacijenata sa prvim i drugim stadijumom ($p<0,05$). Za $d=4$ px, statistički značajno se razlikuje zdrava mukoza stadijuma tri i četiri u odnosu na najniži, prvi, stadijum ($p<0,05$). Za $d=8$ px i za $d=16$ px, statistički značajno se razlikuje zdrava mukoza stadijuma tri u odnosu na prvi stadijum ($p<0,05$).

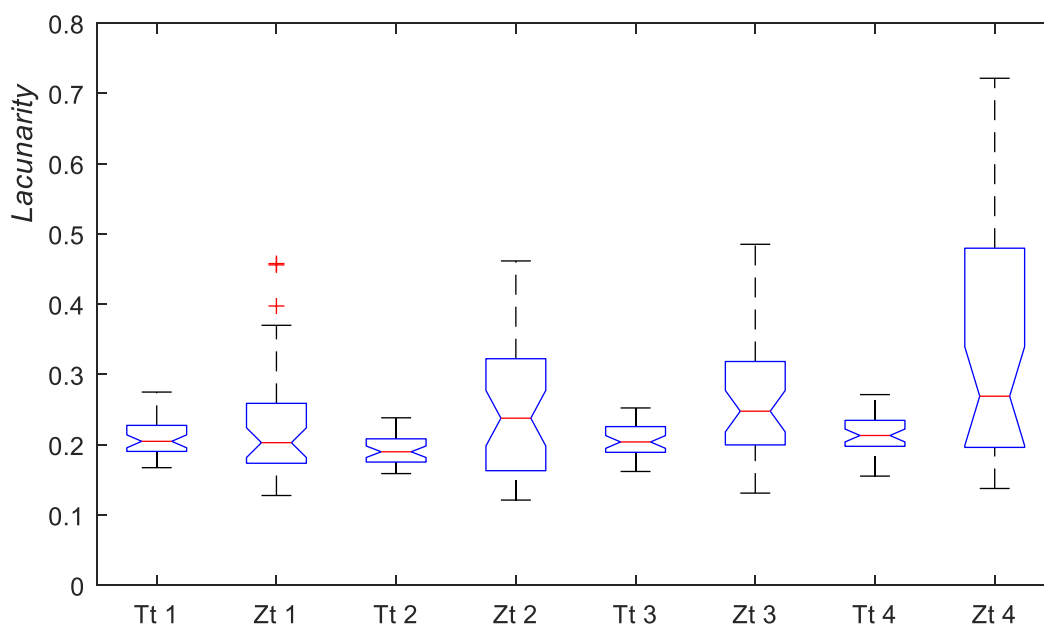
Parametar *Energy* ima značajno niže vrednosti kod tumorskog tkiva nego kod zdrave mukoze, što ukazuje na odsustvo velikih i naglih prelaza u intenzitetima piksela u lokalnom okruženju, odnosno, verovatnije je da su prelazi u intenzitetu sivog relativno mali i uniformno razbacani po celom poprečnom preseku jedra. Tumorsko tkivo prvog i drugog stadijuma se statistički značajno razlikuje ($p<0,005$) od zdrave mukoze u tom i bilo kom drugom stadijumu. Kod četvrtog stadijuma, *Energy* je nešto viši za tumorsko tkivo u četvrtom stadijumu, u odnosu na prva tri stadijuma, a niži za zdravu mukoza kod pacijenata sa tumorom četvrtog stadijuma u odnosu na zdravu mukoza pacijenata sa nižim stadijumom tumora (grafikon 4.5.6), tako da je u četvrtom stadijumu nemoguće razlikovati jedra tumorskog tkiva i zdrave mukoze osim za $d=2$ px, gde je ($p<0,05$). Kod trećeg stadijuma je standardna devijacija visoka (grafikon 4.5.6), što zahteva dodatne analize sa uzorcima iz istog stadijuma, kako bi se otklonile sve nedoumice.

Homogenost teksture (*Homogeneity*) procenjuje ukupni stepen varijacija intenziteta piksela koji se nalaze na zadatom rastojanju. Vrednosti za tumorsko tkivo su niže nego za zdravu mukoza (grafikon 4.5.7.). Jedra tumorskog tkiva prvog i drugog stadijuma se po teksturi razlikuju od jedara zdrave mukoze tog i bilo kog drugog stadijuma ($p<0,05$), za bilo koje rastojanje piksela. Interesantno je primetiti, da nema statistički značajnih razlika u teksturi jedara tumorskog tkiva i zdrave mukoze u četvrtom stadijumu kancera ($d=2$ px, $d=4$ px, $d=8$ px).

Fraktalnom analizom uočene su i kvantifikovane razlike između tumorskog tkiva i zdrave mukoze. U svim stadijumima, fraktalna dimenzija (*Fractal dimension*, grafikon 3.5.8) je viša kod tumorskog tkiva i ima manju standardnu devijaciju. Razlike su statistički značajne ($p<0,05$) u poređenju sa zdravim tkivom u drugom i četvrtom stadijumu. Lakunarnost (*Lacunarity*, grafikon 3.5.9) je niža kod tumorskog tkiva i takođe ima i manju standardnu devijaciju. Razlike su statistički značajne ($p<0,05$) u poređenju sa zdravim tkivom u drugom i četvrtom stadijumu.



Grafikon 4.5.8. Fraktalna analiza tumorskog tkiva i zdrave mukoze.



Grafikon 4.5.9. Lakunarnost tumorskog tkiva i zdrave mukoze.

4.6. Infracrvenom spektroskopijom izmereni spektri apsorbovanih talasnih dužina

Snimani su IC spektri tkiva od 10 pacijenata iz različitih grupa. Nakon snimanja bazne linije, sniman je IC spektar uzorka zdravog i bolesnog tkiva. Snimano je u intervalu od 1000 cm^{-1} do 3200 cm^{-1} . Kako se u opsegu od 1900 cm^{-1} do 2750 cm^{-1} ne javljaju trake koje ukazuju na apsorpciju, ovaj deo spektra nije uzet u razmatranje. Od svakog spektra je oduzeta bazna linija, koja spaja početak i kraj opsega i spektri su normalizovani na ukupnu površinu ispod krive.

Oblasti frekvencija u kojima se uvek javljaju apsorpcione trake određenih funkcionalnih grupa prikazane su u tabeli 4.6.1. Dobijeni reprezentativni spektri su prikazani na grafikonima 4.6.1. Crvena linija predstavlja bolesno, a crna zdravo tkivo. Pomoću računarskih programa su izračunate površine ispod pikova u određenim oblastima. To su oblasti sledećih talasnih brojeva: I ($1128\text{-}1205\text{ cm}^{-1}$), II ($1722\text{-}1795\text{ cm}^{-1}$), III ($2750\text{-}3055\text{ cm}^{-1}$) i IV ($1483\text{-}1722\text{ cm}^{-1}$).

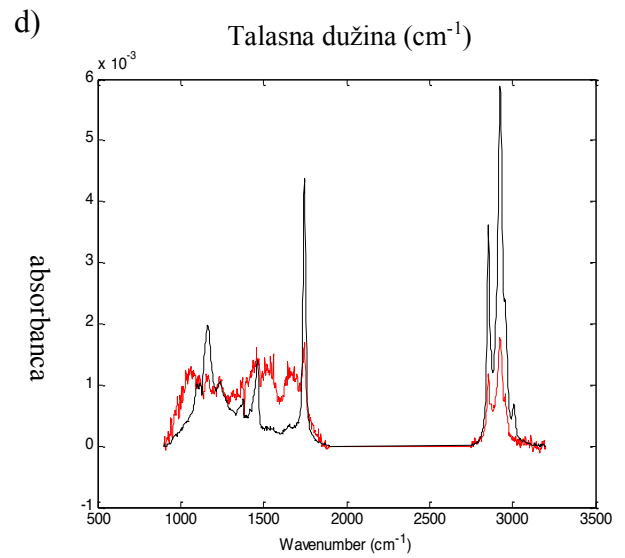
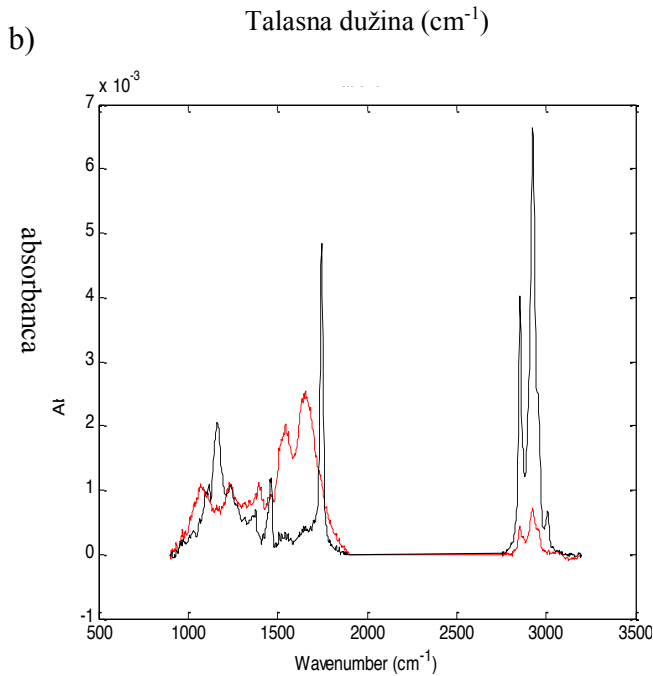
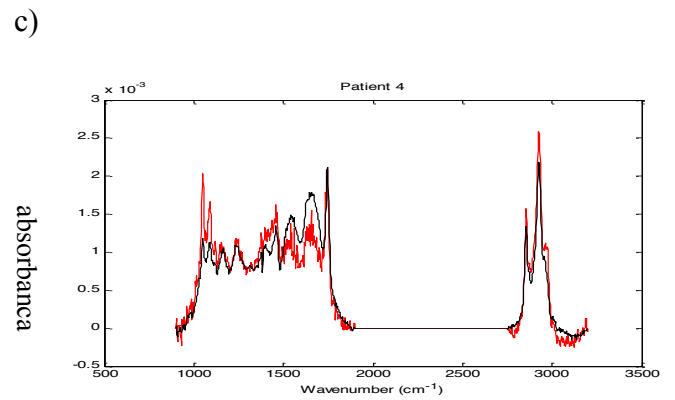
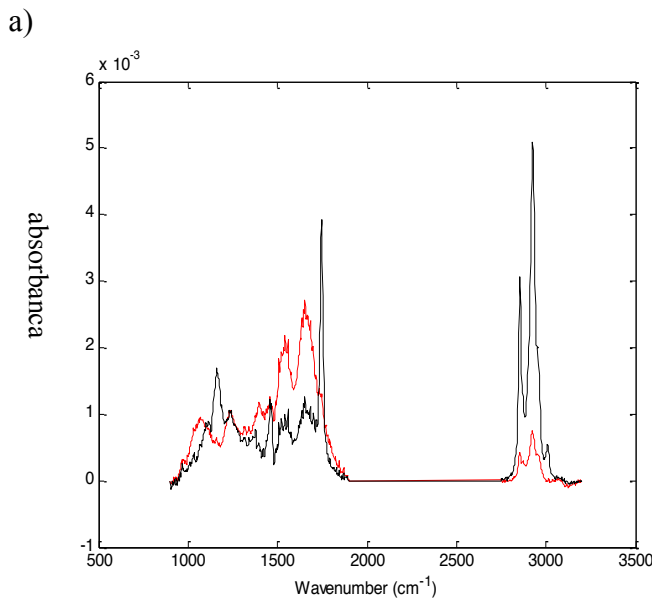
Tabela 4.6.1. Tabelarni prikaz talasnih brojeva apsorpcionih pikova karakterističnih funkcionalnih grupa u IC oblasti i opis pikova.

Veza	Funkcionalna grupa	Specifična podgrupa	Položaj apsorpcionog maksimuma (cm^{-1})	Izgled
C–H	alkil	metil	1260	jaka
			1380	slaba
			2870	srednje jaka
			2960	srednje jaka
		metilen	1470	jaka
			2850	srednje jaka
			2925	srednje jaka
		metin	2890	slaba

Veza	Funkcionalna grupa	Specifična podgrupa	Položaj apsorpcionog maksimuma (cm ⁻¹)	Izgled	
	vinil	C=CH ₂	900	jaka	
			2975	srednja	
			3080	srednja	
		monosupstituisani alkeni	C=CH	3020	srednja
			900	jaka	
			990	jaka	
			cis-orijentisani alkeni	670–700	jaka
			trans-orijentisani alkeni	965	jaka
	trisupstituisani alkeni		800–840	srednje jaka	
	aromatični		benzen	3070	slaba
		monosupstituisani benzen	700–750	jaka	
			690–710	jaka	
		orto-disup. benzen	750	jaka	
		meta-disup. benzen	750–800	jaka	
			860–900	jaka	
	para-disup. benzen	800–860	jaka		
	alkini		3300	srednja	
	aldehidi		2720	srednja	
			2820		
	C=C	aciklična C=C	monosup. alkeni	1645	srednja
1,1-disup. alkeni			1655	srednja	
cis-1,2-disup. alkeni			1660	srednja	
trans-1,2-disup. alkeni			1675	srednja	
trisup, tetrasup, alkeni			1670	slaba	
konjugovana C=C		dieni	1600	jaka	
			1650	jaka	
sa benzenovim prstenom			1625	jaka	
sa C=O			1600	jaka	
C=C (sp ²)			1640–1680	srednja	
aromatični C=C		1450	slabo jaka		
		1500			
		1580			
		1600			
C≡C		alkini	2100–2140	slaba	
	disupst. alkini	2190–2260	veoma slaba		

Veza	Funkcionalna grupa	Specifična podgrupa	Položaj apsorpcionog maksimuma (cm ⁻¹)	Izgled
C=O	aldehidi/ketoni	zasićen alif./prsten 6-člani	1720	
		α,β-izomeri	1685	
		Aromatični ketoni	1685	
		5-člani prsten	1750	
		4-člani prsten	1775	
		aldehidi	1725	
	derivati karboksilne kiseline	zasićene karboksilne kiseline	1710	
		nezasićene/aromatične karb. kiseline	1680–1690	
		estri	1735	
		anhidrati	1760	
			1820	
		acil halidi	1800	
		amidi	1650	amidna
		karboksilati	1550–1610	
aminokiselinski zwitter joni	1550–1610			
O–H	alkoholi, fenoli	mala koncentracija	3610–3670	
		velika koncentracija	3200–3400	široka
	karboksilne kiseline	mala koncentracija	3500–3560	
		velika koncentracija	3000	široka
N–H	primarni amini		3400–3500	jaka
			1560–1640	jaka
	sekundarni amini		>3000	slabo srednja
	amonijum jon		2400–3200	široka
C–O	alkoholi	primarni	1040–1060	jaka, široka
		sekundarni	~1100	jaka
		tercijarni	1150–1200	srednja
	fenoli		1200	
	etri	alifatični	1120	
		aromatični	1220–1260	
	karboksilne kiseline		1250–1300	
	estri		1100–1300	preklapaju se

Veza	Funkcionalna grupa	Specifična podgrupa	Položaj apsorpcionog maksimuma (cm ⁻¹)	Izgled	
C–N	alifatični amini		1020–1220	preklapaju se	
	C=N		1615–1700	Preklopljena karbonilnom	
	C≡N		nekonjugovani	2250	srednja
			konjugovani	2230	srednja
	R–N–C		2165–2110		
	R–N=C=S		2140–1990		
C–X	<u>fluoroalkani</u>		1000–1100		
		triflourmetil	1100–1200	dublet	
	<u>hloroalkani</u>		540–760	srednje slaba	
	<u>bromoalkani</u>		500–600	Srednje jaka	
	<u>jodoalkani</u>		500	srednje jaka	
N–O	nitro jedinjenja	alifatična	1540	jaka	
			1380	slaba	
		aromatična	1520	konjugovana	
			1350		
P–C	organofosforna jedinjenja	aromatična	1440-1460	srednja	
P–O	Fosfor oksid	vezan	1195-1250	jaka	



Talasna dužina (cm^{-1})

Talasna dužina (cm^{-1})

Talasna dužina (cm^{-1})

Talasna dužina (cm^{-1})

Grafikoni 4.6.1. Reprezentativni prikazi IC spektrometrije četiri grupe pacijenata (crvena linija predstavlja spektar tumorskog tkiva, dok crna predstavlja spektar zdrave mukoze): a) starije žene, b) stariji muškarci, c) sredovečni muškarci i d) sredovečne žene.

Vizuelno je uočljivo da površine I, II i III imaju veće vrednosti za zdravo tkivo, a površina ispod pika u četvrtoj oblasti ima veće vrednosti za bolesno tkivo. Na spektrima zdravog i bolesnog tkiva se uočavaju razlike u obliku i visini pikova na određenim talasnim brojevima. Te promene su uzrokovane promenama u strukturi biomolekula koji grade tkivo, kao što su DNK, proteini, lipidi i voda.

Površina I: U oblasti između 1128 cm^{-1} i 1205 cm^{-1} se javlja više pikova srednjeg intenziteta. Trake u spektru koje potiču od vibracionih oscilacija nisu dobro razložene. Sumirani rezultati pokazuju da je površina kod zdravog tkiva veća u odnosu na kancerogeno tkivo. Sa spektara je uočljivo da pik koji se javlja na $\sim 1100\text{ cm}^{-1}$ kod svih zdravih tkiva ima intenzitet približno 2, a kod tkiva tumora 1. Niže frekventni pikovi iz ove oblasti pokazuju veći intenzitet kod malignog tkiva, ali je to nedovoljno da celokupna površina bude veća.

Površina II: Ovaj deo obuhvata interval između 1722 cm^{-1} do 1795 cm^{-1} . Na spektrima zdravog tkiva svih deset pacijenata javlja se pik jakog intenziteta. Kod kancerogenog tkiva ovaj pik je pomeren ka nižim frekvencijama i razložen na dva pika znatno nižeg intenziteta. Sumarno, uzorci zdravog tkiva pokazuju veću vrednost površine.

Površina III: Ovo je oblast od 2750 cm^{-1} do 3055 cm^{-1} . U ovom intervalu se javlja dublet velikog intenziteta. Na spektrima kancerogenog tkiva intenzitet, a samim tim i površina je znatno manja. Kod pacijenata 4 i 5 spektri se poklapaju, što implicira nepodobnost uzoraka.

Površina IV: Interval talasnih brojeva od 1483 cm^{-1} do 1722 cm^{-1} je poslednji razmatran, jer su rezultati u ovoj oblasti suprotni onima dobijenim razmatranjem prethodne tri oblasti frekvencija. Kod zdravog tkiva u ovoj oblasti se javlja vibraciona traka niskog intenziteta nerazložene strukture, tj. pikovi nisu oštri. U uzorku kancerogenog tkiva na spektrima dolazi do pojave dva pika, koji su identični kod svih pacijenata i imaju intenzitet približno 2.

Izračunata je i ukupna površina prve tri oblasti, u kojima su spektri analogni. Rezultati su prikazani u tabeli 4.6.2.

Tabela 4.6.2. Rezultati sumirani na srednje vrednosti za zdravo i kancerogeno tkivo.

tkivo	P _I		P _{II}		P _{III}		P _{I+II+III}		P _{IV}		A at 1238	
	\bar{X}	SD	\bar{X}	SD	\bar{X}	SD	\bar{X}	SD	\bar{X}	SD	\bar{X}	SD
tumor	0,0599	0,0184	0,0686	0,0135	0,1232	0,1057	0,2516	0,1356	0,3511	0,1167	1,0530	0,0419
zdravo	0,0917	0,0190	0,0941	0,0177	0,2986	0,1214	0,4844	0,1574	0,1921	0,1142	1,0624	0,0674
p vrednost (t-test)	0,0013		0,0020		0,0029		0,0023		0,0064		0,7139	

5. DISKUSIJA

Makroelementi čine oko 96% ukupnih elemenata u ljudskom telu, dok su preostalih 4% mikroelementi, tj. elementi u tragovima (193). Mnogi metabolički i fiziološki procesi u našem telu zahtevaju ove elemente. Uprkos svom prisustvu u manjim količinama, mikroelementi imaju ogroman uticaj na mnoge fiziološke funkcije, uključujući posredovanje u vitalnim biohemijskim reakcijama delujući kao kofaktori za mnoge enzime, stabilizujući strukture enzima i proteina, kontrolišući važne biološke procese vezivanjem za molekule na receptorsko mesto ćelijske membrane, i menjajući strukturu ćelijske membrane kako bi sprečili ulazak neželjenih molekula u ćeliju (193, 194). Poremećaj ravnoteže u sastavu različitih elemenata primećen je kod mnogih bolesti uključujući bolesti srca, autoimunih bolesti, karcinoma, bubrežnih slabosti i neuroloških poremećaja (195, 196).

Nagomilavanje ili nedostatak nekih od ovih elemenata može stimulisati razvoj KRKa. Nekoliko elemenata u tragovima se smatra hemijskim kancerogenima koji mogu promeniti biološke procese i izazvati kancerogene efekte (197, 198). Ovi genotoksični karcinogeni su sposobni da izazovu višestruke mutacije u kritičnim genima u ljudskom telu što može dovesti do razvoja raka (197, 198). Osim svoje genotoksične uloge, elementi u tragovima su takođe prijavljeni i kao negenotoksični kancerogeni (199) koji deluju preko sekundarnih mehanizama kao što su promoteri tumora (200), endokrini modifikatori (201), posrednici receptora (202), imunosupresivi (203), ili induktori tkivno specifične toksičnosti i inflamatornih odgovora (204).

Imunološki sistem je jedan od odbrambenih mehanizama protiv raka koji upravlja brojnim funkcijama nakon abnormalne transformacije ćelija (205). Dosadašnja istraživanja su isticala jaču funkciju imunološkog sistema kao odgovor na malignitet prisustvom elemenata u tragovima kao što su cink (Zn), selen (Se) i mangan (Mn) (206-208).

Učešće makro i mikoelemenata u višestrukim procesima rasta i inhibicije raka pokrenulo je potragu za rasvetljavanjem njihove suštinske važnosti, kao i toksičnih efekata na ljudsko zdravlje (198).

U našem istraživanju se pokazala značajna razlika u nivoima elemenata između tumorskog tkiva i zdrave mukoze, između ostalih i K, Na, Ca, Mg, Se, Zn, Hg, Cd (209).

Esencijalni elementi kao što su Se (naši rezultati su pokazali veći nivo u tumorskom tkivu) i Zn (veći nivo u zdravom tkivu) imaju značajnu ulogu u imunološkom statusu (206, 210), i utvrđivanje njihovog viška ili manjka može imati potencijalni prognostički značaj kod malignih bolesnika.

U našem istraživanju tumorsko tkivo je pokazalo niže nivoe cinka u odnosu na zdravu mukožu creva (209). Isto tako je i tumorsko tkivo muškaraca pokazalo niže koncentracije cinka, dok između uzoraka ženskih pacijenata nije bilo značajne razlike u koncentracijama cinka (209). Cink je veoma važna komponenta u više od 300 enzima, od kojih su mnogi od životnog značaja za sintezu DNK i RNK, takođe je i esencijalni element za normalnu funkciju imunskog sistema (211). Cink, zajedno sa manganom i bakrom, je krucijalni deo prve linije enzimske antioksidativne zaštite-superoksid dizmutaza (SOD) (212, 213). Jedna studija je našla značajno nižu aktivnost antioksidativnih enzima, zajedno sa značajno većom aktivnošću pro-oksidativnih enzima u KRK u odnosu na zdrave kontrole (213). Sa druge strane, u prevelikim koncentracijama, cink i bakar, pokazuju pro-oksidativne karakteristike, stvarajući reaktivne kiseonične vrste (ROS) i time indukuju oštećenje ćelije (214, 215). Pokazano je da cink može da prouzrokuje zastoj u rastu ćelija KRK time što narušava stabilnost ćelijskih mikrotubula i stabilizuje nivoe divljeg tipa proteina adenomatozne polipoze kolona (APC protein) (216). U sličnim studijama postoje razlike u nivoima cinka između tumorskog i zdravog tkiva, gde neke od tih studija nisu pronašle značajnu razliku (212, 217), dok je jedna novija studija iznela podatke o nižim nivoima cinka u tumorskom tkivu (218). Iznešena je pretpostavka, da se u metastazama KRK u jetri u odnosu na zdravo tkivo jetre, niže koncentracije cinka mogu objasniti povećanim iskorišćavanjem cinka od strane tumorskih ćelija, kao i izmenama u transporterima cinka (219, 220), te ovaj mehanizam bi mogao da objasni i niže koncentracije cinka u tumorskom tkivu i u našoj studiji. Nadalje, kako cink ima bitnu ulogu u prethodno navedenim procesima, moguće je da bi

niži nivoi ovog elementa mogli promovisati napredovanje kolorektalnog karcinoma zbog oslabljene antioksidativne odbrane, smanjenog imunološkog odgovora i poremećene sinteze DNK.

Kao i u jednoj prethodnoj, sličnoj studiji, i mi smo pokazali značajno veće koncentracije bakra u malignom tkivu (209, 212). Koncentracije bakra su bile značajno više u tumorskom tkivu muškaraca, dok kod žena nije bilo značajne razlike. Druge studije su pokazale povišene vrednosti koncentracije bakra u različitim humanim tumorima, uključujući tumor dojke i limfome, i mnoge od njih su isticale ulogu bakra u angiogenezi, krucijalnom događaju u razvoju karcinoma (212, 221-223). Takođe je, u studiji koja je istraživala i bakar, između ostalih elemenata, kod karcinoma štitaste žlezde i njenih benignih oboljenja, pronađen značajno veći serumski nivo bakra u grupi pacijenata za karcinomom štitaste žlezde u odnosu na grupu sa benignim stanjima štitaste žlezde (224). Pokazano je da su soli bakra stimulatori migracije endotelijalnih ćelija i induktori sinteze fibronektina, glikoproteina povezanog sa angiogenezom (225, 226), stoga je jasno zašto su helatori bakra jedni od jedinjenja koji se ispituju u kliničkim studijama kao inhibitori angiogeneze (226). Zajedno sa značajno nižim nivoima cinka, povišene koncentracije bakra mogle bi da budu obeležje invazivnosti KRK kod muškaraca.

U prethodnim studijama je primećeno da je odnos Cu/Zn u serumu povećan u KRK-u i mogao bi biti dobar prediktor za invazivnost i prognozu određenih karcinoma (227-229). Ovaj odnos smo i mi izmerili u KRK i u susednom zdravom tkivu. Koliko znamo, nijedna druga studija nije uporedila ovaj odnos u malignom i zdravom tkivu (209). Odnos Cu/Zn je bio značajno veći u malignom tkivu u našoj studiji, a takođe je bio veći kod muškaraca, kako kod starijih tako i kod sredovečnih. Kod ženskih pacijenata razlika u odnosu Cu/Zn između malignog tkiva i zdravog tkiva nije bila značajna. Uloga odnosa bakra i cinka u tkivu KRK-a zahteva dodatna istraživanja, ali naši rezultati ukazuju na to da bi, poput serumskog Cu/Zn odnosa, ovaj odnos u tkivu takođe mogao biti dobar prediktor agresivnosti karcinoma i, verovatno, loše prognoze (209).

Naše istraživanje pokazalo je značajno veću koncentraciju selena u malignom tkivu u poređenju sa susednim zdravim tkivom (209), što je u skladu sa rezultatima sličnih studija (212). U fiziološkim, niskim koncentracijama, Se je neophodan za ljude, ali u većim koncentracijama pokazuje toksične osobine (230-232). Još 1933. godine su u SAD-u stočari primetili trovanje stoke nakon ispaše na poljima sa biljkama bogatim selenom (230). Nakon tog prvog opažanja i višedecenijskih istraživanja, iznete su sledeće tvrdnje o razlozima zbog kojih selen može biti toksičan: prva je da jedinjenja selena, odnosno selenit i selen dioksid, mogu da reaguju sa glutationom (GSH) i drugim tiolima, formirajući selenotrisulfide koji će stupati u dalje reakcije i na kraju dovesti do stvaranja superoksida i vodonik peroksida. Druga je da se diselenidi, odnosno selenocistin i selenocistamin, u prisustvu GSH i drugih tiola, redukuju u selenole (RSeH), koji imaju katalitičko dejstvo i na kraju stvaraju superoksid i vodonik peroksid. Jedinjenja selena koja ne reaguju sa tiolima, selenati ili selenoetri, u in vitro eksperimetnima nisu pokazali sposobnost proizvodnje superoksida ili vodonik peroksida, i oni su toksični, u ćelijskim kulturama ili in vivo, tek nakon redukcije u selenit ili selenol. Na kraju se može reći da se toksičnost selena manifestuje akutno ili hronično, kada oksidativno oštećenje premašuje antioksidativnu odbranu ili kada oksidativno oštećenje premaši sposobnost organizma da formira selenoproteine, selenoetre ili elementarni selen (230).

Pretpostavljeni mehanizam antitumorskog efekta selena se odvija preko povećane ekspresije antioksidativnih selenoproteina. Ovi proteini doprinose antioksidativnom, odbrambenom sistemu ćelije, pre svega sprečavajući oštećena DNK (210). Selenoprotein glutation peroksidaza (GPX2) pripada grupi gena koji su karakteristični za matične ćelije creva i pretpostavlja se da štite ove ćelije od oksidativnog oštećena DNK. Kada se kod miševa GPX2 gen isključi, dolazi do apoptoze matičnih ćelija koje se nalaze na dnu intestinalnih kripti (233). Nasuprot zdravim ćelijama, tumorske ćelije imaju veći metabolički obrt nego zdrave ćelije, čime se stvara više slobodnih radikala, što predstavlja jedno od glavnih obeležja karcinoma. (234). Kako bi se održala ravnoteža, tumorske ćelije zahtevaju antioksidativne molekule/enzime, kao što su, između ostalih, i selenoproteini (210). Jedna od karakteristika tumorskih ćelija su i razlike u ekspresiji gena za selenoproteine (235). Za određene gene se javlja veća ekspresija (GPX2 i TXNRD3), dok je za druge (GPX3, SELENOP, SELENOS, i selenofosfat sintaza 2 (SEPHS2)) manja (236). Međutim, pojedini autori nisu dobili povezanost

između dostupnosti selena u organizmu (serumski nivo selena) i ekspresije gena za selenoproteine (237), što su kasnije objasnili činjenicom da je transkripcija gena za selenoproteine u veoma maloj meri regulisana nivoom selena u organizmu (210). Isti autori tvrde da se jedni selenoproteini "bore" protiv već razvijenih tumorskih ćelija, dok drugi podstiču njihovo preživljavanje (210).

Postoji dosta suprotstavljenih podataka o ulozi Se u karcinogenezi, i još uvek nedovoljno istraženih činjenica. Na osnovu svega iznetog, pretpostavljamo da usled povećanog oksidativnog stresa, uzrokovanog ubrzanom deobom i metabolizmom malignih ćelija, dolazi do povećane ekspresije selenoproteina, kao jedan od mehanizama odbrane, i to predstavlja antitumorsku osobinu selena (209). Međutim, kada oksidativno oštećenje premaši odbrambenu sposobnost ćelija ili sposobnost ćelija da formiraju jednjenja selena koja ne reaguju sa tiolima, dolazi do porasta koncentracije Se i njegovog toksičnog efekta, tj. tada Se dodatno podstiče oksidativni stress, pre svega stupajući u reakciju sa tiolima i time stvaraju još slobodnih radikala (209).

U našoj studiji nije bilo razlika u koncentracijama gvožđa (Fe) i mangana (Mn) između malignog i zdravog tkiva creva (209), iako su druge studije pokazale značajno niže koncentracije gvožđa i više nivoe mangana u kolorektalnom karcinomu (212, 218, 238, 239). Uloga Mn i Fe u karcinogenezi može se posmatrati kroz njihovu ulogu u inhibiciji apoptoze, stvaranju kiseoničnih radikala i vezivanju suprotstavljenih jona metala u hromatinu i drugim molekulima. Takođe, životinjski modeli otkrili su povezanost između parenteralne primene gvožđa sa rastom tumora i većom učestalošću tumora (212, 240-243). Nedostatak značajnih razlika u nivoima Fe i Mn u našoj studiji mogao bi proizaći iz ograničenog broja uzoraka i regionalnih razlika, mada se njihova uloga u kolorektalnom karcinomu ne sme zanemariti.

Značaj makroelemenata u brojnim fiziološkim procesima je odavno poznat (244). Poremećaj njihovog sastava u obolelom tkivu ukazuje upravo na poremećaj ovih osnovnih procesa. Naše istraživanje je pokazalo značajno niže nivoe Na, a visoke nivoe K u tumorskom tkivu, što ukazuje na poremećaj Na/K pumpe u tumorskim ćelijama (209). Kako u tumoru dolazi do promene metabolizma, i proizvodnje energije anaerobnim putem, koji je znatno manje efikasan od aerobnog, a jonske pumpe su veoma osetljive na uskraćivanje energije (245, 246), u slabijim energetskim uslovima jonske pumpe su te koje prve propadaju. Takođe visoke koncentracije Ca u tumorskom tkivu, što je rezultat i našeg istraživanja, govori u prilogu otkazivanja još jedne jonske šumpe, Ca ATPaze, usled siromašnosti energetskim susprtrtima i smanjenje energetske proizvodnje u tumorskom tkivu (247). Ovaj nalaz takođe može biti znak povećane nekroze u tumorskom tkivu, koji za sebe vezuje Ca, i može biti znak lošije prognoze zbog ubrzanog odumiranja tkiva.

Naše istraživanje je pokazalo značajno niže nivoe natrijuma u tumorskom tkivu u odnosu na zdravu mukozu (209). Pretraživanjem dostupne literature nismo našli druge studije koje su se bavile merenjem natrijuma u tumorskom tkivu. Dobijeni rezultat mogao bi se tumačiti na više načina. Pre svega tumorsko tkivo se karakteriše smanjenim energetskim potencijalom (247). Jonske pumpe, kao što je Na/K ATPaza, sprovodeći jone nasuprot gradijentu koncentracije troše dosta energije, i u ovakvim uslovima smanjene proizvodnje energije brzo stradaju (246), dovodeći do nižih koncentracija Na u ekstracelularnom prostoru, a više kalijuma. Isto tako prethodna istraživanja su pokazala veoma značajnu ulogu voltažno zavisnih Na kanala u karcinogenezi, od same maligne transformacije ćelije do metastaziranja (248, 249). Dokazano je da u tkivu kolorektalnog karcinoma postoji veća ekspresija ovih kanala (248), što bi moglo objasniti manju koncentraciju natrijuma u našim uzorcima KRKa. Pojedini autori ističu da voltažno zavisni natrijumski kanali dovode do proliferacije i metastaziranja KRK putem Ca^{2+} /kalmulin-zavisnog Ras signalnog puta, i da isti ovi kanali mogu podstaći apoptozu stimulisano 5-fluorouracilom (5-FU) (249). Klinički značaj ove činjenice je u tome da pacijenti sa povećanom ekspresijom gena za voltažno zavisne natrijumske kanale imaju lošiju prognozu, ali da isto tako mogu imati veću korist od primene 5-FU kao citostatika (249). Na osnovu ovoga možemo izneti pretpostavku da značaj određivanja nivoa natrijuma u tkivu može posredno ukazivati na prognozu bolesti i eventualnu korist od pojedinih citostatika.

Kalijum je bio značajno veći u malignom tkivu u poređenju sa zdravim susednim tkivom u našoj studiji (209). Postoji veliki broj radova koji se bavio nivoima kalijuma u kolorektalnom

karcinomu. Naši rezultati su u skladu sa onima iz prethodne dve studije (212, 250) koje su, između ostalih, istraživale nivo kalijuma u tkivu KRK u poređenju sa zdravim kolorektalnim tkivom. Poznato je da tumorske ćelije imaju velike metaboličke potrebe za energijom koja podstiče njihovu deobu i rast, a takođe jedan od predloženih novih obeležja karcinoma je njegova sposobnost da ponovo programira energetske metabolizam (247). Povećani unos i upotreba glukoze putem glikolize dokumentovani su u mnogim tumorima kod ljudi (247). Pokazano je da je jedan od kardinalnih glikolitičkih enzima, piruvat kinaza M2, značajno povišen u uzorcima karcinoma debelog creva u poređenju sa zdravim kontrolama, i zna se da kalijum igra jednu od ključnih uloga u funkcionisanju ovog glikolitičkog enzima (251). Dakle, aktivnost ovog enzima bi svakako imala koristi od visokog sadržaja kalijuma u tumorskom tkivu.

U poređenju sa malignim tkivom, nivo kalcijuma je bio značajno veći od susednog zdravog tkiva. Takođe, ovo je bio jedini element u našoj studiji koji je pokazao značajnu razliku u koncentraciji u malignom tkivu između muškaraca i žena (209). Većina uzoraka u našoj studiji pripadala je pacijentima sa stadijumom III KRK-a. Nekroza u kanceroznom tkivu često je prisutna, pogotovo u naprednim stadijumima, i poznato je da nekrotično tkivo ima sklonost ka akumulaciji kalcijuma. Moguće je da je većina uzoraka u našoj studiji imala polja nekrotičnog tkiva i to bi moglo biti moguće objašnjenje viših nivoa Ca u tumorskih uzorcima u odnosu na zdrave. Takođe, poznata je činjenica da je veća unutarćelijska koncentracija kalcijuma povezana sa aktiviranjem kalcijum zavisnih enzima, između ostalih i endonukleaze, koja može dovesti do oštećenja genetskog materijala. Poznato je da je maligno tkivo siromašno energetskim supstratima (247). To utiče na enzimski sistem Ca – ATPaza, i to dovodi do unutarćelijske akumulacije ovog elementa. Iupravo visoki intracelularni nivoi kalcijuma izazivaju ćelijsko oštećenje različitim procesima.

U našoj studiji nivoi magnezijuma bili su veći u tumorskom tkivu u poređenju sa susednim zdravim tkivom (209). In vitro studije su pokazale unutarćelijsku akumulaciju magnezijuma u neoplastičnim ćelijama (252). Prethodni rezultati, koji povezuju Mg sa angiogenezom, posebno sa funkcijama vaskularnog endotelnog faktora rasta (VEGF) i migracijom endotelnih ćelija (253). Budući da je angiogeneza jedno od obeležja karcinoma (247), odnos između povišenog Mg u tkivu KRKa i ovog, ključnog procesa za rast tumora i njegovu malignu transformaciju, treba uzeti u obzir.

Značaj u poremećaju sastava teških elemenata i njihov uticaj na organizam i ulogu u razvoju karcinoma je odavno poznat i predmet interesovanja istraživača (254, 255). U našem istraživanju pokazali smo značajno veće koncentracije u zdravom tkivu nekih od tih elemenata (Cd, Hg) (209). Ovaj nalaz može biti kontradiktoran kada se uzme u obzir dobro poznat štetan uticaj teških elemenata, ali treba naglasiti da je naš uzorak relativno mali, kao i da postoji različita izloženost ovim elementima između naših pacijenata. Zato je potrebno dugotrajno praćenje, na većoj grupi ljudi, sa relativno ujednačenim faktorima rizika, kako bi se preciznije odredio značaj ovih elemenata u razvoju i progresiji KRK.

U našem istraživanju nivo hroma (Cr) bio je značajno niži u tumorskom tkivu u poređenju sa zdravim tkivom. Nije bilo razlika u nivoima Cr malignog tkiva između muškaraca i žena ili između različitih starosnih grupa (209). Nedavna studija pokazala je veće nivo Cr u tkivu KRK u poređenju sa zdravim susednim tkivom (218). S druge strane, Rinaldi i saradnici su prikazali rezultate u kojima nema razlike u nivoima Cr između kancerogenog tkiva i zdravih kontrola, kao i niže nivo Cr u KRK tkivu u poređenju sa susednim zdravim tkivom (217). Ova grupa autora pretpostavlja da su nivoi Cr u malignom tkivu, susednom netumorskom tkivu i kod zdravih kontrola pre rezultat spoljnih izvora Cr, nego unutrašnjih, metaboličkih procesa (217). Dosadašnje studije su isticale uloge Cr u procesima karcinogeneze na više nivoa. Određeni joni hroma učestvuju u stvaranju kovalentnih veza sa makromolekulima (256), izazivaju genske mutacije (256, 257), dok na ćelijskom nivou, izlaganje jonima Cr može dovesti do zaustavljanja ćelijskog ciklusa, apoptoze, prestanka diferencijacije ćelija i neoplastične transformacije (256). Hrom takođe učestvuje u inflamatornim procesima, stimulišući oslobađanje medijatora zapaljenja i indukujući apoptozu makrofaga (258).

Na osnovu prethodnih studija, uloga hroma u karcinogenezi je u velikoj meri objašnjena, ali i dalje postoje različiti rezultati kada se radi o nivoima hroma u tkivima pacijenata. Budući da je

predloženo da Cr može biti uključen u procese koji pogoduju progresiji tumora (257, 259) njegovu ulogu u evoluciji kolorektalnog karcinoma treba pažljivo ispitati u budućim studijama.

Postoji veliki broj studija koje su ispitivale razlike u nivoima žive (Hg), olova (Pb) i arsena (As) između zdravog i malignog kolorektalnog tkiva. U našoj studiji, nivoi žive bili su značajno manji u tumorskom tkivu u poređenju sa zdravim tkivom, dok nije bilo značajnih razlika u nivoima Pb i As između zdravog i malignog tkiva debelog creva (209). Izloženost žive označena je kao faktor rizika za kolorektalni karcinom i predloženo je da viši nivoi Hg i Pb mogu da promoviraju pojavu i progresiju gastrointestinalnog karcinoma, što je pokazano u nedavnoj kineskoj studiji (260). Živa ima sposobnost da izazove velika biološka oštećenja kod ljudi, prvo inhibicijom enzima, potom proizvodnjom slobodnih radikala i promenom tercijarnih i kvartenernih struktura većine proteina (255, 261). Uprkos dobro dokumentovanoj toksičnosti žive i njenoj ulozi u kardiovaskularnim bolestima i neurodegenerativnim poremećajima, nema dovoljno podataka o odnosima Hg i kolorektalnog karcinoma. Prisustvo ovog elementa u životnoj sredini u različitim oblicima i raznoliku izloženost živi u našem regionu treba uzeti u obzir pri tumačenju viših nivoa žive u tkivu karcinoma kolona i rektuma.

Nivoi kadmijuma (Cd) bili su značajno niži u tumorskom tkivu u poređenju sa zdravim tkivom u našoj studiji (209). Cd je verifikovani kancerogen za ljude (262). Veruje se da je ovaj element uključen u različite procese kao što su stvaranje reaktivnih kiseoničnih vrsta (ROS), inhibicija apoptoze, inhibicija mehanizma popravljavanja DNK i supresija ekspresije gena (254). Pokazalo se da je nivo Cd povišen u tkivima karcinomima dojke i pluća u poređenju sa zdravim kontrolama (263, 264), ali druge studije nisu pokazale razlike u nivoima Cd u jetri (265). S druge strane, nema mnogo studija koje su istraživale njegovu ulogu u karcinogenezi kolorektalnog karcinoma. Jedna studija (266) je otkrila niže nivoe Cd u kolorektalnim polipima, za koje se zna da nose rizik od maligne transformacije u kolorektalni karcinom (267). Tačno objašnjenje nižeg nivoa Cd u malignom tkivu u našoj studiji moglo bi se naći u različitim tipovima uzoraka, maloj kohorti i promenljivoj izloženosti kadmijumu u životnoj sredini u našem regionu.

Uočili smo pozitivne korelacije između As i Cd, i As i Hg u tumorskom tkivu, dok ove korelacije nisu bile prisutne u susednom zdravom tkivu debelog creva. Štaviše, pronašli smo uglavnom negativne korelacije između ovih toksičnih elemenata i esencijalnih elemenata i u KRK-u i u zdravom tkivu kolona i rektuma (209). Ove korelacije treba koristiti u daljim studijama kako bi se utvrdio mogući negativni efekat pomenutih toksičnih elemenata i elemenata uključenih u antioksidativnu odbranu na razvoj KRK. S druge strane, korelacija između Hg u malignom i Hg u zdravom tkivu bila je najjača pozitivna korelacija između ovih tkiva.

Budući da je uloga As, Cd i Hg u karcinogenezi dobro dokumentovana, a svi se smatraju vrlo važnim agensima kojima je čovek izložen na radnom mestu i u životnoj sredini, trebalo bi istražiti njihov međusobni odnos i potencijalne agonističke efekte u razvoju ili progresiji KRK-a. Takođe, s obzirom da postoji dovoljno informacija o Hg i KRK, uočena najjača korelacija između Hg u malignom i Hg u zdravom tkivu trebalo bi da podstakne detaljniju analizu uloge Hg u KRK.

Ova studija ima nekoliko ograničenja. Pre svega, kako bi se dobili validniji rezultati koji odražavaju promene u sastavu elemenata u KRK-u u poređenju sa zdravim kolorektalnim tkivom, potrebna je veća kohorta, posebno kada se uzrast i pol pacijenata smatraju potencijalnim uzrocima različitih nivoa elemenata između malignih i nemalignih tkiva. Moraju se uzeti u obzir različiti načini života, faktori sredine i brojne druge karakteristike (status pušenja, prehrambene navike, fizičke i radne aktivnosti, stambeno okruženje i stres), jer je poznato da ti faktori imaju ogroman uticaj na mnoge (pato) fiziološke procese u ljudskom telu. Budući da se kod različitih onkoloških pacijenat primenjuju različite terapijske strategije, različiti tretmani lekovima, zajedno s prethodno propisanim lekovima za različita stanja od kojih se pacijent od ranije leči ne treba ih zanemariti ni u jednom istraživanju koje ispituje nivoe elemenata i procese koje regulišu. Konačno, potrebno je istaći da studije koje slede treba da odgovore na pitanje, da li promene u sastavu hemijskih elemenata imaju ulogu u karcinogenezi ili su te promene posledica same bolesti.

U našoj studiji smo pokazali značajnu razliku u serumskoj koncentraciji mokraćne kiseline, gde su je muškarci imali značajno više u odnosu na žene, a značajna razlika se pokazala u četiri formirane grupe po polu i godinama, gde su stariji i sredovečni muškarci imali značajno više vrednosti u odnosu na starije i sredovečne žene. Ovi rezultati se poklapaju sa drugim studijama koji su ispitivali nivo mokraćne kiseline kod drugih, nemalighnih oboljenja, u kojima su muškarci imali veće vrednosti, i da su mlađi muškarci imali nešto veće vrednosti od starijih ispitanika (268-270). Ispitujući vrednosti mokraćne kiseline po stadijumima tumora, i brojim patohistološkim parametrima koji su navedeni u rezultatima, nismo dobili značajnu razliku. Prema našim saznanjima ovo je prva studija koja je ispitivala povezanost serumskih vrednosti mokraćne kiseline sa jedne strane i T stadijuma, N stadijuma, M stadijuma tumora, prisustvo tumor badinga, tumorskih depozita, limfovaskularne, venske i perineuralne invazije sa druge strane. Međutim, brojne su studije koje su ispitivale povezanost mokraćne kiseline sa rizikom od nastanka raznih karcinoma (271, 272), kao i preživljavanje pacijenata sa KRK u odnosu na vrednosti mokraćne kiseline (273, 274). Kineski autori su pokazali da su povećane vrednosti mokraćne kiseline povezane sa većim sveukupnim rizikom od nastanka bilo koje vrste karcinoma (271), dok su engleski autori (272) išli korak dalje i ispitivali povezanost sa određenim karcinomima, i pokazali povećan rizik od nastanka, između ostalih karcinoma, i KRK kod ljudi sa većim koncentracijama mokraćne kiseline. Bez obzira na prilično ubedljive podatke ovih velikih preglednih radova i meta-analiza, uloga mokraćne kiseline ipak nije do kraja razjašnjena, jer postoje i suprotni podaci. Jedna studija koja je ispitivala prediktore preživljavanja pacijenata sa KRK je pokazala duže preživljavanje onih pacijenata sa visokim vrednostima mokraćne kiseline (273), dok drugo istraživanje povezuje porast serumske mokraćne kiseline sa progresijom KRK, te bi se ona mogla koristiti kao prognostički marker (274). Značajno ograničenje naše studije, osim relativno male studijske grupe, je i nedostatak kontrolne grupe, tj. grupe zdravih pacijenata sa kojom bismo uporedili vrednosti mokraćne kiseline.

U našoj studiji smo pokazali značajnu pozitivnu korelaciju između serumske mokraćne kiseline i dužine telomera leukocita periferne krvi. Prema našim saznanjima ovo je prva studija koja je ispitivala povezanost nivoa serumske mokraćne kiseline i dužine telomera perifernih leukocita kod pacijenata sa kolorektalnim karcinomom. Postoje studije koje su ispitivale povezanost ova dva parametara, ali kod pacijenata koji boluju od nemalighnih oboljenja, kao što je dijabetes (275), ili u gerijatrijskoj populaciji Evrope (276). Kao i u prethodnim istraživanjima vezanim za mokraćnu kiselinu, i ovde su dobijeni različiti rezultati. U prvoj je dobijena negativna povezanost mokraćne kiseline i dužine telomera u perifernim leukocitima (275), dok je studija koja je ispitivala gerijatrijsku populaciju Krita i Holandije dobila pozitivnu povezanost ova dva parametra (276). Kao što je i priroda mokraćne kiseline obeležena kao dvojna, tako se i naši rezultati mogu tumačiti dvojako. Ukoliko bi mokraćna kiselina imala antioksidativno dejstvo, takva njena zaštitna uloga bi eventualno dovela do stabilizacije genetskog materijala, tj. do relativnog produženja telomera, čime bi se objasnio naš rezultat da sa povećanjem nivoa serumske mokraćne kiseline, raste i dužina telomera leukocita periferne krvi. Može se spekulirati i da je kod naših pacijenata mokraćna kiselina imala prooksidativno dejstvo, i možda skratila telomere perifernih leukocita, ali da su oni usled povećane aktivnosti u sklopu imunskog odgovora na rast tumora, prevazišli problem skraćanja telomera i došli do stadijuma stabilizacije, odnosno produženja, telomera. Slična objašnjena bi se možda mogla dati i za rezultate kineske i holandske studije.

Kao što je već rečeno, kolorektalni karcinom je patofiziološki heterogeno oboljenje, izazvano brojnim mehanizmima koji se međusobno prepliću, od kojih je oksidativni stres samo jedan od njih. U našem istraživanju smo ispitivali određene biomarkere oksidativnog stresa u krvi i tkivu kolorektalnog karcinoma i susedne zdrave mukoze. Mokraćna kiselina je obeležena kao najvažniji neenzimski antioksidans u krvi čoveka (277, 278). Ona predstavlja završni proizvod metabolizma purina kod ljudi (277), i njen nivo može biti povezan sa nivoom purina koji se unosi putem ishrane (279). Zbog svoje ograničene rastvorljivosti u vodi, u uslovima njene povećane produkcije dolazi do kristalizacije i taloženja urata (kao npr. u gihtu) (277). Mokraćna kiselina se takođe proizvodi u uslovima ishemije/reperfuzije oksidacijom ksantina i hipoksantina uz pomoć enzima ksantin oksidaze (277). Još ranih osamdesetih godina je predloženo da mokraćna kiselina može imati biološki značaj

kao antioksidans i tad je pokazano u in vitro ogledima, da je ona veoma snažan čistač peroksil radikala ($RO_2\bullet$) i molekula kiseonika. Tada su autori izneli hrabru pretpostavku da mokraćna kiselina može doprineti dužini života ljudi pružajući zaštitu protiv oksidativnog stresa uzrokovanog starenjem i razvojem karcinoma (280). Sličan zaključak su izneli i autori iz SAD-a, izjavivši da povećane koncentracije mokraćne kiseline kod ljudi daju prednost u preživljavanju, jer hiperurikemija održava bolji krvni pritisak kada se ljudi suoče sa ishranom siromašnom solima (281). Mokraćna kiselina takođe može da štiti od oksidativnog stresa delujući kao donor elektrona, a predstavlja i oksidabilni supstrat za hem protein/vodonik peroksid sisteme (282). Osim toga može da deluje i kao helator jona gvožđa i bakra, pretvarajući ih u slabo reaktivne forme koje ne mogu da katalizuju reakcije slobodnih radikala (283-285). Još jedna od pretpostavljenih uloga mokraćne kiseline je i ta da je ona inhibitor slobodnih radikala koji se stvaraju prilikom raspadanja perokisnitrita ($ONOO\bullet$), koji je proizvod interakcije azot monoksida sa superoksidnim anjonom (286). Osim ovih, pozitivnih uloga mokraćne kiseline, postoje podaci i o mogućoj proinformatornoj ulozi ovog jedinjenja, pre svega u stimulaciji pojedinih medijatora inflamacije, kao i u stimulaciji proliferacije vaskularnih glatkih mišićnih ćelija (277).

Kako nismo određivali koncentraciju mokraćne kiseline kod zdravih bolesnika, iz ovih nalaza ne možemo izvoditi adekvatne zaključke u smislu uticaja mokraćne kiseline na nastanak tumora, a kako nije bilo razlike u koncentracijama mokraćne kiseline između stadijuma, i u svetlu prethodnih studija, možemo reći da je uloga mokraćne kiseline na progresiju karcinoma i dalje nejasna. Sa obzirom da se ističe dvojna uloga mokraćne kiseline, i prooksidativna i antioksidativna, pozitivna korelacija između dužine telomera leukocita periferne krvi i serumske mokraćne kiseline se može tumačiti dvojako, ali su potrebna dodatna istraživanja da bi se doneo pouzdaniji zaključak.

Pokazali smo razliku u koncentraciji malondialdehida (MDA) između tumorskog tkiva i zdrave mukoze, gde je u tumorskom tkivu bilo značajno većih količina MDA. Peroksidacijom membranskih lipida, koja je izazvana oksidativnim stresom, se stvara, između ostalih i MDA, koji se smatra jednim od najčešćih i najštetnijih produkata peroksidacije lipida (287). Do sada je pokazano da je MDA odgovoran za promene u genskoj ekspresiji, genetskim mutacijama, molekularnoj heterogenosti, kao i za poremećaje u unutarćelijskoj komunikaciji (288). MDA svoje štetno, mutageno, dejstvo ispoljava vezivanjem za guanin u DNK (289), i zbog svoje visoke reaktivnosti i toksičnosti ovo jedinjenje je veoma važno u ispitivanju karcinogeneze (290, 291). U malignom tumorskom tkivu dolazi do povećanog stvaranja reaktivnih vrsta kiseonika, porasta oksidativnog stresa, peroksidacije lipida i stvaranja njenih metabolita, kao što je MDA, što potvrđuju studije koje su ispitivale tkivo kolorektalnog karcinoma kod ljudi (278, 291, 292). Osim u tkivima, kod pacijenata sa KRK-om dolazi i do porasta MDA u serumu (293-295). Mi nismo ispitivali nivo serumskog MDA, ali se rezultati našeg istraživanja poklapaju sa rezultatima prethodnih studija da se kod pacijenata nalazi značajno veća koncentracija MDA u tkivima tumora kolona/rektuma u odnosu na zdravu mukozu. Naše istraživanje je potvrdilo činjenicu da u tumorskom tkivu dolazi do promene u metabolizmu ćelije, kao i do povećane peroksidacije lipida. U većini studija se, međutim pokazalo i da je nivo MDA povezan i sa stadijumom tumora, tačnije da je koncentracija MDA veća u više uznapređovalim stadijumima, kako u serumu, tako i u tumorskom tkivu (278, 291, 292). U jednoj studiji poljskih autora, nivoi MDA su bili niži u tumorima koji infiltrišu muskularis propriju zida creva (T2 tumorima), nego u tumorima koji dolaze do subseroze (T3 tumori), te je predloženo da se peroksidacija lipida povećava sa povećanjem dubine infiltracije tumora (291). Još jedna od uloga koja se pripisuje MDA je da može delovati kao karcinogen i promotor razvoja i progresije KRK (295), jer su povišene količine MDA nađene kod pacijenata sa izraženijim tumor badingom i prisutnim metastazama u limfnim čvorovima (291). Kod nas to nije bio slučaj. Rezultati kod naših pacijenata su pokazali da nema značajne razlike u koncentracijama MDA u odnosu na stadijum tumora, kako u pojedinačnim T, N ili M stadijumima, tako ni u stadijuma AJCC TNM sistema, niti između modifikovane Astler-Coller skale. Takođe nije bilo značajne razlike između pacijenata sa i bez tumor badinga, kao ni između grupa različite ispoljenosti tumor badinga. Ova diskrepanca između naših rezultata i rezultata prethodnih studija bi se mogla u određenoj meri objasniti donekle starijom studijskom populacijom, za koju se veruje da ima tumore slabijeg metastatskog potencijala (296),

kao i prisustvom većeg broja više uznapredovalih stadijuma tumora, čime nije bilo moguće dobiti preciznije poređenje. Ostali aspekti studija, kao što su načini prikupljanja uzoraka i biohemijska analiza tkiva, praktično su identični, sa veoma malim odstupanjem u veličini studijske populacije. Još jedan od patohistoloških parametara koji smo ispitivali, a koji govori u prilog agresivnosti tumora je i mucinozna komponenta tumora. Prema našim saznanjima ovo je prva studija koja je ispitivala povezanost parametara oksidativnog stresa i mucinozne komponente KRK kod ljudi. Naši rezultati nisu našli značajnu korelaciju između procenta mucinozne komponente i vrednosti MDA. Kada smo sve pacijente podelili na one do 50% mucinozne komponente tumora i one preko 50%, takođe nismo našli značajnu razliku u nivou MDA. Jedna studija koja je ispitivala koncentracije MDA u karcinomu želuca (297), je našla niže vrednosti MDA u tkivima mucinoznih adenokarcinoma želuca u odnosu na one koji nisu imali izraženu mucinoznu komponentu. Potrebna su dodatna istraživanja kako bi se adekvatno procenio značaj oksidativnog stresa u razvoju adenokarcinoma sa mucinoznom komponentom. Ispitivali smo i brojne parametre invazivnosti: infiltrativni i ekspanzivni rast tumora, limfo-vaskularnu invaziju, vensku invaziju i perineuralnu invaziju. Ni jedan od ovih parametara u našoj studiji nije imao uticaja na koncentraciju MDA. Kako su prethodne studije (278, 291, 292) pokazale porast parametara oksidativnog stresa kod tumora većeg stadijumima i dublje infiltracije, opravdana je pretpostavka da bi kod tumora koji imaju neku od navedenih karakteristika invazije mogli da očekujemo i porast parametara oksidativnog stresa, pre svega MDA, što naši rezultati nisu potvrdili. Što se tiče peritumorskog i intratumorskog limfocitnog odgovora, mi nismo našli značajnu razliku između grupa sa različitom izraženošću ovih parametara i MDA. Prema dostupnoj literaturi, do sada nije direktno ispitivana povezanost ovih parametara, ali je pronađena značajno veća aktivnost pro-oksidativnih enzima kod tumora sa izraženijim peritumorskim i intratumorskim odgovorom, što je objašnjeno povećanom produkcijom reaktivnih vrsta kiseonika usled povećanog dejstva pre svega makrofaga i neutrofila (291), što sve opet dovodi do intenzivnijeg oksidativnog stresa i peroksidacije lipida. Studija poljskih autora (278) je ispitivala mogućnost da se parametri oksidativnog stresa iskoriste kao indikator uznapredovalosti tumora, i pronašli su pozitivnu korelaciju između serumskih vrednosti tumor markera CEA (karcinom embrionalni antigen) i serumskog MDA, dok je kasnija studija istih autora (291) pronašla značajno veće količine MDA u tkivima KRK koji pokazuju znake veće uznapredovalosti. Mi nismo ispitivali serumske vrednosti MDA, ali kada smo poredili vrednosti CEA u serumu i koncentracije MDA u tkivima nismo našli značajnu povezanost, ali razlika između MDA u tkivima između tumora i zdrave mukoze koju smo pokazali, zajedno sa rezultatima prethodnih studija svakako ostavlja mogućnost da se vrednosti MDA koriste kao jedan od parametara stadijuma tumora.

Veoma je važna sposobnost malondialdehida da lako prelazi sa mesta svog stvaranja do udaljenih tkiva i formira kovalente veze sa proteinima i nukleinskim kiselinama, te on može da menja strukturalna i funkcionalna svojstva ćelije. Kako se tumor razvija, povećava se peroksidacija lipida, količina prisutnog MDA i njegova citotoksičnost, što pokazuju rezultati studija u kojima su nivoi MDA veći kod onih pacijenata koji imaju više uznapredovalu infiltraciju, izraženiji tumor bading, i prisutne nodalne i udaljene metastaze u odnosu na pacijente koji nemaju ove karakteristike KRK (291).

Osim koncentracije MDA ispitivali smo i aktivnost katalaze u našim uzorcima, međutim za razliku od drugih studija (291, 292) koje su pokazale razliku u aktivnosti katalaze, između uzoraka naših pacijenata nije bilo statistički značajne razlike. Katalaza predstavlja enzim koji je zastupljen kod svih organizama koji su izloženi kiseoniku, i ona ubrzava razgradnju vodonik peroksida, koji se stvara putem raznih reakcija i/ili supstanci iz prirode ili aktivnošću superoksid dizmutaze prilikom razlaganja supeoksid anjona, na vodu i kiseonik (298). Katalaza je veoma važan enzim u odbrani organizma od oštećenja nastalih oksidativnim stresom, a prouzrokovanih reaktivnim kiseoničnim vrstama. Očekuje se da će povećani oksidativni stres dovesti i do povećane aktivnosti katalaze, kao prilagođavanje na povećanu produkciju reaktivnih kiseoničnih vrsta (299). Situacija koju očekujemo je da će u tumorskom tkivu usled promene metabolizma i povećane inflamacije doći i do povećane aktivnosti katalaze, što je u pojedinim studijama i pokazano (291), pogotovo što je za katalazu pokazano da razgrađuje vodonik peroksid kada se on nalazi u visokim koncentracijama u tkivu, dok

je glutation peroksidaza ta koja razgrađuje H_2O_2 kada se on nalazi u nižim koncentracijama (300). Interesantno je da ima studija koje pokazuju značajno smanjenje aktivnosti katalaze u tumorskim tkivima (292, 301), koja se smanjivala kako je histološki gradus tumora napredovao, a takođe je i u većim stadijumima karcinoma njena aktivnost bila manja, sa najmanjom aktivnošću u četvrtom stadijumu i u mucinoznom adenokarcinomu (292). Međutim i ovde postoje suprotstavljeni nalazi, jer je pokazano da kod pacijenata sa prisutnim metastazama u limfnim čvorovima postoji značajno veća koncentracija katalaze u serumu u odnosu na pacijente sa negativnim čvorovima (278). Osim povećane aktivnosti katalaze u tumorskom tkivu KRK, već pomenuta poljska studija (291) pokazala je i manju aktivnost u KRK sa dominantnom mucinoznom komponentom koji se smatra agresivnijim tipom KRK, kao i manju aktivnost katalaze tumora sa manje izraženim peritumorskim i intratumorskim limfocitnim odgovorom. Ova poslednja činjenica možda je i očekivana, jer inflamatorne ćelije karakteriše povećana aktivnost superoksid dizmutaze, koja dovodi do povećanog stvaranja H_2O_2 , a samim tim i do povećane aktivnosti katalaze (302). U našoj studiji nije bilo razlike u aktivnosti katalaze između grupa sa različitim intratumorskim i peritumorskim inflamatornim odgovorom. Možemo pretpostaviti da je uzrok ovakvom rezultatu relativno mali uzorak pacijenata, kao i prilično stara starosna struktura ispitanika, te se zbog ovih karakteristika nije prikazala razlika u aktivnosti katalaze. Dodatna istraživanja, sa većim brojem pacijenata su potrebna, naročito ako se uzmu u obzir brojna druga oboljenja, pre svega inflamatornog karaktera, koja utiču na redoks status, kako bi se razjasnila uloga katalaze u patogenezi karcinoma kolona i rektuma.

U našem istraživanju nije bilo značajne razlike u koncentraciji NO između tumorskog tkiva i zdrave mukoze. Takođe, T, N i M stadijumi tumora nisu uticali na koncentraciju NO u uzorcima, niti je bilo razlike između gradusa prema AJCC i MAC skali. Prema našim saznanjima ovo je prva studija koja je ispitivala direktno koncentraciju NO u tkivima malignog tumora, jer su sve dosadašnje studije ispitivale stepen ekspresije različitih formi NOS (303, 304), i prema tome tumačili uticaj NO na razvoj tumora.

Azot monoksid (NO) predstavlja sveprisutni gas, rastvorljiv u vodi, koji poseduje brojne uloge u raznim fiziološkim i patofiziološkim procesima. NO je pokazao svoj uticaj na razvoj brojnih maligniteta kao što su karcinom dojke, grlića materice, pluća, glave i vrata i kolorektalnog tumora (303). Njegova uloga u karcinogenezi raznih tumora je i dalje nerazjašnjena, jer postoje podaci o njegovoj i proonkogenoj i antionkogenoj aktivnosti, koja zavisi od vremena i mesta delovanja, kao i od koncentracije (304). Dosadašnja literatura sugeriše da NO može da menja različite procese u onkogenezi kao što su angiogeneza, apoptoza, ćelijski ciklus, invazija i metastaziranje; dok sa druge strane sve su brojniji podaci o mogućoj upotrebi NO kao antionkogenog agensa (303). Kod karcinoma dojke, prisustvo i koncentracija NO utiče, kako na razvoj primarnog tumora, tako i na proces metastaziranja. U karcinogenezi grlića materice deluje kao molekularni kofaktor zajedno sa HPV infekcijom. Analiza izdahnutog daha i merenje NO u izdahnutom vazduhu kod pacijenata sa karcinomom pluća može pružiti korisne podatke u postavljanju dijagnoze i napredovanju bolesti. NO može pokrenuti genetske promene ćelija želuca koje dovode do razvoja maligniteta želuca. Izlaganje epitelnih ćelija želuca *H. pilori* bakteriji može dovesti do stvaranja kiseoničnih radikala i aktiviranja inducibilne NO sintaze (iNOS) što zauzvrat može izazvati genetske promene koje će dovesti do razvoja karcinoma želuca. Sa druge strane postoje podaci koji govore u prilog tumorocidne uloge NO, njegovog citostatskog i citotoksičnog dejstva na karcinomske ćelije. Međutim, ovo zavisi od brojnih, već pomenutih, faktora, a kada jednom karcinom nastane, čini se da NO pre predstavlja protumorski faktor, a ne toliko antitumorski. Zato se u poslednje vreme tumorocidna svojstva NO ispituju sa idejom da NO postane novo oružje u lečenju karcinoma, čineći karcinomske ćelije osetljivijim na razne vidove dosadašnjih terapija (303, 304). Da li će NO imati inhibitorski ili stimulirajući efekat na maligne tumore pre svega zavisi od postignute koncentracije NO, kao i od tipa ćelije koja je izložena, redoks statusu, konačnoj unutarćelijskoj koncentraciji i trajanju izlaganja gasu unutar ležišta tumora (303, 304). Onog trenutka kada nastane karcinom, NO najverovatnije ima protumorski uticaj više nego antitumorski, jer koncentracija koja je potrebna da bi se postigla citotoksičnost ne može da se postigne samo uz pomoć delovanja karcinomskih ćelija (305). Kada nivo NO pređe određenu granicu, koja je van mogućnosti endogene sinteze, koja više nije pogodna za napredovanje tumora, njegov rast

prestaje i apoptoza se aktivira i upravo se ova činjenica o promenljivoj ulozi NO u zavisnosti od njegove koncentracije može u budućnosti iskoristiti u cilju lečenja (304, 306).

Povećana koncentracija malondialdehida u tumorskom tkivu u odnosu na zdravu mukožu ukazuje da u tumoru postoji povećana lipidna peroksidacija, ali izostanak skoka aktivnosti katalaze pokazuje da nije došlo do indukcije antioksidativnog sistema. Kako kod NO nema razlike između tumora i zdrave mukože, došli smo do zaključka da se oksidativni stres u kolorektalnom karcinomu dešava na nivou reaktivnih kiseoničnih vrsta, ali ne i azotnih.

Kako je navedeno u rezultatima, naše istraživanje nije pokazalo statistički značajnu povezanost parametara oksidativnog stresa koje smo mi merili (MDA, katalaza, NO), relativne dužine telomera perifernih leukocita i tumorskog tkiva. Prema našim saznanjima, ovo je prva studija koja je ispitala uticaj oksidativnog stresa na dužinu telomera u ćelijama kolorektalnog karcinoma.

Dosadašnja istraživanja ukazuju da je skraćivanje telomera i njihov poremećaj funkcije povezan za oksidativnim stresom (307). Zna se da veći oksidativni stres i povećana količina reaktivnih kiseoničnih vrsta na više načina oštećuju telomere (307, 308). Oštećenje telomera je samo jedan od načina na koji oksidativni stres dovodi do maligne transformacije ćelija. Međutim, jedna studija iz 2014. godine je pokazala da prilikom primene antioksidativnih suplemenata došlo do veće incidence karcinoma u populaciji (309). Ovaj podatak govori u prilog prognostički pozitivnog uticaja povećanog oksidativnog stresa na dalji razvoj karcinoma. Možemo dalje da pretpostavimo da oksidativni stres utiče negativno na zdrave ćelije, u smislu da podstiče razvoj karcinoma, a da na već razvijene maligne ćelije ima pozitivan terapijski efekat, u smislu sprečavanja daljeg širenja malignih ćelija. Veća osetljivost malignih ćelija na štetan uticaj oksidativnog stresa u odnosu na zdrave ćelije predstavlja put za potencijalno lečenje maligniteta (310, 311). Pažljivom izmenom oksidativnog stresa postoji mogućnost ciljne eliminacije malignih ćelija bez oštećenja zdravog tkiva (310, 311).

Usled ograničenja naše studije (relativno mali broj ispitanika, merenje relativne, a ne apsolutne dužine telomera) svakako su potrebna merenja na većem broju pacijenata uz korišćenje preciznije metodologije merenja dužine telomera, kako bi se detaljnije ispita uticaj oksidativnog stresa na dužinu telomera. Prilikom tumačenja naših rezultata o uticaju oksidativnog stresa na dužinu telomera ne treba zanemariti nekoliko činjenica. Pre svega da oksidativni stres verovatno ima dvojnju prirodu u zavisnosti od vremena na koje deluje na ćelije, tj. da li deluje na zdrave/prekancerske ćelije ili već maligno transformisane (310, 311). Isto tako se u malignim ćelijama u nekom trenutku razvije mehanizam kojim one prevazilaze problem svog skraćivanja, i dolazi do stabilizacije i produžavanja telomera (32).

Naše istraživanje pokazalo je značajno veće koncentracije stearinske kiseline (18 0), vakkenskiskiseline (18 1 n7), eikozatrienoiniskiseline (203), eikozatetraenoiniskiseline (20 4), eikozapentaenoiniske kiseline (20 5), dokozatetraenoiniskiseline (22 4), dokozapentaenoiniskiseline (22 5), dokozaheksaenoiniske kiseline (22 6), zasićenih masnih kiselina (SFA), polinezasićenih masnih kiselina (PUFA), omega 6 masnih kiselina (n6), omega 3 masnih kiselina (n3), kao i veći odnos arahidonske i eikozapentaenoiniske kiseline (AA/EPA) u tumorskom tkivu u odnosu na zdravu mukožu, dok su oleinska kiselina (18 1 n9), linolna kiselina(18 2), α -linoleinska kiselina (18 3 n3), mononezasićene masne kiseline (MUFA) i odnos omega 6 i omega 3 masnih kiselina (n6/n3) bili značajno veće u zdravom tkivu (312). Potrebno je napomenuti da je većina ispitivanih masnih kiselina pokazala značajnu razliku između tumora i zdrave mukože, zapravo samo tri ispitivane masne kiseline nisu pokazale razliku (palmitinska kiselina (16 0), palmitoleinska kiselina (16 1) i gama-linolna kiselina (18 3 n6)) (312). Velika većina ovih razlika bila je sa veoma visokom statističkom značajnošću ($p=0.000$).

Pojačana lipogeneza povezana je sa razvojem tumora (313, 314). Povećana aktivnost sintaze masnih kiselina (FASN) dovodi do obilja zasićenih masnih kiselina (SFA), koje se zatim ugrađuju u membranske fosfolipide (PHL). Ova akumulacija SFA smanjuje fluidnost ćelijske membrane, čineći je manje podložnom dejstvu slobodnih radikala i prodiranju terapeutika (315). Zhang i saradnici su

pokazali povišeno prisustvo stearinske kiseline u kanceroznom tkivu, ali bez promena uSFA kraćih lanaca (miristinska i palmitinska kiselina) (316). Ovi rezultati su u skladu sa našim nalazima.

Palmitinska kiselina, masna kiselina dugog lanca, sa ulogom u skladištenju energije, nije se razlikovala između zdravog i tumorskog tkiva u našoj studiji (312). To se podudara s rezultatima prethodnih istraživanja (317), koji su proučavali profile masnih kiselina (MK) u kolorektalnom tumoru indukovanom azoksimetanom kod eksperimentalnih životinja. Takođe, drugi autori koji su istraživali unos palmitinske kiseline putem hrane, njen sadržaj u eritrocitima i plazmi, nisu pronašli nikakvu vezu sa kolorektalnim karcinomom (318-321). Kada smo uzeli u obzir starost, pol, stepen ili stadijum tumora ili mucinoznu komponentu tumora, nijedan od ovih faktora nije uticao na koncentraciju palmitinske kiseline. Otkrili smo samo značajnu razliku u nivoima palmitinske kiseline između uzoraka tumora desnog kolona i tumora rektuma, gde su tumori desnog kolona imali značajno veći nivo (312). Uprkos tome što palmitinska kiselina zasićena MK, a ona povećana u tumorskom tkivu, čini se da sadržaj palmitinske kiseline nema uticaja na etiologiju ili progresiju KRK-a.

Kao što je prikazano u istraživanju Neoptolemosa (317), i mi smo pronašli značajno veću koncentraciju stearinske kiseline u tkivu KRK u odnosu na zdravu sluznicu ($p = 0.000$); što je u suprotnosti sa nekim ranijim studijama (322).

Očigledno je da je u našoj studiji sadržaj stearinske kiseline doprineo povećanom nivou SFA u tumorskom tkivu u poređenju sa zdravom sluznicom (312). Međutim, dosadašnji rezultati o ulozi SFA u razvoju kolorektalnog karcinoma nisu uverljivi. Kondo i kolege (323) su otkrili smanjeni nivo stearinske kiseline, dok su Zhang i saradnici (316) pokazali porast ove masne kiseline za 50% u tumorskom tkivu, bez promena u sadržaju palmitinske kiseline. S druge strane, Singapurska kineska zdravstvena studija iz 2017. godine nije pokazala razliku ni u jednoj od dve pomenute kiseline u KRK-u (324). Međutim, objavljen je pregled literature koji je pokazao da stearinska kiselina snižava ekspresiju antiinflamatornih gena ($1\kappa B\alpha$) i povećava koncentraciju pro-inflamatornih citokina MCP-1 u plazmi (325). Ipak, promene SFA u KRK-u mogu ukazivati na to da produkti aktivnosti sintaze masnih kiselina mogu poslužiti kao supstrati za proizvodnju drugih zasićenih masnih kiselina dugog lanca, za koje je nedavno pokazano da mogu poslužiti kao biomarkeri KRK-a (326). Sveukupno posmatrano, naši rezultati zajedno sa ranijim studijama podržavaju hipotezu da su zasićene masne kiseline važne, verovatno u etiologiji, i sa većom sigurnošću, u razvoju kolorektalnog karcinoma (312). Takođe, ćelije karcinoma promovišu zasićenje svojih membrana i moduliraju njihova biofizička svojstva. Pošto su zasićeni lipidi manje podložni peroksidaciji lipida, ova promena može zaštititi ćelije raka od ćelijske smrti posredovane peroksidacijom lipida, a takođe menja i dinamiku membrane i utiče na unos i efikasnost hemoterapeutika.

Naši rezultati su pokazali značajno veću količinu MUFA u zdravom tkivu, u poređenju sa tumorskim tkivom (312). Što se tiče palmitoleinske kiseline, mononezasićene masne kiseline (MUFA), nije otkrivena značajna razlika između tumora i zdravog tkiva. Međutim, zanimljivo je da je to bila jedina masna kiselina čija se količina razlikovala između gradusa tumora. Značajno niže koncentracije su se nalazile u gradusima 2 i 3, u poređenju sa KRK-om gradusa 1. Palmitoleinska kiselina, kao i njen elongirani produkt vakcenska kiselina, su markeri lipogeneze (327, 328). Smanjenje 16:1 n-7 masnih kiselina u uznapredovalim stadijumima karcinoma debelog creva ukazuje na povećanu potrošnju za proizvodnju energije, tako karakterističnu za više graduse tumora, što će na kraju dovesti do kaheksije.

Još jedna MUFA, oleinska kiselina, jedna od najrasprostranjenijih masnih kiselina u ljudskim tkivima i glavna masna kiselina u maslinovom ulju, odgovorna za blagotvorne efekte maslinovog ulja, značajno se smanjila u tkivu karcinoma debelog creva u poređenju sa zdravim tkivom. Uticaj oleinske kiseline na maligne ćelije, uprkos obilju dokaza, i dalje ostaje prilično nejasan. Dobro je poznato da oleinska kiselina deluje protivupalno, čime se smanjuje rizik od kardiovaskularnih poremećaja, insulinske rezistencije, oksidativnog stresa, ateroskleroze i upale, a za upalu se odavno zna da ima značajnu ulogu u karcinogenezi (325). Međutim, jedno istraživanje je pokazalo da oleinska kiselina podstiče rast tumora debelog creva verovatno mehanizmima koji uključuju povećanje oksidacije masnih kiselina i poremećaj membranskih enzima (329). S druge strane, većina

istraživanja pružila je dokaze da oleinska kiselina posebno reguliše onkogene povezane sa karcinomom. Rad Colomera i Menendeza pokazao je da izlaganje oleinskoj kiselini može suprimirati HER2 na transkripcionom nivou tako što povećava ekspresiju Ets proteina PEA3, proteina koji se vezuje za DNK i koji specifično blokira aktivnost promotora HER2 u ćelijskim linijama raka dojke, jajnika i želuca (330). Takođe, dokazano je da oleinska kiselina indukuje apoptozu i ćelijsku diferencijaciju snižavanjem regulacije COX-2, što dovodi do smanjenja ekspresije Bcl-2 (331). Bioinformatička analiza signalnih puteva potvrđuje da je oleinska kiselina jedan od glavnih snabdevača za potpunu rekonverziju ćelija raka u zdrave ćelije creva u ćelijskoj liniji Caco-2 (332). Sve u svemu, značajno smanjenje sadržaja oleinske kiseline u tkivu kolorektalnog karcinoma u našoj studiji potkrepljuje hipotezu da se ćelije raka prebacuju na različite biosintetske puteve kako bi stvorile raznoliku ćelijsku rezervu lipidnih vrsta sa različitim funkcijama potrebnim za rast tumora, čime se smanjuje, između ostalog, njena zaštitna uloga u razvoju tumora (333).

Polinezasićene masne kiseline (PUFA) predstavljaju masne kiseline koje u svojoj strukturi sadrže više od jedne dvostruke veze. One su prisutne u svim membranama u ljudskim ćelijama, čime se obezbeđuje hidrofobna granica između hidrofilnih odeljaka. Dve porodice PUFA n-3 i n-6 imaju suprotne efekte. Opšte je poznato da n-3 PUFA i njihovi proizvodi pokazuju protivupalna svojstva, dok n-6 pokazuju proinflatorna svojstva. Sa time se slaže većina rezultata, međutim postoje studije koje pokazuju drugačije ishode (334). Naši rezultati će verovatno doprineti ovom skupu prilično složenih i ne sasvim jasnih funkcija PUFA.

Različite studije su pokazale da se polinezasićene masne kiseline različito metabolišu u zdravim i tumorskim ćelijama; normalne ćelije metabolizmom PUFA proizvode zaštitne lipide, dok ćelije tumora stvaraju toksične hidroperoksi masne kiseline (335, 336). Naša studija pokazuje povećan sadržaj PUFA kod pacijenata sa KRK-om (312), što su prethodno pokazali Berstad i kolege kod mlađih osoba sa kolorektalnim karcinomom (190). Pretpostavljamo da višestruke dvostruke veze čine PUFA podložnijima oksidaciji, pa njihov porast u tumorskom tkivu dovodi do povećane proizvodnje veoma proinflatornih proizvoda. Iako, na prvi pogled, povećanje sadržaja eikozapentaenoinske (EPA) i dokozaheksaenoinske kiseline (DHA) u našoj studiji treba posmatrati kao adaptivnu i povoljnu promenu metabolizma PUFA u tumorskom tkivu, budući da su visoko oksidirajuće masne kiseline, njihov povećani sadržaj može dovesti do proinflatorne aktivnosti i mogućeg kancerogenog efekta.

Naši rezultati su pokazali značajno veće nivoe omega-3 i omega-6 kiselina u tumorskom tkivu u poređenju sa zdravim tkivom, ali je odnos omega-6/omega-3 bio značajno veći u zdravom tkivu (312). Slični rezultati objavljeni su i ranije (190, 317, 337), međutim, važnost odnosa n-6/n-3 nije toliko velika, kako pretpostavljaju mnogi istraživači. Uopšteno se veruje da je niži odnos n-6/n-3 povezan sa smanjenim rizikom za mnoge poremećaje, uključujući karcinom, što je više puta potvrđeno. Ipak, postoje studije koje osporavaju ovu tvrdnju (190, 338). Moramo biti veoma oprezni pri tumačenju rezultata odnosa n-6/n-3; to može biti izvor pristrasnosti, jer neki oksidacioni proizvodi izvedeni iz n-6 mogu u stvari imati protivupalno dejstvo (339).

Dakle, po našem mišljenju, pouzdaniji pokazatelj inflamatornog statusa u određenom tkivu je odnos arahidonske i eikozapentaenoinske kiseline (AA/EPA) (312). U našoj studiji pokazali smo značajno povećanje ovog odnosa u tumoru, što potvrđuje da je inflamatorno okruženje tumora nezaobilazan faktor u neoplastičnom procesu, podstičući proliferaciju, preživljavanje i migraciju malignih ćelija.

Na još jednu stvar se mora misliti pri tumačenju promena različitih masnih kiselina u malignom tkivu. Ljudima, kao i svim drugim sisarima, potrebne su esencijalne masne kiseline (linolna i α -linoleinska kiselina) da bi se sintetisale druge PUFA. Međutim, PUFA iz ove dve klase (n-6 i n-3) konkurišu za iste desaturaze i elongaze, što znači da ishrana može snažno uticati na koncentraciju jedne ili druge klase PUFA (340). To nije slučaj sa arahidonskom kiselinom, koja je strože regulisana i stoga manje varira u tkivu. Zbog toga sadržaj arahidonske kiseline (AA) tačnije odražava proinflatorni status karcinomskog tkiva.

U našem istraživanju, zdrava sluznica imala je značajno veći nivo linolne kiseline u poređenju sa tumorskim tkivom. Isti rezultat je prikazan za α -linoleinsku kiselinu, koja je značajno prisutnija u zdravoj sluznici nego u tumorskom tkivu (312). Smanjenje ovih esencijalnih masnih kiselina verovatno odražava njihovu povećanu elongaciju u masne kiseline dužeg lanca u tumorskom tkivu. U grupi n-6 kiselina, α -linoleinska kiselina je nepromenjena, ali su krajnji proizvodi, dihomo- γ -linolna kiselina, arahidonska kiselina i adrenska kiselina, značajno povećani. Isto se dogodilo u grupi n-3 kiselina; uprkos smanjenju α -linoleinske kiseline, EPA i DHA su povećani u tkivu kolorektalnog karcinoma. Proinflamatorni status arahidonske kiseline je poznat, ali aktivnost produkta njene elongacije, adrenske kiseline, još uvek nije poznata. Nedavna studija je iznela podatak da bi adrenska kiselina mogla biti upalni pojačivač kod nealkoholne masne bolesti jetre, pa će na taj način ubrzati upalni proces i kasnije razmnožavanje ćelija karcinoma kod pacijenata sa KRK-om (341).

Tumačenje promena masnih kiselina u malignom tkivu moglo bi biti prilično nezgodno. Do sada utvrđene činjenice se revidiraju kako se akumuliraju rezultati različitih eksperimenata i studija. α -linoleinska kiselina, prekursor PUFA dužih lanaca (EPA i DHA), koje su poznate po svojim zaštitnim efektima, pokazala je, u jednoj studiji, koja je koristila kulturu ćelija karcinoma, da indukuje ekspresiju gena MEK1 i MEK2, oba pokretača ćelijske proliferacije (342). Takođe, n-6 masne kiseline se smatraju proinflamatornim. Jedna studija je pokazala da metabolit linolne kiseline, 13-S HODE, služi kao signalni molekul povezan sa antikancerogenim svojstvima (343). Dalje, studija Das-a i Madhavija pokazala je da i α -linoleinska kiselina i arahidonska kiselina ispoljavaju tumoricidno dejstvo povećavajući stvaranje slobodnih radikala i peroksidaciju lipida, te povećavajući unutarćelijsku koncentraciju lekova protiv karcinoma, u ćelijama karcinoma grlića materice (335).

Slično, promene u koncentraciji različitih masnih kiselina značajno se razlikuju među objavljenim rezultatima. U jednoj studiji je predložena γ -linoleinska kiselina kao potencijalni biomarker KRK-a, jer je njena koncentracija promenjena rano u toku bolesti (323). Mi nismo pronašli promene u sadržaju iste masne kiseline. Rad Zhanga i njegovih kolega pokazao je značajno povećanje linolne n-6 masne kiseline u KRK tkivu, čiji je sadržaj zavisio od stadijuma tumora (316). Naša studija nije pokazala promene u sadržaju linolne kiseline i nismo utvrdili korelaciju između njenog sadržaja i stadijuma tumora, baš kao što je pokazano u prethodnim istraživanjima (344). Takođe, potraga za specifičnim biomarkerom kolorektalnog karcinoma dovela je do različitih sugestija. Jedna od često citiranih, je i predložena akumulacija palmitinske i palmitoleinske kiseline kao prilično pouzdanih biomarkera KRK-a (345). Mi nismo pronašli promene u sadržaju ovih masnih kiselina u tkivu KRK-a naših pacijenata. Dakle, potraga za odgovarajućim, i klinički korisnim lipidnim biomarkerom zahteva doslednu i ponovljivu metodologiju kako bi rezultati mogli pouzdano da se uporede.

Povezanost između gojaznosti, visokog nivoa lipida u serumu i različitih maligniteta je dobro proučena (346). Takođe je pokazano da lipidi u serumu imaju ulogu u etiologiji neoplazmi gastrointestinalnog trakta (347). Što se tiče nivoa TG u serumu i KRK-a, objavljeni rezultati su različiti, bez određene veze između nivoa TG i rizika od nastanka KRK-a (339). U našoj studiji, samo su nivoi TG bili značajno različiti, između modifikovanih Astler-Coller stadijuma A i C, sa većim nivoima u stadijumu A (rezultati nisu prikazani) (312). Rezultati verovatno odražavaju potrošnju tumora u skladištima energije domaćina. Takođe je objavljeno da viši nivoi LDL-a pojačavaju crevnu upalu i progresiju KRK-a, verovatno aktivacijom signalnog puta ROS-a i MAPK-a (346). Ovo je u skladu sa našim nalazima, gde su nivoi LDL seruma bili značajno veći u stadijumu M1a nego u stadijumu M0 (rezultati nisu prikazani). Nismo pronašli korelaciju između serumskih TG i bilo koje od izmerenih masnih kiselina, ni u tumorskom tkivu ni u susednoj zdravoj sluznici; a drugi rezultati u našoj studiji nisu tako konkluzivni.

Naši rezultati su pokazali značajno veće vrednosti SI u tumorskom tkivu u odnosu na zdravo, dok na vrednosti SI nisu uticali pol, starost, stepen tumora, Astler-Coller stadijum i mucinozna komponenta tumora (312). Međutim, pokazali smo značajno veće vrednosti SI kod tumora sa izraženim peritumorskim limfocitnim odgovorom u odnosu na tumore sa odsutnim limfocitnim

odgovorom, i kod tumora sa odsutnom venskom invazijom u odnosu na tumore sa prisutnom venskom infiltracijom (312).

Razvoj karcinoma izaziva velike modifikacije lipidnog sastava membrane, što uvek dovodi do promena fizičko-hemijskih svojstava membrane. Među njima su često objavljivane promene u sastavu membranskih lipida koje su dovele do promena fluidnosti membrane (348). Fluidnost membrane je jedan od ključnih parametara za fuziju membrane, jer određuje pokretljivost lipida, proteina i vode, dakle molekula koji saraduju u građi i reorganizaciji, koja je potrebna i indukovana fuzijom membrane. Pošto direktno zavisi od lipidnog sastava membrane, svaka promena metabolizma lipida dovodi do promene fluidnosti membrane. Fluidnost membrane je kontrolisana od strane više faktora koji uključuju odnos zasićene i (mono)nezasićene masne kiseline u ćelijskom zidu, odnosno Saturacionim Indeksom (SI). Poznato je da je stearinski i oleinski odnos (Saturacioni Indeks, SI) smanjen u membranama nekih vrsta neoplastičnih ćelija (349, 350), što naša studija nije potvrdila, već je dobila suprotne rezultate. Predložena je pretpostavka da nezasićene masne kiseline održavaju strukturu, tj. fluidnost ćelijske membrane, umanjujući razne biofizičke promene štetnog dejstva, dok zasićene masne kiseline narušavaju integritet membrana, odnosno povećavaju njenu rigidnost (351, 352). Naši rezultati se mogu smatrati kao potvrda ove pretpostavke, jer uvećan SI indeks ukazuje na povećano prisustvo zasićenih masnih kiselina i narušena svojstva ćelijske membrane tumorskih ćelija. Suprotni rezultati iz prethodnih studija se odnose na ćelije tumora jetre (349, 350), kao i na uzorke urina, i na lipidni status membrane eritrocita malignih bolesnika (350, 353). Pretpostavka ovih studija je da kod malignih pacijenata dolazi do povećane aktivnosti desaturaza, kao jedne od obeležja metabolizma malignih ćelija (353). Čak je i predlagano da se SI membrane eritrocita koristi kao marker maligniteta, kako u dijagnostici, tako i u praćenju ovih pacijenata (349, 350, 354). U jednoj studiji ova tvrdnja nije potvrđena kao pouzdan parameter, jer nije pokazana razlika u SI vrednostima membrane eritrocita između zdravih i malignih pacijenata (355).

Treba istaći da je, prema našim saznanjima, ovo prva studija koja je istraživala vezu između SI i peritumorskog limfocitnog odgovora i venske invazije (312). U našem istraživanju smo otkrili da je grupa sa izraženim peritumorskim limfocitnim odgovorom imala veće vrednosti SI, a grupa sa odsutnom venskom invazijom takođe je imala veće vrednosti SI. Generalno, izraženiji peritumorski limfocitni odgovor ukazuje na bolji imunološki odgovor i bolju prognozu (356). Takođe, venska infiltracija je pokazatelj agresivnijeg tumora (357). Kada se uzmu u obzir ovi rezultati, veće vrednosti SI u našoj studijskoj grupi ukazuju na biološki manje agresivan tumor i jači imunološki odgovor, što dovodi do moguće bolje prognoze.

S obzirom na sve, čini se da je SI obećavajući parameter koji treba dodatno istražiti kako bi se utvrdio njegov dijagnostički i prognostički značaj (312).

Na osnovu rezultata velikog broja studija koje su do sad sprovedene, uključujući i našu, postoji dovoljno dokaza da se kaže da promene u masnokiselinskom profinu igraju važnu ulogu u razvoju i progresiji kolorektalnog karcinoma. Međutim, sve ove studije se razlikuju u vrsti ispitivanih ćelija (uzetih iz tumorskih uzoraka, ćelijskih kultura, animalnih modela), u karakteristikama pacijenata (pol, životna dob) i u samoj metodologiji studije. Veći studijski uzorak, sa ujednačenijom metodologijom i tehnikama istraživanja bi rezultirale u boljem razumevanju izmenjenog metabolizma lipida u razvoju kolorektalnog karcinoma, što bi vodilo ka poboljšanoj prevenciji, dijagnozi i lečenju ovog karcinoma.

Naše istraživanje je pokazalo značajno veću relativnu dužinu telomera (RTL) u tumorskom tkivu u odnosu na RTL perifernih leukocita i na RTL zdrave mukoze, kao i značajno veću RTL perifernih leukocita u odnosu na zdravu mukožu. Takođe jedan od značajnih razlika koju smo pokazali je kraća RTL kod tumora stadijuma C1 modifikovane Atler Coller skale u odnosu na ranije, a i kasnije stadijuma, naime stadijum C1 je imao značajno najkraće telomere.

Ovo je prva studija koja je ispitivala dužinu telomera u KRK-u u srpskoj populaciji. Detaljno smo istražili relativnu dužinu telomera (RTL) tumorskog tkiva KRK-a, susedne zdrave sluznice i leukocita periferne krvi (PBL) u različitim starosnim grupama, segmentima creva i stadijumima

tumora. Uobičajena teorija i rezultati kažu da se sa svakom ponovljenom deobom ćelija, što je pogotovo izraženo kod tumora, telomere skraćuju, pa stoga tumorsko tkivo KRK, obično u ranim stadijumima, obično ima kraću dužinu telomera u poređenju sa zdravim tkivom (32, 40). U našoj studiji, srednja vrednost RTL-a bila je značajno veća u tumorskom tkivu u poređenju sa susednom zdravom sluznicom, ali je većina uzoraka (66/111) imala zapravo dužu RTL u zdravoj sluznici, a samo 45 uzoraka imalo je dužu RTL u tumorskom tkivu. Ovi rezultati su donekle uporedivi sa radom Kroupe i saradnika (32), gde je 74% uzoraka imalo dužu RTL u zdravoj sluznici, a preostalih 26% je imalo dužu RTL u tumorskom tkivu, međutim njegov krajnji rezultat ipak ističe značajno duže telomere zdrave mukoze. S druge strane, drugi autori (358, 359) objavili su rezultate koji su pokazali ili duže telomere u karcinomskom tkivu ili telomere bez značajno različite dužine nego u polipima ili normalnom tkivu u sluznici želuca i debelog creva. Jedna španska studija je izmerila apsolutnu dužinu telomera i autori su otkrili kraće telomere u tumoru u poređenju sa zdravim tkivom (360). Ograničenja našeg istraživanja su relativno mala veličina uzorka i nejednaka distribucija različitih gradusa i stadijuma tumora, sa većim procentom uznapredovalih stadijuma. Pretpostavlja se da u svom početnom periodu, brza podela tumorskih ćelija dovodi do skraćivanja telomera, što se inače dešava prilikom ćelijske deobe, ali da kasnije ćelije karcinoma razvijaju različite mehanizme podmlađivanja telomera, pa se otuda duže telomere nalaze u naprednijim stadijuma tumora (32, 36, 42). Osim pretpostavljenog podmlađivanja telomera u tumorskim ćelijama, razlike u dužini telomera u različitim stadijumima se takođe još objašnjavaju i različitim molekularnim/epigenetskim podtipovima tumora (32). Isti autori takođe iznose mogućnost i da tumori sa dužim telomerama mogu imati povećanu mogućnost napredovanja u više stadijume bolesti nego tumori sa kratkim telomerama (32). Ovo može biti jedno od objašnjenja naših rezultata i srednjih vrednosti telomera, jer pacijenti sa našeg područja obično zatraže medicinsku pomoć tek kada nastanu simptomi bolesti, i kada je bolest već uznapredovala. A dosadašnji podaci u literaturi se slažu u tome da u naprednijim stadijumima imamo, samo naizgled paradoksalno, duže, podmlađene telomere.

Takođe smo pokazali pozitivnu korelaciju između relativne dužine telomera između tumorskog tkiva i zdrave mukoze. Kako su u našoj studiji pacijenti sami sebi bili kontrola, jer je tkivo uzimano sa najudaljenijeg mogućeg dela resektiranog creva, ovaj rezultat može ukazivati da se izmenjeni genetski mehanizmi razvijaju i u histološki neizmenjenom tkivu kolorektuma.

Bez obzira na sve izneto, potrebna su dodatna istraživanja, pre svega sa većim brojem pacijenata i ravnomernijom raspodelom po stadijumima tumora, kako bi se dobila jasnija slika o dužini telomera i njenom značaju u karcinogenezi i prognozi karcinoma kolona i rektuma.

Naša studija je pokazala značajno dužu RTL u uparenom tumorskom tkivu nego u PBL, a telomere u PBL su bile značajno duže nego u zdravoj sluznici kolona i rektuma; dok drugi autori nisu pronašli značajnu razliku u RTL -u između ovih uzoraka (32), ili je RTL tumora bila kraća od dužine telomera PBL (42). Jedna studija koja je merila apsolutnu dužinu telomera, otkrila je da su telomere u PBL duže i od tumora i od susedne zdrave sluznice, gde je dužina telomera tumora bila najkraća (360). Pošto se dužina telomera u PBL-u smatra adekvatnim prosečnim predstavnikom dužine telomera nemalignog tkiva (361), kao i dobrim merilom nagomilanog metaboličkog stresa (360), korišćenje njihovih vrednosti za gore navedena poređenja su krajnje opravdana. Razlika između naših rezultata i rezultata drugih autora može se objasniti karakteristikama uzorka našeg istraživanja. Imali smo više starijih pacijenata i veći broj naprednijih stadijuma KRK-a u, što je opet u skladu sa radovima koji tvrde da je skraćivanje telomera prisutno u ranim fazama karcinogeneze (362), a produženje je znak naprednijih stadijuma (363).

Ranija istraživanja pokazuju paralelno skraćivanje telomera u tumorskom tkivu i u PBL -u, što sve ukazuje na intenzivnu ćelijsku proliferaciju. Što se tiče naših rezultata, mogli bismo pretpostaviti da je, zbog naprednijih faza, RTL u tumorskom tkivu duža, jer ćelije uspevaju da zaobiđu problem skraćivanja telomera nakon svakog ćelijskog ciklusa; dok je RTL u PBL kraća zbog oslabljenog imunološkog odgovora sa napredovanjem maligne bolesti koja sve više i više utiče na sve sisteme u organizmu.

Rezultati naše studije pokazali su da starost i pol nisu uticali na dužinu telomera u uzorcima tkiva i leukocitima periferne krvi, jer nije bilo razlike između bilo koje od ispitivanih grupa. Ovo se protivi nalazima drugih studija (32, 42) koje su pokazale razlike u TL između polova, ali jedna je pokazala duže telomere kod žena (42), a druga kod muškaraca (32). Svakako su potrebna dodatna istraživanja sa većim grupama i preciznije usklađenim parovima kako bi se razjasnilo pitanje pola i njegovog uticaja na dužinu telomera. Što se tiče razlika u godinama, prethodni rezultati su pokazali kraće telomere u starijim grupama u odnosu na mlađe pacijente (32, 37, 40, 42). Poznato je da se tokom starenja i ponavljanja ćelijske deobe telomere skraćuju sa svakim ciklusom (40), što rezultati prethodnih studija i potvrđuju. Takođe je poznato da u kasnijim fazama raka ćelije zaobilaze ovaj problem, uglavnom zbog aktivacije TERT-a, te se telomere produžavaju (40). Budući da su u našoj studiji prisutni više uznapredovali stadijumi KRK-a, i uzimajući u obzir gore navedene činjenice, da se u ranim fazama KRK telomere skraćuju, a kasnije produžavaju, kao i da se tokom starenja telomere skraćuju, možda bi to moglo objasniti odsustvo razlika TL među starosnim grupama u našem uzorku studije.

Ranije objavljeni podaci pretpostavljali su da bi karcinom kolona i karcinom rektuma mogli biti odvojeni entiteti zbog različite dinamike skraćivanja i stabilizacije telomera u svojoj karcinogenezi, što takođe može biti objašnjenje za lošiju prognozu raka rektuma od raka debelog creva (37). Nekoliko radova je pokazalo kraće telomere u proksimalno lociranim tumorima u poređenju sa onima koji su locirani distalnije (32, 37, 42). Naši rezultati se, s druge strane, ne poklapaju sa ovim prethodnim nalazima. U našem istraživanju lokalizacija nije uticala na dužinu telomera u tumoru. Kada smo uzeli u obzir lokalizaciju tumora prema vodiču američkog udruženja patologa (prepoznaje 13 lokalizacija), lokalizacija nije uticala na dužinu telomera, kada smo grupisali ove lokalizacije prema embriološkom poreklu kolona/rektuma (proksimalni kolon, distalni kolon, analni kanal), takođe nismo dobili razliku u dužini telomera. Isto tako, kada smo uzeli u obzir samo kolon i rektum kao dve moguće lokalizacije, takođe nije pokazana značajna razlika u dužini telomera. Uočene razlike o uticaju mesta tumora i RTL, se možda mogu objasniti različitom veličinom uzorka, načinom merenja dužine telomera i različitom distribucijom pacijenata po godinama i stadijumom tumora. Zaključak do kojeg smo mi došli je zapravo zaključak koji se ponavlja i u prethodnim studijama, a to je da su potrebna dodatna istraživanja kako bi se razjasnilo pitanje odnosa dužine telomera i lokalizacije KRK. Odgovor bi verovatno mogao biti od pomoći u boljem razumevanju porekla KRK-a i u pronalaženju novih anti-neoplastičnih strategija.

Reakcije ćelija imunskog sistema unutar tumora i na njegovoj granici sa zdravim tkivom, predstavljaju manifestaciju adaptivnog antitumorskog imunog odgovora (364). Prethodne publikacije su pokazale da je prisustvo imunoloških ćelija duž granice infiltracije brojnih tumora i unutar tumora povezano sa boljim imunološkim odgovorom, boljom prognozom i dužom ukupnom stopom preživljavanja (365-367). Naše istraživanje nije pokazalo vezu između intratumorskog limfocitnog odgovora ili peritumorskog limfocitnog odgovora sa jedne strane i dužine telomera u perifernim leukocitima, tumorskom tkivu ili zdravoj sluznici sa druge strane. Za sada se može samo pretpostaviti kakva je prava priroda veze između izraženog intratumorskog limfocitnog odgovora ili peritumorskog limfocitnog odgovora i relativne dužine telomera u perifernim leukocitima, tumorskom tkivu i zdravoj sluznici. Prethodni podaci o TIL-u i RTL-u kod pacijenata sa KRK-om su relativno oskudni. Jedna švedska studija je istakla da su pacijenti sa izraženijim intratumorskim limfocitnim odgovorom imali značajno kraću dužinu telomera u leukocitima periferne krvi, dok su pacijenti sa dužim telomerama u perifernim leukocitima imali niži stepen TIL-a (41). Na osnovu te studije (41), i prethodne studije istih autora (368), predložena je hipoteza da se manje aktivan imunski sistem manifestuje smanjenjem proliferacije leukocita, manjim skraćivanjem telomera i nižim nivoima TIL-a. Sve ovo će dovesti do manje efikasnog imunološkog odgovora usmerenog na tumor i lošije prognoze (41, 368). Ovakvi rezultati se ipak ne mogu u potpunosti objasniti, dok se ne razmotri i uticaj različitih faktora od interesa, poput veličine uzorka, raspodele stadijuma tumora, itd...

Koliko je nama poznato, naša studija je prva koja je ispitala vezu između perifernog limfocitnog odgovora i relativne dužine telomera. Kao i kod TIL-a, ni u ovom slučaju nismo pronašli značajnu razliku ni u jednoj od ispitivanih grupa. Kao što su švedski autori pretpostavili za TIL (41), ista pretpostavka može biti primenjena i na odnos perifernog limfocitnog odgovora i relativne dužine telomera kod KRK. Svakako su potrebna dodatna ispitivanja kako bi se razjasnio ovaj odnos, koji će bez sumnje rasvetliti barem deo patogeneze kolorektalnog karcinoma

Prethodni radovi su izmerili kraće telomere u infiltrativnim tumorima u poređenju sa drugim tipovima konfiguracije tumora (42). U našoj studiji nije bilo razlika u RTL između različitih tipova konfiguracije tumora. Infiltrativni tip tumora obično znači agresivnije ponašanje sa većim proliferativnim kapacitetom (369), a kod takvih tumora očekuju se kraće telomere, na osnovu prethodnih studija (42). Razlika između naših i rezultata drugih studija mogla bi se objasniti različitom konfiguracionom klasifikacijom koja se koristi, jer još nije postignut jedinstven dogovor patologa popitanju klasifikacije kolorektalnog karcinoma prema njegovoj konfiguraciji, ali je u svim podelama uvek prisutan infiltrirajući tip (369).

Što se tiče stepena diferencijacije tumora i njegove mucinozne komponente, rezultati su različiti (32, 42). Mi nismo pronašli značajnu razliku između ovih grupa, poput Mzahme i saradnika (42), dok sa druge strane, istraživanje čeških autora nije otkrilo značajnu razliku između grupa sa različitim stepenom diferencijacije tumora, ali je prikazalo značajno kraće telomere u grupi sa izraženom mucinoznom komponentnom tumora (32). Ovde se postavlja pitanje uporedivosti ovih rezultata, jer smo mi koristili klasifikacioni sistem sa četiri stepena diferencijacije tumora, a autori ove druge dve spomenute studije su koristili dvo- ili trostepene sisteme klasifikacije. Što se tiče mucinozne komponente, druge dve studije su podelile tumor na mucin pozitivne i mucin negativne, a mi smo, s druge strane, podelili tumore na one koji imaju više od 50% mucinozne komponente i na one koji imaju manje od 50% mucinozne komponente, i nismo našli značajnu razliku između ovih grupa, kao ni značajnu korelaciju između RTL i mucinozne komponente. Mucinozna komponenta je označena kao karakteristika tumora sa mikrosatelitnom nestabilnošću, koji se prema nekim autorima češće nalaze u proksimalnom crevu, ali su do danas dokazi o povezanosti RTL-a i mucinoznoj komponenti KRK-a i dalje nekonkluzivni (32), te su potrebne dodatne studije.

Limfo-vaskularna i perineuralna invazija su pokazatelji agresivnijih tumora, lošije prognoze i kraćeg preživljavanja (370, 371). U tom svetlu, i na osnovu dosadašnjih saznanja, pretpostavlja se da tumori sa ovim karakteristikama imaju kraće telomere u ranijim fazama, a duže u kasnijim fazama. Mzahma je otkrio da je odnos dužine telomera u tumorskom tkivu i leukocitima periferne krvi postajao veći kod pacijenata sa kasnijim fazama KRK, sa prisutnim metastazama, vaskularnom i perineuralnom invazijom (42), što je u skladu sa radovima drugog autora (40), koji su prijavili dužu RTL u više uznapredovalim stadijumima KRK-a, budući da je kasnije u evoluciji tumora skraćivanje telomera zaobiđeno uz pomoć aktivnosti TERT-a. Kada smo analizirali uzorke naših pacijenata, nismo pronašli statistički značajnu razliku u RTL između bilo koje od ovih grupa, što bi se, opet moglo objasniti relativno malim grupama pacijenata i njihovom neravnomernom distribucijom po stadijumima KRK-a, godinama i po polu.

Koliko znamo, nije bilo prethodnih publikacija u vezi sa tumor badingom, ili tumorskim depozitima i telomerama kod pacijenata sa KRK-om. Tumor bading, ili pupljenje tumora, predstavljaju „izdanke“ tumora, od jedne do pet ćelija, koje su odvojene od glavne tumorske mase, dok su tumorski depoziti agregati tumora, odvojeni od glavnog tumora, bez rezidualnog tkiva limfnih čvorova, a nalaze se u području limfo-vaskularne drenaže tumora. Do sada je značaj tumor badinga (372) i tumorskih depozita (373) kod pacijenata sa KRK-om bio povezan sa lošijom prognozom za svaki TNM stadijum, u poređenju sa pacijentima u istom stadijumu TNM-a bez tumora badinga ili tumorskih depozita. Uzimajući to u obzir, možemo spekulirati da bi bading i depoziti, markeri agresivnijeg ponašanja tumora, mogli biti povezani sa bržom proliferacijom ćelija i stoga kraćim telomerama u ranim fazama KRK-a, i dužim telomerama u kasnijim fazama, u odnosu na iste faze bez badinga i depozita; budući da su prethodne studije pokazale da se telomere skraćuju u ranim

fazama i produžavaju u kasnijim fazama bolesti (40). Naša studija nije otkrila značajnu razliku u dužini telomera između grupa sa i bez tumor badinga/tumorskih depozita; pa naša pretpostavka tek treba da se dokaže ili odbaci u budućim istraživanjima.

Kao što je već ranije pomenuto, na početku karcinogeneze, telomere se skraćuju (362), a kako karcinom raste i razvija se, telomere postaju sve duže aktiviranjem TERT-a (363). Ovo je razlog zašto početni stadijumi KRK-a imaju kraće telomere od kasnijih stadijuma (32, 42). Jedna od ovih studija nije pronašla značajnu vezu između RTL-a i T ili N stadijuma tumora (42). Takođe, jedno drugo istraživanje nije našlo značajnu razliku u dužini telomera, pri upoređivanju samo N pozitivnih i N negativnih grupa, ali je u ovoj studiji merena apsolutna dužina telomera (360). Verovatno je potrebno više „stejdžing“ faktora (parametara koji se koriste za određivanje stadijuma), kako bi se ustanovila prava priroda odnosa između RTL i KRK stadijuma, pa iz tog razloga svaki faktor zasebno nije pokazao nikakav značaj, ali zajedno stvari postaju jasnije. Naši rezultati su u skladu sa ovim rezultatima, jer takođe nismo pronašli značajnu razliku između T stadijumima, ni među N stadijuma, kada se pojedinačno uporede sa dužinom telomera, ali kada smo uporedili RTL u modifikovanim Astler-Coller stadijumima, pojavile su se neke statistički značajne razlike. Modifikovani Astler-Coller stadijum C1 imao je najkraće RTL i bio je znatno kraći od bilo kog drugog stadijuma (A, B1, B2, C2, C3 i D), a između bilo koja druga dva nije bilo značajnih razlika. Pretražujući literaturu, nismo pronašli nijedno istraživanje koje upoređuje dužinu telomera u Astler-Coller stadijumima, ali budući da je ovaj sistem određivanja stadijuma modifikacija prethodno korišćenog Djuksovog sistema, rezultati istraživanja koji su koristili ovaj sistem mogli bi biti uporedivi. U radovima koji koriste Djuksov sistem (374, 375), kasniji stadijumi imali su duže telomere i povećanu aktivnost telomeraze, što je u skladu sa novijim studijama koje koriste AJCC/UICC sistem (32, 42).

Na osnovu naših rezultata, mogli bismo reći da C1 stadijum predstavlja, možda, prekretnicu u kojoj se skraćivanje telomera zaustavlja i počinje produženje; a to je u skladu sa prethodnim nalazima, koji su naveli početno skraćivanje i kasnije produženje telomera (32, 42, 362). Principijelno, dužina telomera se smanjivala počevši od A stadijuma do C1, a potom su se telomere produžavale kako je stadijum tumora progredirao. Upravo ovo nas je navelo da zaključak da ovaj stadijum predstavlja prekretnicu kada tumor prevazilazi problem skraćivanja telomera prilikom repetitivnih deobi, mehanizmima o kojima se i dalje diskutuje u literaturi, i uspeva da izbegne apoptozu prouzrokovanu kritično kratkom dužinom telomera.

U našem istraživanju smo zaključili da postoji značajna razlika u IC spektrima zdravog i bolesnog tkiva. Dobijeni spektri su pokazivali određene pikove. Pomoću kompjuterskih programa izračunate su površine ispod tih pikova koji su se nalazili u četiri oblasti sledećih talasnih brojeva: oblast I (1128-1205) cm^{-1} , oblast II (1722-1795) cm^{-1} , oblast III (2750-3055) cm^{-1} i oblast IV (1483-1722) cm^{-1} . Sada ćemo prodiskutovati sve četiri oblasti pojedinačno i razmotriti faktore koji su mogli da dovedu do promene u malignom tkivu.

Površina I: Proučavanje ovog frekvencijskog opsega ukazuje na značajne razlike infracrvenog spektra zdravog i bolesnog tkiva debelog creva. U ovoj oblasti se javljaju pikovi koji odgovaraju simetričnim i asimetričnim vibracijama $-\text{PO}_2$ funkcionalne grupe. Fosfati su zastupljeni u nukleinskim kiselinama, kao i membranskim fosfolipidima. Na osnovu poređenja sa relativnim intenzitetima ostalih gradivnih grupa fosfolipida, zaključujemo da fosfodiesterarski delovi nukleinskih kiselina daju dominantan doprinos IC spektru u ovom frekvencijskom opsegu. U malignom tkivu vodonična veza između atoma kiseonika i fosfatne baze u nukleinskim kiselinama je jača, što uslovljava da se traka koja potiče od ovih vibracija pomera ka većim talasnim brojevima u odnosu na traku kod zdravog tkiva. Smanjenje intenziteta trake upućuje na smanjen sadržaj fosfata u malignom tkivu debelog creva, što je verovatno posledica smanjene količine ugljenih hidrata. Traka relativno slabog intenziteta na 1164 cm^{-1} (u normalnom tkivu) se pripisuju vibracijama $-\text{C-O}$ grupe prisutne u proteinima. U malignim tkivima traka ove vibracije menja svoj oblik i položaj maksimuma pika, pomerajući opseg u kome se javlja ova traka na više vrednosti. Ona je sada razdvojena na dva maksimuma, jedan ka nižim frekvencijama, a drugi ka višim frekvencijama. Nižefrekventna traka je

posledica apsorpcije IC zračenja $-C-O$ grupe koja učestvuje u građenju vodonične veze, a višefrekventna traka je prisutna kao posledica prisustva $-C-O$ grupe koja nije vezana vodoničnom vezom. Prisustvo dve trake, pomerene ka višim frekvencijama, a mnogo manjeg intenziteta su nedvosmislen pokazatelj da većina vodoničnih veza u proteinima malignog tkiva više nije postojana. Ovo ukazuje na promene u strukturi aminokiselina kao što su tirozin, serin i treonin (145, 376, 377). Takođe, u ovom intervalu se javljaju i trake od apsorpcije lanca acil grupe iz membranskih lipida. Uzimajući u obzir odnos relativnog intenziteta vibracija $-C=O$ i $-C-O$ zaključujemo da je apsorpcija acil grupe zanemarljiva (378). U oblasti oko 1160 cm^{-1} se javljaju i grupne vibracije $-C-H$ funkcionalne grupe koja je prisutna u lancima ugljenih hidrata (377).

Površina II: Prisustvo intenzivnog, oštrog pika u ovoj oblasti je veoma dobar indikator zdravog tkiva. U našim uzorcima on se javlja kod svih pacijenata, osim kod pacijenata 2 i 4. Kod malignog tkiva, vibraciona struktura spektra se značajno narušava, a intenzitet trake se hipohromno pomera. Maksimum vibracione trake na talasnom broju 1743 cm^{-1} se pripisuje vibraciji karbonilne funkcionalne grupe $-C=O$, koja je prisutna u lipidima, kao deo nezasićenih masnih kiselina. Kod malignog tkiva ova traka više nema izražen apsorpcioni maksimum, a oblast frekvencija u kom se javlja se pomera ka većim talasnim brojevima. Uzevši u obzir proporcionalnost konstante sile veze i frekvencije kojom vibriraju atomi koji grade tu vezu možemo zaključiti da je u malignom tkivu $-C=O$ veza jača. Može se pretpostaviti da je uzrok tome manji broj vodoničnih veza, koje bi odvlačile naelektrisanje sa atoma kiseonika i slabile vezu u karbonilnoj grupi (377).

Površina III: Ovo je oblast najvećih frekvencija, na kojima se javlja apsorpcija infracrvenog zračenja od strane biomolekula prisutnih u tkivu debelog creva. U zdravom tkivu to je dublet velikog intenziteta. Kod malignog tkiva intenzitet trake primetno slabi. Ovo je oblast u kojoj apsorbuje $-C-H$ grupa. Maksimum na talasnom broju 2850 cm^{-1} se pripisuje simetričnim istežanjima $-CH_2$ u metilenskim lancima koji grade membranske lipide. Drugi pik, na nešto većoj frekvenciji 2960 cm^{-1} potiče od asimetrične istežuće vibracije $-CH_3$ (metilenske) funkcionalne grupe. Metil grupe na krajevima lanca membranskih lipida, kao i one u proteinima imaju otprilike istu oblast apsorpcije IC zračenja, što znači da podjednako doprinose intenzitetu trake na 2960 cm^{-1} . Sa spektara malignog tkiva je uočljivo da se oblast u kojoj se javlja traka vibracije metil grupe neznatno smanjuju, dok se oblast frekvencija metilenske grupe povećava. To ukazuje da je u malignom tkivu veći broj metil grupa u odnosu na broj metilenskih grupa. Metilenska grupa se u biomolekulima uglavnom javlja kao most između dva lanca, tako da određuje načine vezivanja lanaca i konformacije biomolekula. Zaključak je da je struktura metilenskih lanaca, koji grade lipide neuređenija kod malignog tkiva, nego kod zdravog tkiva (379).

Površina IV: U oblasti ovih frekvencija spektar malignog tkiva pokazuje suprotno ponašanje od spektara prethodne tri oblasti. Intenzitet apsorpcije malignog tkiva, u ovom intervalu je veći nego kod zdravog tkiva. Ovo je oblast apsorpcije amidne grupe. Na talasnom broju 1550 cm^{-1} se javlja *amid II* traka, a na 1643 cm^{-1} *amid I* traka. Znatno veći intenzitet ovih traka pokazuje da maligno tkivo sadrži veći broj aminokiselina, odnosno proteina, koji su od njih izdrađeni (376).

6. ZAKLJUČCI

Na osnovu rezultata sprovedenog istraživanja, mogu se izvesti sledeći zaključci:

1. Mi smo pronašli značajne promene u koncentracijama natrijuma, kalijuma, magnezijuma, kalcijuma, bakra, cinka, selena, mangana, kadmijuma, hroma i žive u tumorskom tkivu kolorektalnog karcinoma u odnosu na zdravu mukožu. Naime, u tumoru su značajno veće koncentracije kalijuma, magnezijuma, bakra, selena i kalcijuma, dok su natrijum, cink, kadmijum, živa i hrom u značajno manjoj koncentraciji u odnosu na zdravo tkivo. Ostali ispitivani elementi, mangan, gvožđe, aluminijum, olovo, uranijum, arsen, kobalt, nikl i kalaj, nisu pokazali značajnu razliku u koncentracijama. Pokazali smo da je odnos bakar/cink značajno veći u tumorskom tkivu nego u zdravoj mukozi, kao i da pacijenti u više uznapredovalim stadijumima karcinoma takođe imaju veći odnos bakar/cink. Zato predlažemo potencijalni značaj odnosa bakar/cink kao prognostičkog faktora za invazivnost i progresiju kolorektalnog karcinoma.

2. Naše istraživanje je pokazalo značajno veće koncentracije malondialdehida u tumorskom tkivu u odnosu na zdravu mukožu, dok nije bilo razlike u koncentracijama, tj. aktivnosti katalaze ni u koncentracijama azot monoksida. Takođe smo pokazali značajno veće koncentracije serumske mokraćne kiseline kod muškaraca u odnosu na žene, i pozitivnu korelaciju nivoa serumske mokraćne kiseline sa relativnom dužinom telomera u leukocitima periferne krvi.

3. Naše istraživanje je pokazalo značajne razlike u sastavu masnih kiseline između tumorskog tkiva i zdrave mukoze.

- nije bilo razlike u koncentracijama palmitoleinske kiseline između tumorskog tkiva i zdrave mukoze, ali je to jedina masna kiselina čiji je sadržaj zavisio od stadijuma tumora.

- pokazali smo značajno veći odnos AA/EPA u tumorskom tkivu, što potvrđuje da je inflamatorno okruženje tumora nezaobilazan faktor u neoplastičnom procesu, podstičući proliferaciju, preživljavanje i migraciju malignih ćelija. Zato predlažemo AA/EPA odnos kao pouzdaniji pokazatelj inflamatornog statusa tumora i njegove progresije.

- veće vrednosti saturacionog indeksa govore u prilog biološki manje agresivnog tumora i jačeg imunskog odgovora.

4. Naše istraživanje je pokazalo da su najduže telomere u tumorskom tkivu, značajno duže nego u zdravoj mukozi i leukocitima periferne krvi, dok su najkraće telomere bile u zdravoj mukozi. Uzimajući u obzir stadijum tumora, C1 gradus modifikovane Astler-Coller skale je pokazao najkraće telomere u odnosu na više i niže stadijume. Takođe smo pokazali pozitivnu korelaciju između relativne dužine telomera između tumorskog tkiva i zdrave mukoze. Osim toga smo pokazali i negativnu korelaciju između relativne dužine telomera između leukocita periferne krvi i godina života pacijenata.

5. Patohistološki mikrofotografiji su digitalizovani, izdvojena su jedra ćelija iz tumorskog tkiva kolorektalnog karcinoma, kao i iz zdrave mukoze, i podvrgnuta kvantitativnoj karakterizaciji strukturnih i teksturnih parametara hromatina. Uočene su značajne razlike u vrednostima pojedinih parametara između prvog i drugog stadijuma sa jedne strane, i trećeg i posebno četvrtog sa druge. U prvom i drugom stadijumu bi se lako moglo automatski izdvojiti tumorsko tkivo odnosno zdrava mukoza, dok, posebno u četvrtom stadijumu, karakterizacija daje sličan rezultat i za tumorsko tkivo i za zdravu mukožu.

6. Prikazane su različite spektralne karakteristike zdravog i kancerogenog tkiva u našem istraživanju. Na osnovu toga, u malignim tkivima prisutna je manja količina lipida, kao i nukleinskih kiselina, dok se količina prisutnih molekula proteina uvećava.

7. Promene u sastavu elemenata, proinflammatoryh parametara, masnih kiselina i telomera, koje je ovo istraživanje pokazalo, jasno ukazuju da je tkivo kolorektalnog karcinoma metabolički veoma aktivno i izmenjenih fizioloških procesa. Rezultati koje smo mi dobili će doprineti boljem razumevanju svih ovih promena. Veoma je važna dalja i detaljna karakterizacija tumorskog tkiva kolorektalnog karcinoma, sve do molekularnog nivoa. Sa boljim razumevanjem ovih procesa pružiće se nove mogućnosti u ranijoj dijagnostici i efikasnijem lečenju pacijenata, što je i naš osnovni cilj. Kao relativno novu metodu izneli smo i infracrvenu spektroskopiju, koja se nameće kao nov alat u ranom otkrivanju kolorektalnog karcinoma, ne samo u laboratorijskom, već i u kliničkom radu. Dodatno, ispitali smo mogućnost upotrebe strukturnih i teksturnih parametara jedara ćelija, kako u tumorskom tkivu tako i u zdravoj mukozi, za raspoznavanje tkiva i stadijuma. Ove metode bi se mogle primeniti u kompjuterizovanom pregledu histopatoloških mikrografa.

7. REFERENCE

1. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2018;68(6):394-424.
2. Organization WH. Global Health Observatory. Geneva: World Health Organization; 2018. Available: [who int/gho/database/en/](http://who.int/gho/database/en/)[Accessed 10 July 2019]. 2018.
3. Omran AR. The epidemiologic transition. A theory of the epidemiology of population change. *Milbank Mem Fund Q*. 1971;49(4):509-38.
4. Gersten O, Wilmoth JR. The Cancer Transition in Japan since 1951. *Demographic Research*. 2002;7(5):271-306.
5. Bray F. Transitions in human development and the global cancer burden in World Cancer Report 2014. Editors Bernard W Stewart, Christopher P Wild Lyon: Naturaprint. 2014.
6. Maule M, Merletti F. Cancer transition and priorities for cancer control. *Lancet Oncol*. 2012;13(8):745-6.
7. Bullard Dunn KM, Rothenberger, DA. Colon, Rectum, and Anus. In: F. Charles Brunicaardi M, FACS, editor. *Schwartz's Principles of Surgery*. New York: McGraw Hill Education; 2015.
8. Fidler MM, Soerjomataram I, Bray F. A global view on cancer incidence and national levels of the human development index. *Int J Cancer*. 2016;139(11):2436-46.
9. Arnold M, Sierra MS, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality. *Gut*. 2017;66(4):683-91.
10. Schreuders EH, Ruco A, Rabeneck L, Schoen RE, Sung JJ, Young GP, et al. Colorectal cancer screening: a global overview of existing programmes. *Gut*. 2015;64(10):1637-49.
11. Thun M, Linet MS, Cerhan JR, Haiman CA, Schottenfeld D. *Cancer epidemiology and prevention*: Oxford University Press; 2017.
12. Magalhães B, Peleteiro B, Lunet N. Dietary patterns and colorectal cancer: systematic review and meta-analysis. *Eur J Cancer Prev*. 2012;21(1):15-23.
13. Scepanovic M, Jovanovic O, Keber D, Jovanovic I, Miljus D, Nikolic G, et al. Faecal occult blood screening for colorectal cancer in Serbia: a pilot study. *Eur J Cancer Prev*. 2017;26(3):195-200.
14. Ferlay J, Steliarova-Foucher E, Lortet-Tieulent J, Rosso S, Coebergh JW, Comber H, et al. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012. *Eur J Cancer*. 2013;49(6):1374-403.
15. Sandra Šipetić Grujičić ZVK, Aleksandra Nikolić. Karcinogeneza i primarna prevencija. In: Krivokapić ZV, editor. *Karcinom debelog creva, od prevencija preko karcinogeneze do metastaze*. 1. Beograd: Zavod za udžbenike; 2018.
16. Keum N, Giovannucci E. Global burden of colorectal cancer: emerging trends, risk factors and prevention strategies. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2019;16(12):713-32.
17. Jasperson KW, Tuohy TM, Neklason DW, Burt RW. Hereditary and familial colon cancer. *Gastroenterology*. 2010;138(6):2044-58.
18. Butterworth AS, Higgins JP, Pharoah P. Relative and absolute risk of colorectal cancer for individuals with a family history: a meta-analysis. *Eur J Cancer*. 2006;42(2):216-27.
19. Rahner N, Steinke V. Hereditary cancer syndromes. *Dtsch Arztebl Int*. 2008;105(41):706-14.
20. Mork ME, You YN, Ying J, Bannon SA, Lynch PM, Rodriguez-Bigas MA, et al. High Prevalence of Hereditary Cancer Syndromes in Adolescents and Young Adults With Colorectal Cancer. *J Clin Oncol*. 2015;33(31):3544-9.
21. Goodenberger ML, Thomas BC, Riegert-Johnson D, Boland CR, Plon SE, Clendenning M, et al. PMS2 monoallelic mutation carriers: the known unknown. *Genet Med*. 2016;18(1):13-9.
22. Win AK, Jenkins MA, Dowty JG, Antoniou AC, Lee A, Giles GG, et al. Prevalence and Penetrance of Major Genes and Polygenes for Colorectal Cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2017;26(3):404-12.
23. Lynch HT, de la Chapelle A. Hereditary colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2003;348(10):919-32.

24. Jass JR, Smyrk TC, Stewart SM, Lane MR, Lanspa SJ, Lynch HT. Pathology of hereditary non-polyposis colorectal cancer. *Anticancer Res.* 1994;14(4b):1631-4.
25. Half E, Bercovich D, Rozen P. Familial adenomatous polyposis. *Orphanet J Rare Dis.* 2009;4:22.
26. Patel SG, Ahnen DJ. Familial colon cancer syndromes: an update of a rapidly evolving field. *Curr Gastroenterol Rep.* 2012;14(5):428-38.
27. Fodde R. The APC gene in colorectal cancer. *Eur J Cancer.* 2002;38(7):867-71.
28. Rui Y, Wang C, Zhou Z, Zhong X, Yu Y. K-Ras mutation and prognosis of colorectal cancer: a meta-analysis. *Hepatogastroenterology.* 2015;62(137):19-24.
29. Caputo F, Santini C, Bardasi C, Cerma K, Casadei-Gardini A, Spallanzani A, et al. BRAF-Mutated Colorectal Cancer: Clinical and Molecular Insights. *Int J Mol Sci.* 2019;20(21):5369.
30. Lefevre JH, Rodrigue CM, Mourra N, Bennis M, Flejou JF, Parc R, et al. Implication of MYH in colorectal polyposis. *Ann Surg.* 2006;244(6):874-9; discussion 879-80.
31. Li XL, Zhou J, Chen ZR, Chng WJ. P53 mutations in colorectal cancer - molecular pathogenesis and pharmacological reactivation. *World J Gastroenterol.* 2015;21(1):84-93.
32. Kroupa M, Rachakonda SK, Liska V, Srinivas N, Urbanova M, Jiraskova K, et al. Relationship of telomere length in colorectal cancer patients with cancer phenotype and patient prognosis. *Br J Cancer.* 2019;121(4):344-50.
33. Savage SA. Beginning at the ends: telomeres and human disease. *F1000Res.* 2018;7.
34. Kawanishi S, Oikawa S. Mechanism of telomere shortening by oxidative stress. *Ann N Y Acad Sci.* 2004;1019:278-84.
35. Blackburn EH, Greider CW, Szostak JW. Telomeres and telomerase: the path from maize, Tetrahymena and yeast to human cancer and aging. *Nat Med.* 2006;12(10):1133-8.
36. Stewénus Y, Gorunova L, Jonson T, Larsson N, Höglund M, Mandahl N, et al. Structural and numerical chromosome changes in colon cancer develop through telomere-mediated anaphase bridges, not through mitotic multipolarity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(15):5541-6.
37. Rampazzo E, Bertorelle R, Serra L, Terrin L, Candiotti C, Pucciarelli S, et al. Relationship between telomere shortening, genetic instability, and site of tumour origin in colorectal cancers. *Br J Cancer.* 2010;102(8):1300-5.
38. Grady WM, Markowitz SD. The molecular pathogenesis of colorectal cancer and its potential application to colorectal cancer screening. *Dig Dis Sci.* 2015;60(3):762-72.
39. Carethers JM, Jung BH. Genetics and Genetic Biomarkers in Sporadic Colorectal Cancer. *Gastroenterology.* 2015;149(5):1177-90.e3.
40. Bertorelle R, Rampazzo E, Pucciarelli S, Nitti D, De Rossi A. Telomeres, telomerase and colorectal cancer. *World J Gastroenterol.* 2014;20(8):1940-50.
41. Svenson U, Öberg Å, Stenling R, Palmqvist R, Roos G. Telomere length in peripheral leukocytes is associated with immune cell tumor infiltration and prognosis in colorectal cancer patients. *Tumour Biol.* 2016;37(8):10877-82.
42. Mzahma R, Kharrat M, Fetiriche F, Bouasker, Ben Moussa M, Ben Safta Z, et al. The relationship between telomere length and clinicopathologic characteristics in colorectal cancers among Tunisian patients. *Tumour Biol.* 2015;36(11):8703-13.
43. Suraweera N, Mouradov D, Li S, Jorissen RN, Hampson D, Ghosh A, et al. Relative telomere lengths in tumor and normal mucosa are related to disease progression and chromosome instability profiles in colorectal cancer. *Oncotarget.* 2016;7(24):36474-88.
44. Balç'h EL, Grandin N, Demattei MV, Guyétant S, Tallet A, Pagès JC, et al. Measurement of Telomere Length in Colorectal Cancers for Improved Molecular Diagnosis. *Int J Mol Sci.* 2017;18(9):1871.
45. Kune GA. The Melbourne Colorectal Cancer Study: reflections on a 30-year experience. *Med J Aust.* 2010;193(11-12):648-52.
46. Mousavi SM, Fallah M, Sundquist K, Hemminki K. Age- and time-dependent changes in cancer incidence among immigrants to Sweden: colorectal, lung, breast and prostate cancers. *Int J Cancer.* 2012;131(2):E122-8.

47. Liang PS, Chen TY, Giovannucci E. Cigarette smoking and colorectal cancer incidence and mortality: systematic review and meta-analysis. *Int J Cancer*. 2009;124(10):2406-15.
48. Research WCRFAIfC. Continuous update project report: Diet, nutrition, physical activity, and colorectal cancer: American Institute for Cancer Research; 2018 [Available from: <https://www.aicr.org/continuous-update-project/reports/colorectal-cancer-2017-report.pdf>.]
49. Mansournia MA, Altman DG. Population attributable fraction. *Bmj*. 2018;360:k757.
50. Renehan AG, Tyson M, Egger M, Heller RF, Zwahlen M. Body-mass index and incidence of cancer: a systematic review and meta-analysis of prospective observational studies. *The lancet*. 2008;371(9612):569-78.
51. Dong Y, Zhou J, Zhu Y, Luo L, He T, Hu H, et al. Abdominal obesity and colorectal cancer risk: systematic review and meta-analysis of prospective studies. *Biosci Rep*. 2017;37(6):BSR20170945.
52. Song M, Hu FB, Spiegelman D, Chan AT, Wu K, Ogino S, et al. Long-term status and change of body fat distribution, and risk of colorectal cancer: a prospective cohort study. *Int J Epidemiol*. 2016;45(3):871-83.
53. Moore LL, Bradlee ML, Singer MR, Splansky GL, Proctor MH, Ellison RC, et al. BMI and waist circumference as predictors of lifetime colon cancer risk in Framingham Study adults. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2004;28(4):559-67.
54. Samaras K, Botelho NK, Chisholm DJ, Lord RV. Subcutaneous and visceral adipose tissue gene expression of serum adipokines that predict type 2 diabetes. *Obesity (Silver Spring)*. 2010;18(5):884-9.
55. Bruun JM, Lihn AS, Pedersen SB, Richelsen B. Monocyte chemoattractant protein-1 release is higher in visceral than subcutaneous human adipose tissue (AT): implication of macrophages resident in the AT. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005;90(4):2282-9.
56. Ouchi N, Parker JL, Lugus JJ, Walsh K. Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nat Rev Immunol*. 2011;11(2):85-97.
57. Park J, Morley TS, Kim M, Clegg DJ, Scherer PE. Obesity and cancer--mechanisms underlying tumour progression and recurrence. *Nat Rev Endocrinol*. 2014;10(8):455-65.
58. Calle EE, Kaaks R. Overweight, obesity and cancer: epidemiological evidence and proposed mechanisms. *Nat Rev Cancer*. 2004;4(8):579-91.
59. Lim U, Ernst T, Buchthal SD, Latch M, Albright CL, Wilkens LR, et al. Asian women have greater abdominal and visceral adiposity than Caucasian women with similar body mass index. *Nutr Diabetes*. 2011;1(5):e6.
60. Karastergiou K, Smith SR, Greenberg AS, Fried SK. Sex differences in human adipose tissues - the biology of pear shape. *Biol Sex Differ*. 2012;3(1):13.
61. Ning Y, Wang L, Giovannucci EL. A quantitative analysis of body mass index and colorectal cancer: findings from 56 observational studies. *Obes Rev*. 2010;11(1):19-30.
62. Murphy N, Strickler HD, Stanczyk FZ, Xue X, Wassertheil-Smoller S, Rohan TE, et al. A Prospective Evaluation of Endogenous Sex Hormone Levels and Colorectal Cancer Risk in Postmenopausal Women. *J Natl Cancer Inst*. 2015;107(10):dju210.
63. Hetemäki N, Savolainen-Peltonen H, Tikkanen MJ, Wang F, Paatela H, Hämäläinen E, et al. Estrogen Metabolism in Abdominal Subcutaneous and Visceral Adipose Tissue in Postmenopausal Women. *J Clin Endocrinol Metab*. 2017;102(12):4588-95.
64. Thrift AP, Gong J, Peters U, Chang-Claude J, Rudolph A, Slattery ML, et al. Mendelian Randomization Study of Body Mass Index and Colorectal Cancer Risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2015;24(7):1024-31.
65. Research WCRFAIfC. World Cancer Research Fund International Systematic Literature Review: The Associations between Food, Nutrition and Physical Activity and the Risk of Colorectal Cancer, 2017.: World Cancer Research Fund; 2017 [Available from: <https://www.wcrf.org/sites/default/files/colorectal-cancer-slr.pdf>.]

66. Rezende LFM, Sá TH, Markozannes G, Rey-López JP, Lee IM, Tsilidis KK, et al. Physical activity and cancer: an umbrella review of the literature including 22 major anatomical sites and 770 000 cancer cases. *Br J Sports Med.* 2018;52(13):826-33.
67. Kushi LH, Doyle C, McCullough M, Rock CL, Demark-Wahnefried W, Bandera EV, et al. American Cancer Society Guidelines on nutrition and physical activity for cancer prevention: reducing the risk of cancer with healthy food choices and physical activity. *CA Cancer J Clin.* 2012;62(1):30-67.
68. Jetté M, Sidney K, Blümchen G. Metabolic equivalents (METs) in exercise testing, exercise prescription, and evaluation of functional capacity. *Clin Cardiol.* 1990;13(8):555-65.
69. Ruiz-Casado A, Martín-Ruiz A, Pérez LM, Provencio M, Fiuza-Luces C, Lucia A. Exercise and the Hallmarks of Cancer. *Trends Cancer.* 2017;3(6):423-41.
70. Giovannucci E. An Integrative Approach for Deciphering the Causal Associations of Physical Activity and Cancer Risk: The Role of Adiposity. *J Natl Cancer Inst.* 2018;110(9):935-41.
71. Ross R, Dagnone D, Jones PJ, Smith H, Paddags A, Hudson R, et al. Reduction in obesity and related comorbid conditions after diet-induced weight loss or exercise-induced weight loss in men. A randomized, controlled trial. *Ann Intern Med.* 2000;133(2):92-103.
72. Ross R, Janssen I, Dawson J, Kungl AM, Kuk JL, Wong SL, et al. Exercise-induced reduction in obesity and insulin resistance in women: a randomized controlled trial. *Obes Res.* 2004;12(5):789-98.
73. Keum N, Bao Y, Smith-Warner SA, Orav J, Wu K, Fuchs CS, et al. Association of Physical Activity by Type and Intensity With Digestive System Cancer Risk. *JAMA Oncol.* 2016;2(9):1146-53.
74. Schmid D, Leitzmann MF. Television viewing and time spent sedentary in relation to cancer risk: a meta-analysis. *J Natl Cancer Inst.* 2014;106(7):dju098.
75. Ma P, Yao Y, Sun W, Dai S, Zhou C. Daily sedentary time and its association with risk for colorectal cancer in adults: A dose-response meta-analysis of prospective cohort studies. *Medicine (Baltimore).* 2017;96(22):e7049.
76. Lynch BM. Sedentary behavior and cancer: a systematic review of the literature and proposed biological mechanisms. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2010;19(11):2691-709.
77. Healy GN, Dunstan DW, Salmon J, Cerin E, Shaw JE, Zimmet PZ, et al. Breaks in sedentary time: beneficial associations with metabolic risk. *Diabetes Care.* 2008;31(4):661-6.
78. Cespedes EM, Hu FB. Dietary patterns: from nutritional epidemiologic analysis to national guidelines. *Am J Clin Nutr.* 2015;101(5):899-900.
79. Tabung FK, Brown LS, Fung TT. Dietary Patterns and Colorectal Cancer Risk: A Review of 17 Years of Evidence (2000-2016). *Curr Colorectal Cancer Rep.* 2017;13(6):440-54.
80. Garcia-Larsen V, Morton V, Norat T, Moreira A, Potts JF, Reeves T, et al. Dietary patterns derived from principal component analysis (PCA) and risk of colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *Eur J Clin Nutr.* 2019;73(3):366-86.
81. Gamage SMK, Dissabandara L, Lam AK, Gopalan V. The role of heme iron molecules derived from red and processed meat in the pathogenesis of colorectal carcinoma. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2018;126:121-8.
82. Helmus DS, Thompson CL, Zelenskiy S, Tucker TC, Li L. Red meat-derived heterocyclic amines increase risk of colon cancer: a population-based case-control study. *Nutr Cancer.* 2013;65(8):1141-50.
83. Cascella M, Bimonte S, Barbieri A, Del Vecchio V, Caliendo D, Schiavone V, et al. Dissecting the mechanisms and molecules underlying the potential carcinogenicity of red and processed meat in colorectal cancer (CRC): an overview on the current state of knowledge. *Infect Agent Cancer.* 2018;13:3.
84. Vieira AR, Abar L, Chan DSM, Vingeliene S, Polemiti E, Stevens C, et al. Foods and beverages and colorectal cancer risk: a systematic review and meta-analysis of cohort studies, an update of the evidence of the WCRF-AICR Continuous Update Project. *Ann Oncol.* 2017;28(8):1788-802.

85. Tabung FK, Liu L, Wang W, Fung TT, Wu K, Smith-Warner SA, et al. Association of Dietary Inflammatory Potential With Colorectal Cancer Risk in Men and Women. *JAMA Oncol.* 2018;4(3):366-73.
86. Fung TT, Hu FB, Schulze M, Pollak M, Wu T, Fuchs CS, et al. A dietary pattern that is associated with C-peptide and risk of colorectal cancer in women. *Cancer Causes Control.* 2012;23(6):959-65.
87. Burkitt DP. Epidemiology of cancer of the colon and rectum. *Cancer.* 1971;28(1):3-13.
88. Holscher HD. Dietary fiber and prebiotics and the gastrointestinal microbiota. *Gut Microbes.* 2017;8(2):172-84.
89. Zeng H, Lazarova DL, Bordonaro M. Mechanisms linking dietary fiber, gut microbiota and colon cancer prevention. *World J Gastrointest Oncol.* 2014;6(2):41-51.
90. Zeng H, Taussig DP, Cheng WH, Johnson LK, Hakkak R. Butyrate Inhibits Cancerous HCT116 Colon Cell Proliferation but to a Lesser Extent in Noncancerous NCM460 Colon Cells. *Nutrients.* 2017;9(1).
91. Elce A, Amato F, Zarrilli F, Calignano A, Troncone R, Castaldo G, et al. Butyrate modulating effects on pro-inflammatory pathways in human intestinal epithelial cells. *Benef Microbes.* 2017;8(5):841-7.
92. Shang FM, Liu HL. *Fusobacterium nucleatum* and colorectal cancer: A review. *World J Gastrointest Oncol.* 2018;10(3):71-81.
93. Mehta RS, Nishihara R, Cao Y, Song M, Mima K, Qian ZR, et al. Association of Dietary Patterns With Risk of Colorectal Cancer Subtypes Classified by *Fusobacterium nucleatum* in Tumor Tissue. *JAMA Oncol.* 2017;3(7):921-7.
94. Aune D, Chan DS, Lau R, Vieira R, Greenwood DC, Kampman E, et al. Dietary fibre, whole grains, and risk of colorectal cancer: systematic review and dose-response meta-analysis of prospective studies. *BMJ.* 2011;343:d6617.
95. Kunzmann AT, Coleman HG, Huang WY, Kitahara CM, Cantwell MM, Berndt SI. Dietary fiber intake and risk of colorectal cancer and incident and recurrent adenoma in the Prostate, Lung, Colorectal, and Ovarian Cancer Screening Trial. *Am J Clin Nutr.* 2015;102(4):881-90.
96. Song M, Wu K, Meyerhardt JA, Ogino S, Wang M, Fuchs CS, et al. Fiber Intake and Survival After Colorectal Cancer Diagnosis. *JAMA Oncol.* 2018;4(1):71-9.
97. Alberts DS, Martínez ME, Roe DJ, Guillén-Rodríguez JM, Marshall JR, van Leeuwen JB, et al. Lack of effect of a high-fiber cereal supplement on the recurrence of colorectal adenomas. Phoenix Colon Cancer Prevention Physicians' Network. *N Engl J Med.* 2000;342(16):1156-62.
98. Choi YJ, Myung SK, Lee JH. Light Alcohol Drinking and Risk of Cancer: A Meta-Analysis of Cohort Studies. *Cancer Res Treat.* 2018;50(2):474-87.
99. Cho E, Smith-Warner SA, Ritz J, van den Brandt PA, Colditz GA, Folsom AR, et al. Alcohol intake and colorectal cancer: a pooled analysis of 8 cohort studies. *Ann Intern Med.* 2004;140(8):603-13.
100. Salaspuro M. Microbial metabolism of ethanol and acetaldehyde and clinical consequences. *Addict Biol.* 1997;2(1):35-46.
101. Seitz HK, Stickel F. Molecular mechanisms of alcohol-mediated carcinogenesis. *Nat Rev Cancer.* 2007;7(8):599-612.
102. Mizoue T, Inoue M, Wakai K, Nagata C, Shimazu T, Tsuji I, et al. Alcohol drinking and colorectal cancer in Japanese: a pooled analysis of results from five cohort studies. *Am J Epidemiol.* 2008;167(12):1397-406.
103. Li H, Borinskaya S, Yoshimura K, Kal'ina N, Marusin A, Stepanov VA, et al. Refined geographic distribution of the oriental ALDH2*504Lys (nee 487Lys) variant. *Ann Hum Genet.* 2009;73(Pt 3):335-45.
104. Chen CH, Ferreira JCB, Joshi AU, Stevens MC, Li SJ, Hsu JH, et al. Novel and prevalent non-East Asian ALDH2 variants; Implications for global susceptibility to aldehydes' toxicity. *EBioMedicine.* 2020;55:102753.

105. Zhao H, Liu KJ, Lei ZD, Lei SL, Tian YQ. Meta-analysis of the aldehyde dehydrogenases-2 (ALDH2) Glu487Lys polymorphism and colorectal cancer risk. *PLoS One*. 2014;9(2):e88656.
106. Giovannucci E, Martínez ME. Tobacco, colorectal cancer, and adenomas: a review of the evidence. *J Natl Cancer Inst*. 1996;88(23):1717-30.
107. Johnson CM, Wei C, Ensor JE, Smolenski DJ, Amos CI, Levin B, et al. Meta-analyses of colorectal cancer risk factors. *Cancer Causes Control*. 2013;24(6):1207-22.
108. Murphy N, Ward HA, Jenab M, Rothwell JA, Boutron-Ruault MC, Carbonnel F, et al. Heterogeneity of Colorectal Cancer Risk Factors by Anatomical Subsite in 10 European Countries: A Multinational Cohort Study. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2019;17(7):1323-31.e6.
109. Marić N. Koliko je stres faktor rizika za nastanak karcinoma? In: Krivokapić ZV, editor. *Karcinom debelog creva - od prevencije preko karcinogeneze do metastaze*. 1. Beograd: Zavod za udžbenike; 2018.
110. Lečić Toševski DV, O; Pejušković, B; Marić, NP. . Stress and its multiple faces. In: TK Z-HVS, editor. *The SAGE Handbook of Personality and Individual Differences*. 3: SAGE Publications Ltd; 2018.
111. Jašović-Gašić M, Totić, S. Psihoonkologija - opšti principi. Beograd: Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu (CIBIF); 1994.
112. Greer S, Morris T, Pettingale KW, Haybittle JL. Psychological response to breast cancer and 15-year outcome. *Lancet*. 1990;335(8680):49-50.
113. Garssen B. Psycho-oncology and cancer: linking psychosocial factors with cancer development. *Ann Oncol*. 2002;13 Suppl 4:171-5.
114. Chida Y, Hamer M, Wardle J, Steptoe A. Do stress-related psychosocial factors contribute to cancer incidence and survival? *Nat Clin Pract Oncol*. 2008;5(8):466-75.
115. Jokela M, Batty GD, Hintsala T, Elovainio M, Hakulinen C, Kivimäki M. Is personality associated with cancer incidence and mortality? An individual-participant meta-analysis of 2156 incident cancer cases among 42,843 men and women. *Br J Cancer*. 2014;110(7):1820-4.
116. Anacker C, Zunszain PA, Carvalho LA, Pariante CM. The glucocorticoid receptor: pivot of depression and of antidepressant treatment? *Psychoneuroendocrinology*. 2011;36(3):415-25.
117. Lukic I, Mitic M, Soldatovic I, Jovicic M, Maric N, Radulovic J, et al. Accumulation of cytoplasmic glucocorticoid receptor is related to elevation of FKBP5 in lymphocytes of depressed patients. *J Mol Neurosci*. 2015;55(4):951-8.
118. Tariq K, Ghias K. Colorectal cancer carcinogenesis: a review of mechanisms. *Cancer Biol Med*. 2016;13(1):120-35.
119. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*. 1990;61(5):759-67.
120. Smith G, Carey FA, Beattie J, Wilkie MJ, Lightfoot TJ, Coxhead J, et al. Mutations in APC, Kirsten-ras, and p53--alternative genetic pathways to colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(14):9433-8.
121. Weisenberger DJ, Siegmund KD, Campan M, Young J, Long TI, Faasse MA, et al. CpG island methylator phenotype underlies sporadic microsatellite instability and is tightly associated with BRAF mutation in colorectal cancer. *Nat Genet*. 2006;38(7):787-93.
122. East JE, Saunders BP, Jass JR. Sporadic and syndromic hyperplastic polyps and serrated adenomas of the colon: classification, molecular genetics, natural history, and clinical management. *Gastroenterol Clin North Am*. 2008;37(1):25-46, v.
123. Wieten E, Schreuders EH, Grobbee EJ, Nieboer D, Bramer WM, Lansdorp-Vogelaar I, et al. Incidence of faecal occult blood test interval cancers in population-based colorectal cancer screening: a systematic review and meta-analysis. *Gut*. 2019;68(5):873-81.
124. Imperiale TF, Ransohoff DF, Itzkowitz SH, Levin TR, Lavin P, Lidgard GP, et al. Multitarget stool DNA testing for colorectal-cancer screening. *N Engl J Med*. 2014;370(14):1287-97.
125. Bibbins-Domingo K, Grossman DC, Curry SJ, Davidson KW, Epling JW, García FA, et al. Screening for colorectal cancer: US Preventive Services Task Force recommendation statement. *Jama*. 2016;315(23):2564-75.

126. Brenner H, Stock C, Hoffmeister M. Effect of screening sigmoidoscopy and screening colonoscopy on colorectal cancer incidence and mortality: systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials and observational studies. *BMJ*. 2014;348:g2467.
127. Kim SY, Kim HS, Park HJ. Adverse events related to colonoscopy: Global trends and future challenges. *World J Gastroenterol*. 2019;25(2):190-204.
128. Welch HG, Black WC. Overdiagnosis in cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2010;102(9):605-13.
129. Wolf AMD, Fontham ETH, Church TR, Flowers CR, Guerra CE, LaMonte SJ, et al. Colorectal cancer screening for average-risk adults: 2018 guideline update from the American Cancer Society. *CA Cancer J Clin*. 2018;68(4):250-81.
130. Ebell MH, Thai TN, Royalty KJ. Cancer screening recommendations: an international comparison of high income countries. *Public Health Rev*. 2018;39:7.
131. Smith RA, Brooks D, Cokkinides V, Saslow D, Brawley OW. Cancer screening in the United States, 2013: a review of current American Cancer Society guidelines, current issues in cancer screening, and new guidance on cervical cancer screening and lung cancer screening. *CA Cancer J Clin*. 2013;63(2):88-105.
132. Bos A, Matthijsen RA, van Erning FN, van Oijen MGH, Rutten HJT, Lemmens V. Treatment and Outcome of Synchronous Colorectal Carcinomas: A Nationwide Study. *Ann Surg Oncol*. 2018;25(2):414-21.
133. Garcia-Aguilar J, Pollack J, Lee SH, Hernandez de Anda E, Mellgren A, Wong WD, et al. Accuracy of endorectal ultrasonography in preoperative staging of rectal tumors. *Dis Colon Rectum*. 2002;45(1):10-5.
134. Reddy NK, Markowitz AB, Abbruzzese JL, Bhutani MS. Knowledge of indications and utilization of EUS: a survey of oncologists in the United States. *J Clin Gastroenterol*. 2008;42(8):892-6.
135. Dukes C. The classification of cancer of the rectum. *J Pathol*. 1932;35:323-32.
136. Astler VB, Collier FA. The prognostic significance of direct extension of carcinoma of the colon and rectum. *Ann Surg*. 1954;139(6):846-52.
137. Amin MB, Greene FL, Edge SB, Compton CC, Gershenwald JE, Brookland RK, et al. The Eighth Edition AJCC Cancer Staging Manual: Continuing to build a bridge from a population-based to a more "personalized" approach to cancer staging. *CA Cancer J Clin*. 2017;67(2):93-9.
138. O'Connell JB, Maggard MA, Ko CY. Colon cancer survival rates with the new American Joint Committee on Cancer sixth edition staging. *J Natl Cancer Inst*. 2004;96(19):1420-5.
139. Sirinukunwattana K, Snead D, Epstein D, Aftab Z, Mujeeb I, Tsang YW, et al. Novel digital signatures of tissue phenotypes for predicting distant metastasis in colorectal cancer. *Sci Rep*. 2018;8(1):13692.
140. Bera K, Schalper KA, Rimm DL, Velcheti V, Madabhushi A. Artificial intelligence in digital pathology - new tools for diagnosis and precision oncology. *Nat Rev Clin Oncol*. 2019;16(11):703-15.
141. Pell R, Oien K, Robinson M, Pitman H, Rajpoot N, Rittscher J, et al. The use of digital pathology and image analysis in clinical trials. *J Pathol Clin Res*. 2019;5(2):81-90.
142. Oliveira SP, Neto PC, Fraga J, Montezuma D, Monteiro A, Monteiro J, et al. CAD systems for colorectal cancer from WSI are still not ready for clinical acceptance. *Sci Rep*. 2021;11(1):14358.
143. Wright AI, Dunn CM, Hale M, Hutchins GGA, Treanor DE. The Effect of Quality Control on Accuracy of Digital Pathology Image Analysis. *IEEE J Biomed Health Inform*. 2021;25(2):307-14.
144. Ponzio F, Urgese G, Ficarra E, Di Cataldo S. Dealing with Lack of Training Data for Convolutional Neural Networks: The Case of Digital Pathology. *Electronics*. 2019;8(3):256.
145. Sahu R, Mordechai S. Fourier transform infrared spectroscopy in cancer detection. *Future Oncol*. 2005;1(5):635-47.
146. Argov S, Ramesh J, Salman A, Sinelnikov I, Goldstein J, Guterman H, et al. Diagnostic potential of Fourier-transform infrared microspectroscopy and advanced computational methods in colon cancer patients. *J Biomed Opt*. 2002;7(2):248-54.

147. Sahu RK, Argov S, Bernshtain E, Salman A, Walfisch S, Goldstein J, et al. Detection of abnormal proliferation in histologically 'normal' colonic biopsies using FTIR-microspectroscopy. *Scand J Gastroenterol.* 2004;39(6):557-66.
148. Argov S, Sahu RK, Bernshtain E, Salman A, Shohat G, Zelig U, et al. Inflammatory bowel diseases as an intermediate stage between normal and cancer: a FTIR-microspectroscopy approach. *Biopolymers.* 2004;75(5):384-92.
149. Andrus PG, Strickland RD. Cancer grading by Fourier transform infrared spectroscopy. *Biospectroscopy.* 1998;4(1):37-46.
150. Ramesh J, Huleihel M, Mordechai J, Moser A, Erukhimovich V, Levi C, et al. Preliminary results of evaluation of progress in chemotherapy for childhood leukemia patients employing Fourier-transform infrared microspectroscopy and cluster analysis. *J Lab Clin Med.* 2003;141(6):385-94.
151. Mantsch HH, Chapman D. *Infrared spectroscopy of biomolecules: Wiley-Liss;* 1996.
152. Naumann D. FT-infrared and FT-Raman spectroscopy in biomedical research. *Applied spectroscopy reviews.* 2001;36(2-3):239-98.
153. Wood BR, Chiriboga L, Yee H, Quinn MA, McNaughton D, Diem M. Fourier transform infrared (FTIR) spectral mapping of the cervical transformation zone, and dysplastic squamous epithelium. *Gynecol Oncol.* 2004;93(1):59-68.
154. Ramesh J, Salman A, Mordechai S, Argov S, Goldstein J, Sinelnikov I, et al. FTIR Microscopic Studies on Normal, Polyp, and Malignant Human Colonic Tissues. *Subsurface Sensing Technologies and Applications.* 2001;2(2):99-117.
155. Gazi E, Dwyer J, Lockyer N, Gardner P, Vickerman JC, Miyan J, et al. The combined application of FTIR microspectroscopy and ToF-SIMS imaging in the study of prostate cancer. *Faraday Discuss.* 2004;126:41-59; discussion 77-92.
156. Liu KZ, Schultz CP, Johnston JB, Beck FW, Al-Katib AM, Mohammad RM, et al. Infrared spectroscopic study of bryostatatin 1-induced membrane alterations in a B-CLL cell line. *Leukemia.* 1999;13(8):1273-80.
157. Takahashi S, Satomi A, Yano K, Kawase H, Tanimizu T, Tuji Y, et al. Estimation of glycogen levels in human colorectal cancer tissue: relationship with cell cycle and tumor outgrowth. *J Gastroenterol.* 1999;34(4):474-80.
158. Malins DC, Johnson PM, Barker EA, Polissar NL, Wheeler TM, Anderson KM. Cancer-related changes in prostate DNA as men age and early identification of metastasis in primary prostate tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(9):5401-6.
159. Malins DC, Anderson KM, Gilman NK, Green VM, Barker EA, Hellström KE. Development of a cancer DNA phenotype prior to tumor formation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(29):10721-5.
160. Malins DC, Gilman NK, Green VM, Wheeler TM, Barker EA, Vinson MA, et al. Metastatic cancer DNA phenotype identified in normal tissues surrounding metastasizing prostate carcinomas. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(31):11428-31.
161. Malins DC, Polissar NL, Schaefer S, Su Y, Vinson M. A unified theory of carcinogenesis based on order-disorder transitions in DNA structure as studied in the human ovary and breast. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95(13):7637-42.
162. Mordechai S, Mark S, Podshyvalov A, Kantarovich K, Bernshtain Y, Salman A, et al., editors. Comparative studies on cervical and colonic malignancies using FTIR microspectroscopy. *Smart Nondestructive Evaluation and Health Monitoring of Structural and Biological Systems II;* 2003: International Society for Optics and Photonics.
163. Sahu RK, Argov S, Salman A, Huleihel M, Grossman N, Hammody Z, et al. Characteristic absorbance of nucleic acids in the Mid-IR region as possible common biomarkers for diagnosis of malignancy. *Technol Cancer Res Treat.* 2004;3(6):629-38.
164. Mordechai S, Sahu RK, Hammody Z, Mark S, Kantarovich K, Guterman H, et al. Possible common biomarkers from FTIR microspectroscopy of cervical cancer and melanoma. *J Microsc.* 2004;215(Pt 1):86-91.

165. Li QB, Xu Z, Zhang NW, Zhang L, Wang F, Yang LM, et al. In vivo and in situ detection of colorectal cancer using Fourier transform infrared spectroscopy. *World J Gastroenterol.* 2005;11(3):327-30.
166. Fujioka N, Morimoto Y, Arai T, Kikuchi M. Discrimination between normal and malignant human gastric tissues by Fourier transform infrared spectroscopy. *Cancer Detect Prev.* 2004;28(1):32-6.
167. Wang JS, Shi JS, Xu YZ, Duan XY, Zhang L, Wang J, et al. FT-IR spectroscopic analysis of normal and cancerous tissues of esophagus. *World J Gastroenterol.* 2003;9(9):1897-9.
168. Fukuyama Y, Yoshida S, Yanagisawa S, Shimizu M. A study on the differences between oral squamous cell carcinomas and normal oral mucosae measured by Fourier transform infrared spectroscopy. *Biospectroscopy.* 1999;5(2):117-26.
169. Rigas B, LaGuardia K, Qiao L, Bhandare PS, Caputo T, Cohenford MA. Infrared spectroscopic study of cervical smears in patients with HIV: implications for cervical carcinogenesis. *J Lab Clin Med.* 2000;135(1):26-31.
170. Mark S, Sahu RK, Kantarovich K, Podshyvalov A, Guterman H, Goldstein J, et al. Fourier transform infrared microspectroscopy as a quantitative diagnostic tool for assignment of premalignancy grading in cervical neoplasia. *J Biomed Opt.* 2004;9(3):558-67.
171. Hammody Z, Sahu RK, Mordechai S, Cagnano E, Argov S. Characterization of malignant melanoma using vibrational spectroscopy. *ScientificWorldJournal.* 2005;5:173-82.
172. Li QB, Sun XJ, Xu YZ, Yang LM, Zhang YF, Weng SF, et al. Diagnosis of gastric inflammation and malignancy in endoscopic biopsies based on Fourier transform infrared spectroscopy. *Clin Chem.* 2005;51(2):346-50.
173. Holman HY, Martin MC, Blakely EA, Bjornstad K, McKinney WR. IR spectroscopic characteristics of cell cycle and cell death probed by synchrotron radiation based Fourier transform IR spectromicroscopy. *Biopolymers.* 2000;57(6):329-35.
174. Salman A, Ramesh J, Erukhimovitch V, Talyshinsky M, Mordechai S, Huleihel M. FTIR microspectroscopy of malignant fibroblasts transformed by mouse sarcoma virus. *J Biochem Biophys Methods.* 2003;55(2):141-53.
175. Ramesh J, Salman A, Hammody Z, Cohen B, Gopas J, Grossman N, et al. Application of FTIR microscopy for the characterization of malignancy: H-ras transfected murine fibroblasts as an example. *J Biochem Biophys Methods.* 2001;50(1):33-42.
176. Wu JG, Xu YZ, Sun CW, Soloway RD, Xu DF, Wu QG, et al. Distinguishing malignant from normal oral tissues using FTIR fiber-optic techniques. *Biopolymers.* 2001;62(4):185-92.
177. Zhang K, Fu J, Hua L, Zhang P, Shao Y, Xu S, et al. Multiple Morphological Constraints-Based Complex Gland Segmentation in Colorectal Cancer Pathology Image Analysis. *Complexity.* 2020;2020:6180457.
178. Sirinukunwattana K, Ahmed Raza SE, Yee-Wah T, Snead DR, Cree IA, Rajpoot NM. Locality Sensitive Deep Learning for Detection and Classification of Nuclei in Routine Colon Cancer Histology Images. *IEEE Trans Med Imaging.* 2016;35(5):1196-206.
179. Osorio HL, Finol HJ, Gonzalez LR, Sardiñas CE. Ultrastructure of colorectal adenocarcinoma and peritumoral tissue in untreated patients. *Ultrastruct Pathol.* 2018;42(2):81-90.
180. Haralick RM, Shanmugam K, Dinstein I. Textural Features for Image Classification. *IEEE Transactions on Systems, Man, and Cybernetics.* 1973;SMC-3(6):610-21.
181. Dinčić M, Todorović J, Nešović Ostojić J, Kovačević S, Dunderović D, Lopičić S, et al. The Fractal and GLCM Textural Parameters of Chromatin May Be Potential Biomarkers of Papillary Thyroid Carcinoma in Hashimoto's Thyroiditis Specimens. *Microsc Microanal.* 2020;26(4):717-30.
182. Kather JN, Weis CA, Bianconi F, Melchers SM, Schad LR, Gaiser T, et al. Multi-class texture analysis in colorectal cancer histology. *Sci Rep.* 2016;6:27988.
183. Wright AI, Magee D, Quirke P, Treanor D. Incorporating local and global context for better automated analysis of colorectal cancer on digital pathology slides. *Procedia Computer Science.* 2016;90:125-31.

184. Cherkezyan L, Stypula-Cyrus Y, Subramanian H, White C, Dela Cruz M, Wali RK, et al. Nanoscale changes in chromatin organization represent the initial steps of tumorigenesis: a transmission electron microscopy study. *BMC Cancer*. 2014;14:189.
185. Metze K, Adam R, Florindo JB. The fractal dimension of chromatin - a potential molecular marker for carcinogenesis, tumor progression and prognosis. *Expert Rev Mol Diagn*. 2019;19(4):299-312.
186. Nielsen F, Mikkelsen BB, Nielsen JB, Andersen HR, Grandjean P. Plasma malondialdehyde as biomarker for oxidative stress: reference interval and effects of life-style factors. *Clin Chem*. 1997;43(7):1209-14.
187. Góth L. A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range. *Clin Chim Acta*. 1991;196(2-3):143-51.
188. Giustarini D, Rossi R, Milzani A, Dalle-Donne I. Nitrite and nitrate measurement by Griess reagent in human plasma: evaluation of interferences and standardization. *Methods Enzymol*. 2008;440:361-80.
189. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951;193(1):265-75.
190. Berstad P, Thiis-Evensen E, Vatn MH, Almendingen K. Fatty acids in habitual diet, plasma phospholipids, and tumour and normal colonic biopsies in young colorectal cancer patients. *J Oncol*. 2012;2012:254801.
191. Cawthon RM. Telomere measurement by quantitative PCR. *Nucleic Acids Res*. 2002;30(10):e47.
192. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*. 1988;16(3):1215.
193. Wada O. What are trace elements? 2004.
194. Prashanth L, Kattapagari KK, Chitturi RT, Baddam VRR, Prasad LK. A review on role of essential trace elements in health and disease. *Journal of dr ntr university of health sciences*. 2015;4(2):75.
195. Fukuda H, Ebara M, Yamada H, Arimoto M, Okabe S, Obu M, et al. Trace elements and cancer. *JMAJ*. 2004;47(8):391-5.
196. Majewska U, Banaś D, Braziewicz J, Gózdź S, Kubala-Kukuś A, Kucharzewski M. Trace element concentration distributions in breast, lung and colon tissues. *Phys Med Biol*. 2007;52(13):3895-911.
197. Lin JH, Giovannucci E. Environmental exposure and tumor heterogeneity in colorectal cancer risk and outcomes. *Current Colorectal Cancer Reports*. 2014;10(1):94-104.
198. Mulware SJ. Trace elements and carcinogenicity: a subject in review. *3 Biotech*. 2013;3(2):85-96.
199. Vasseur P, Lasne C. OECD Detailed Review Paper (DRP) number 31 on "Cell Transformation Assays for Detection of Chemical Carcinogens": main results and conclusions. *Mutat Res*. 2012;744(1):8-11.
200. Rundhaug JE, Fischer SM. Molecular mechanisms of mouse skin tumor promotion. *Cancers (Basel)*. 2010;2(2):436-82.
201. Newbold RR. Developmental exposure to endocrine-disrupting chemicals programs for reproductive tract alterations and obesity later in life. *Am J Clin Nutr*. 2011;94(6 Suppl):1939s-42s.
202. Fujiki H, Watanabe T, Suganuma M. Cell-surface nucleolin acts as a central mediator for carcinogenic, anti-carcinogenic, and disease-related ligands. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2014;140(5):689-99.
203. Miyauchi-Hashimoto H, Kuwamoto K, Urade Y, Tanaka K, Horio T. Carcinogen-induced inflammation and immunosuppression are enhanced in xeroderma pigmentosum group A model mice associated with hyperproduction of prostaglandin E2. *J Immunol*. 2001;166(9):5782-91.
204. Tatemichi M, Hata H, Nakadate T. Induction of activation-induced cytidine deaminase by a not-directly mutagenic carcinogen: a novel potential molecular mechanism. *Environ Health Prev Med*. 2014;19(3):238-44.

205. Nawi AM, Chin SF, Azhar Shah S, Jamal R. Tissue and Serum Trace Elements Concentration among Colorectal Patients: A Systematic Review of Case-Control Studies. *Iran J Public Health*. 2019;48(4):632-43.
206. Prasad AS. Zinc is an Antioxidant and Anti-Inflammatory Agent: Its Role in Human Health. *Front Nutr*. 2014;1:14.
207. Hoffmann PR, Berry MJ. The influence of selenium on immune responses. *Mol Nutr Food Res*. 2008;52(11):1273-80.
208. Kehl-Fie TE, Skaar EP. Nutritional immunity beyond iron: a role for manganese and zinc. *Curr Opin Chem Biol*. 2010;14(2):218-24.
209. Juloski JT, Rakic A, Čuk VV, Čuk VM, Stefanović S, Nikolić D, et al. Colorectal cancer and trace elements alteration. *J Trace Elem Med Biol*. 2020;59:126451.
210. Kipp AP. Selenium in colorectal and differentiated thyroid cancer. *Hormones*. 2020;19(1):41-6.
211. Prasad AS. Impact of the discovery of human zinc deficiency on health. *J Trace Elem Med Biol*. 2014;28(4):357-63.
212. Lavilla I, Costas M, Miguel PS, Millos J, Bendicho C. Elemental fingerprinting of tumorous and adjacent non-tumorous tissues from patients with colorectal cancer using ICP-MS, ICP-OES and chemometric analysis. *Biometals*. 2009;22(6):863-75.
213. Gopčević KR, Rovčanin BR, Tatić SB, Krivokapić ZV, Gajić MM, Dragutinović VV. Activity of superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase, and glutathione reductase in different stages of colorectal carcinoma. *Dig Dis Sci*. 2013;58(9):2646-52.
214. Nanda R, Agrawal V. Elucidation of zinc and copper induced oxidative stress, DNA damage and activation of defence system during seed germination in *Cassia angustifolia* Vahl. *Environmental and Experimental Botany*. 2016;125:31-41.
215. Kohzadi S, Sheikhesmaili F, Rahehagh R, Parhizkar B, Ghaderi E, Loqmani H, et al. Evaluation of trace element concentration in cancerous and non-cancerous tissues of human stomach. *Chemosphere*. 2017;184:747-52.
216. Jaiswal AS, Narayan S. Zinc stabilizes adenomatous polyposis coli (APC) protein levels and induces cell cycle arrest in colon cancer cells. *J Cell Biochem*. 2004;93(2):345-57.
217. Rinaldi L, Barabino G, Klein J-P, Bitounis D, Pourchez J, Forest V, et al. Metals distribution in colorectal biopsies: New insight on the elemental fingerprint of tumour tissue. *Dig Liver Dis*. 2015;47(7):602-7.
218. Sohrabi M, Gholami A, Azar MH, Yaghoobi M, Shahi MM, Shirmardi S, et al. Trace Element and Heavy Metal Levels in Colorectal Cancer: Comparison Between Cancerous and Non-cancerous Tissues. *Biol Trace Elem Res*. 2018;183(1):1-8.
219. Gurusamy K, Davidson BR. Trace element concentration in metastatic liver disease – A systematic review. *J Trace Elem in Med Biol*. 2007;21(3):169-77.
220. Gurusamy KS, Farquharson MJ, Craig C, Davidson BR. An evaluation study of trace element content in colorectal liver metastases and surrounding normal livers by X-ray fluorescence. *BioMetals*. 2008;21(3):373-8.
221. Folkman J. Tumor Angiogenesis. In: Klein G, Weinhouse S, editors. *Advances in Cancer Research*. 43: Academic Press; 1985.
222. Nasulewicz A, Mazur A, Opolski A. Role of copper in tumour angiogenesis—clinical implications. *J Trace Elem Med Biol*. 2004;18(1):1-8.
223. Brem S. Angiogenesis and Cancer Control: From Concept to Therapeutic Trial. *Cancer Control*. 1999;6(5):1-18.
224. Dragutinović VV, Tatić SB, Nikolić-Mandić SD, Tripković TM, Dunderović DM, Paunović IR. Copper as Ancillary Diagnostic Tool in Preoperative Evaluation of Possible Papillary Thyroid Carcinoma in Patients with Benign Thyroid Disease. *Biol Trace Elem Res*. 2014;160(3):311-5.
225. Hu G-f. Copper stimulates proliferation of human endothelial cells under culture. *J Cell Biochem*. 1998;69(3):326-35.

226. Lowndes SA, Harris AL. Copper chelation as an antiangiogenic therapy. *Oncol Res.* 2004;14(11-12):529-39.
227. Gupta SK, Singh SP, Shukla VK. Copper, zinc, and Cu/Zn ratio in carcinoma of the gallbladder. *J Surg Oncol.* 2005;91(3):204-8.
228. Khoshdel Z, Naghibalhossaini F, Abdollahi K, Shojaei S, Moradi M, Malekzadeh M. Serum Copper and Zinc Levels Among Iranian Colorectal Cancer Patients. *Biol Trace Elem Res.* 2016;170(2):294-9.
229. Ribeiro SM, Moya AM, Braga CB, Domenici FA, Feitosa MR, Feres O, et al. Copper-Zinc ratio and nutritional status in colorectal cancer patients during the perioperative period. *Acta Cir Bras.* 2016;31 Suppl 1:24-8.
230. Spallholz JE. On the nature of selenium toxicity and carcinostatic activity. *Free Radic Biol Med.* 1994;17(1):45-64.
231. Mangiapane E, Pessione A, Pessione E. Selenium and selenoproteins: an overview on different biological systems. *Curr Protein Pept Sci.* 2014;15(6):598-607.
232. Short SP, Pilat JM, Williams CS. Roles for selenium and selenoprotein P in the development, progression, and prevention of intestinal disease. *Free Radic Biol Med.* 2018;127:26-35.
233. Florian S, Krehl S, Loewinger M, Kipp A, Banning A, Esworthy S, et al. Loss of GPx2 increases apoptosis, mitosis, and GPx1 expression in the intestine of mice. *Free Radic Biol Med.* 2010;49(11):1694-702.
234. Hornsveld M, Dansen TB. The Hallmarks of Cancer from a Redox Perspective. *Antioxid Redox Signal.* 2016;25(6):300-25.
235. Kipp AP. Selenium-Dependent Glutathione Peroxidases During Tumor Development. *Adv Cancer Res.* 2017;136:109-38.
236. Hughes DJ, Kunická T, Schomburg L, Liška V, Swan N, Souček P. Expression of Selenoprotein Genes and Association with Selenium Status in Colorectal Adenoma and Colorectal Cancer. *Nutrients.* 2018;10(11).
237. Kipp AP, Müller MF, Göken EM, Deubel S, Brigelius-Flohé R. The selenoproteins GPx2, TrxR2 and TrxR3 are regulated by Wnt signalling in the intestinal epithelium. *Biochim Biophys Acta.* 2012;1820(10):1588-96.
238. Wurzelmann JI, Silver A, Schreinemachers DM, Sandler RS, Everson RB. Iron intake and the risk of colorectal cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1996;5(7):503-7.
239. Drake EN, 2nd, Sky-Peck HH. Discriminant analysis of trace element distribution in normal and malignant human tissues. *Cancer Res.* 1989;49(15):4210-5.
240. Malafa M, Margenthaler J, Webb B, Neitzel L, Christophersen M. MnSOD Expression Is Increased in Metastatic Gastric Cancer. *J Surg Res.* 2000;88(2):130-4.
241. Liu Y, Borchert GL, Donald SP, Surazynski A, Hu C-A, Weydert CJ, et al. MnSOD inhibits proline oxidase-induced apoptosis in colorectal cancer cells. *Carcinogenesis.* 2005;26(8):1335-42.
242. Nelson RL, Yoo SJ, Tanure JC, Andrianopoulos G, Misumi A. The effect of iron on experimental colorectal carcinogenesis. *Anticancer Res.* 1989;9(6):1477-82.
243. Seril DN, Liao J, Ho K-LK, Warsi A, Yang CS, Yang G-Y. Dietary Iron Supplementation Enhances DSS-Induced Colitis and Associated Colorectal Carcinoma Development in Mice. *Dig Dis Sci.* 2002;47(6):1266-78.
244. Lakatos B, Balla J, Vinkler P, Szentmihályi K. [The role of macro-elements in the human body]. *Orv Hetil.* 2006;147(20):925-30.
245. Glushchenko TS, Izvarina NL. Na⁺,K⁽⁺⁾-ATPase activity in neurons and glial cells of the olfactory cortex of the rat brain during the development of long-term potentiation. *Neurosci Behav Physiol.* 1997;27(1):49-52.
246. Dijkstra K, Hofmeijer J, van Gils SA, van Putten MJ. A Biophysical Model for Cytotoxic Cell Swelling. *J Neurosci.* 2016;36(47):11881-90.
247. Hanahan D, Weinberg Robert A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell.* 2011;144(5):646-74.

248. Anderson KJ, Cormier RT, Scott PM. Role of ion channels in gastrointestinal cancer. *World J Gastroenterol*. 2019;25(38):5732-72.
249. Sui Q, Peng J, Han K, Lin J, Zhang R, Ou Q, et al. Voltage-gated sodium channel Na(v)1.5 promotes tumor progression and enhances chemosensitivity to 5-fluorouracil in colorectal cancer. *Cancer Lett*. 2021;500:119-31.
250. I GC, Apostolidis NS, Romanos AN, Paradellis TP. A comparative study of trace elements in normal and cancerous colorectal tissues. *Cancer*. 1983;52(3):508-19.
251. Cui R, Shi XY. Expression of pyruvate kinase M2 in human colorectal cancer and its prognostic value. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015;8(9):11393-9.
252. Sara C, Jeanette AMM. Magnesium and cancer: a dangerous liason. *Magnesium Research*. 2011;24(3):92-100.
253. Lapidos KA, Woodhouse EC, Kohn EC, Masiero L. Mg⁺⁺-induced endothelial cell migration: Substratum selectivity and receptor-involvement. *Angiogenesis*. 2001;4(1):21-8.
254. Bishak YK, Payahoo L, Osatdrahimi A, Nourazarian A. Mechanisms of cadmium carcinogenicity in the gastrointestinal tract. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2015;16(1):9-21.
255. Khan F, Momtaz S, Abdollahi M. The relationship between mercury exposure and epigenetic alterations regarding human health, risk assessment and diagnostic strategies. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. 2019;52:37-47.
256. Singh J, Carlisle DL, Pritchard DE, Patierno SR. Chromium-induced genotoxicity and apoptosis: relationship to chromium carcinogenesis (review). *Oncol Rep*. 1998;5(6):1307-18.
257. Ding M, Shi X. Molecular mechanisms of Cr(VI)-induced carcinogenesis. In: Vallyathan V, Shi X, Castranova V, editors. *Oxygen/Nitrogen Radicals: Cell Injury and Disease*. Boston, MA: Springer US; 2002.
258. Catelas I, Petit A, Zukor DJ, Antoniou J, Huk OL. TNF-alpha secretion and macrophage mortality induced by cobalt and chromium ions in vitro-qualitative analysis of apoptosis. *Biomaterials*. 2003;24(3):383-91.
259. Saghiri MA, Asatourian A, Orangi J, Sorenson CM, Sheibani N. Functional role of inorganic trace elements in angiogenesis—Part I: N, Fe, Se, P, Au, and Ca. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. 2015;96(1):129-42.
260. Lin X, Peng L, Xu X, Chen Y, Zhang Y, Huo X. Connecting gastrointestinal cancer risk to cadmium and lead exposure in the Chaoshan population of Southeast China. *Environ Sci Pollut Res Int*. 2018;25(18):17611-9.
261. Ynalvez R, Gutierrez J, Gonzalez-Cantu H. Mini-review: toxicity of mercury as a consequence of enzyme alteration. *BioMetals*. 2016;29(5):781-8.
262. Boffetta P. Carcinogenicity of trace elements with reference to evaluations made by the International Agency for Research on Cancer. *Scand J Work Environ Health*. 1993;19 Suppl 1:67-70.
263. Martin Mateo MC, Rabadan J, Boustamante J. Comparative analysis of certain metals and tumor markers in bronchopulmonary cancer and colorectal cancers. *Metals and tumor markers in the neoplastic process*. *Clin Physiol Biochem*. 1990;8(5):261-6.
264. Ionescu JG, Novotny J, Stejskal V, Lätsch A, Blaurock-Busch E, Eisenmann-Klein M. Increased levels of transition metals in breast cancer tissue. *Neuro Endocrinol Lett*. 2006;27 Suppl 1:36-9.
265. Mai F-D, Chen B-J, Wu L-C, Li F-Y, Chen W-K. Imaging of single liver tumor cells intoxicated by heavy metals using ToF-SIMS. *Applied Surface Science*. 2006;252(19):6809-12.
266. Alimonti A, Bocca B, Lamazza A, Forte G, Rahimi S, Mattei D, et al. A Study on Metals Content in Patients with Colorectal Polyps. *J Toxicol Environ Health A*. 2008;71(5):342-7.
267. Grady WM, Markowitz SD. The Molecular Pathogenesis of Colorectal Cancer and Its Potential Application to Colorectal Cancer Screening. *Dig Dis Sci*. 2015;60(3):762-72.
268. Kawamoto R, Ninomiya D, Kasai Y, Senzaki K, Kusunoki T, Ohtsuka N, et al. Interaction between gender and uric acid on hemoglobin A1c in community-dwelling persons. *J Endocrinol Invest*. 2018;41(4):421-9.

269. Park CE, Sung HH, Jung EY, Moon AE, Kim HS, Yoon H. Gender difference in the relationship between uric acid and pulse pressure among Korean adults. *Clin Exp Hypertens*. 2019;41(6):499-504.
270. Liu Q, Liu D, Yan D, Huang W, Ji X, Hui J, et al. Gender-Specific Association Between Serum Uric Acid and Incident High Intraocular Pressure in Chinese Population: A Cross-Sectional Study. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2020;61(11):10.
271. Yan S, Zhang P, Xu W, Liu Y, Wang B, Jiang T, et al. Serum Uric Acid Increases Risk of Cancer Incidence and Mortality: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Mediators Inflamm*. 2015;2015:764250.
272. Yiu A, Van Hemelrijck M, Garmo H, Holmberg L, Malmström H, Lambe M, et al. Circulating uric acid levels and subsequent development of cancer in 493,281 individuals: findings from the AMORIS Study. *Oncotarget*. 2017;8(26):42332-42.
273. Dziaman T, Banaszkiwicz Z, Roszkowski K, Gackowski D, Wisniewska E, Rozalski R, et al. 8-Oxo-7,8-dihydroguanine and uric acid as efficient predictors of survival in colon cancer patients. *Int J Cancer*. 2014;134(2):376-83.
274. Mao L, Guo C, Zheng S. Elevated urinary 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine and serum uric acid are associated with progression and are prognostic factors of colorectal cancer. *Onco Targets Ther*. 2018;11:5895-902.
275. Yu J, Liu H, He S, Li P, Ma C, Ping F, et al. Negative Association of Serum URIC Acid with Peripheral Blood Cellular Aging Markers. *J Nutr Health Aging*. 2019;23(6):547-51.
276. de Vos-Houben JM, Ottenheim NR, Kafatos A, Buijsse B, Hageman GJ, Kromhout D, et al. Telomere length, oxidative stress, and antioxidant status in elderly men in Zutphen and Crete. *Mech Ageing Dev*. 2012;133(6):373-7.
277. Glantzounis GK, Tsimoyiannis EC, Kappas AM, Galaris DA. Uric acid and oxidative stress. *Curr Pharm Des*. 2005;11(32):4145-51.
278. Zińczuk J, Maciejczyk M, Zaręba K, Romaniuk W, Markowski A, Kędra B, et al. Antioxidant Barrier, Redox Status, and Oxidative Damage to Biomolecules in Patients with Colorectal Cancer. Can Malondialdehyde and Catalase Be Markers of Colorectal Cancer Advancement? *Biomolecules*. 2019;9(10):637.
279. Peixoto MR, Monego ET, Jardim PC, Carvalho MM, Sousa AL, Oliveira JS, et al. Diet and medication in the treatment of hyperuricemia in hypertensive patients. *Arq Bras Cardiol*. 2001;76(6):463-72.
280. Ames BN, Cathcart R, Schwiers E, Hochstein P. Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant- and radical-caused aging and cancer: a hypothesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1981;78(11):6858-62.
281. Watanabe S, Kang DH, Feng L, Nakagawa T, Kanellis J, Lan H, et al. Uric acid, hominoid evolution, and the pathogenesis of salt-sensitivity. *Hypertension*. 2002;40(3):355-60.
282. Halliwell BGJ. Antioxidant protection by lowmolecular-mass agents: compounds synthesized in vivo. . In: Halliwell B GJ, editors. , editor. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford: Oxford University Press; 1999.
283. Davies KJ, Sevanian A, Muakkassah-Kelly SF, Hochstein P. Uric acid-iron ion complexes. A new aspect of the antioxidant functions of uric acid. *Biochem J*. 1986;235(3):747-54.
284. Einsele H, Clemens MR, Wegner U, Waller HD. Effect of free radical scavengers and metal ion chelators on hydrogen peroxide and phenylhydrazine induced red blood cell lipid peroxidation. *Free Radic Res Commun*. 1987;3(1-5):257-63.
285. Miura T, Muraoka S, Ogiso T. Inhibitory effect of urate on oxidative damage induced by adriamycin-Fe³⁺ in the presence of H₂O₂. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol*. 1993;79(1):75-85.
286. Whiteman M, Ketsawatsakul U, Halliwell B. A reassessment of the peroxy-nitrite scavenging activity of uric acid. *Ann N Y Acad Sci*. 2002;962:242-59.

287. Salzman R, Pácal L, Tomandl J, Kanková K, Tóthová E, Gál B, et al. Elevated malondialdehyde correlates with the extent of primary tumor and predicts poor prognosis of oropharyngeal cancer. *Anticancer Res.* 2009;29(10):4227-31.
288. Całyniuk B, Grochowska-Niedworok E, Walkiewicz KW, Kawecka S, Popiołek E, Fatyga E, editors. *Malondialdehyde (MDA)–product of lipid peroxidation as marker of homeostasis disorders and aging.* *Annales Academiae Medicae Silesiensis*; 2016.
289. Obtulowicz T, Winczura A, Speina E, Swoboda M, Janik J, Janowska B, et al. Aberrant repair of etheno-DNA adducts in leukocytes and colon tissue of colon cancer patients. *Free Radic Biol Med.* 2010;49(6):1064-71.
290. Ayala A, Muñoz MF, Argüelles S. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxid Med Cell Longev.* 2014;2014:360438.
291. Zińczuk J, Maciejczyk M, Zaręba K, Pryczynicz A, Dymicka-Piekarska V, Kamińska J, et al. Pro-Oxidant Enzymes, Redox Balance and Oxidative Damage to Proteins, Lipids and DNA in Colorectal Cancer Tissue. Is Oxidative Stress Dependent on Tumour Budding and Inflammatory Infiltration? *Cancers (Basel).* 2020;12(6).
292. Skrzydlewska E, Sulkowski S, Koda M, Zalewski B, Kanczuga-Koda L, Sulkowska M. Lipid peroxidation and antioxidant status in colorectal cancer. *World J Gastroenterol.* 2005;11(3):403-6.
293. Leung EY, Crozier JE, Talwar D, O'Reilly DS, McKee RF, Horgan PG, et al. Vitamin antioxidants, lipid peroxidation, tumour stage, the systemic inflammatory response and survival in patients with colorectal cancer. *Int J Cancer.* 2008;123(10):2460-4.
294. Surinenaite B, Prasmickiene G, Milasiene V, Stratilatovas E, Didziapetriene J. The influence of surgical treatment and red blood cell transfusion on changes in antioxidative and immune system parameters in colorectal cancer patients. *Medicina (Kaunas).* 2009;45(10):785-91.
295. Rašić I, Rašić A, Akšamija G, Radović S. The relationship between serum level of malondialdehyde and progression of colorectal cancer. *Acta Clin Croat.* 2018;57(3):411-6.
296. Kotake K, Asano M, Ozawa H, Kobayashi H, Sugihara K. Tumour characteristics, treatment patterns and survival of patients aged 80 years or older with colorectal cancer. *Colorectal Dis.* 2015;17(3):205-15.
297. Wang SH, Wang YZ, Zhang KY, Shen JH, Zhou HQ, Qiu XY. Effect of superoxide dismutase and malondialdehyde metabolic changes on carcinogenesis of gastric carcinoma. *World J Gastroenterol.* 2005;11(28):4305-10.
298. Michiels C, Raes M, Toussaint O, Remacle J. Importance of Se-glutathione peroxidase, catalase, and Cu/Zn-SOD for cell survival against oxidative stress. *Free Radic Biol Med.* 1994;17(3):235-48.
299. Lushchak VI. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chemico-Biological Interactions.* 2014;224:164-75.
300. Kirkman HN, Gaetani GF. Mammalian catalase: a venerable enzyme with new mysteries. *Trends Biochem Sci.* 2007;32(1):44-50.
301. Miar A, Hevia D, Muñoz-Cimadevilla H, Astudillo A, Velasco J, Sainz RM, et al. Manganese superoxide dismutase (SOD2/MnSOD)/catalase and SOD2/GPx1 ratios as biomarkers for tumor progression and metastasis in prostate, colon, and lung cancer. *Free Radic Biol Med.* 2015;85:45-55.
302. Pietarinen-Runtti P, Lakari E, Raivio KO, Kinnula VL. Expression of antioxidant enzymes in human inflammatory cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2000;278(1):C118-25.
303. Choudhari SK, Chaudhary M, Bagde S, Gadbail AR, Joshi V. Nitric oxide and cancer: a review. *World J Surg Oncol.* 2013;11:118.
304. Wang H, Wang L, Xie Z, Zhou S, Li Y, Zhou Y, et al. Nitric Oxide (NO) and NO Synthases (NOS)-Based Targeted Therapy for Colon Cancer. *Cancers (Basel).* 2020;12(7).
305. Korde Choudhari S, Sridharan G, Gadbail A, Poornima V. Nitric oxide and oral cancer: a review. *Oral Oncol.* 2012;48(6):475-83.
306. Singh S, Gupta AK. Nitric oxide: role in tumour biology and iNOS/NO-based anticancer therapies. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2011;67(6):1211-24.

307. Barnes RP, Fouquerel E, Opresko PL. The impact of oxidative DNA damage and stress on telomere homeostasis. *Mech Ageing Dev.* 2019;177:37-45.
308. Ahmed W, Lingner J. Impact of oxidative stress on telomere biology. *Differentiation.* 2018;99:21-7.
309. Chandel NS, Tuveson DA. The promise and perils of antioxidants for cancer patients. *N Engl J Med.* 2014;371(2):177-8.
310. Trachootham D, Alexandre J, Huang P. Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach? *Nat Rev Drug Discov.* 2009;8(7):579-91.
311. Sabharwal SS, Schumacker PT. Mitochondrial ROS in cancer: initiators, amplifiers or an Achilles' heel? *Nat Rev Cancer.* 2014;14(11):709-21.
312. Juloski TJ, Popovic T, Martacic JD, V VC, M SMP, M SS, et al. Fatty acid in colorectal cancer in adult and aged patients of both sexes. *J buon.* 2021;26(5):1898-907.
313. Beloribi-Djefaffia S, Vasseur S, Guillaumond F. Lipid metabolic reprogramming in cancer cells. *Oncogenesis.* 2016;5(1):e189-e.
314. Stoiber K, Naglo O, Pernpeintner C, Zhang S, Koeberle A, Ulrich M, et al. Targeting de novo lipogenesis as a novel approach in anti-cancer therapy. *British Journal of Cancer.* 2018;118(1):43-51.
315. Rysman E, Brusselmans K, Scheys K, Timmermans L, Derua R, Munck S, et al. De novo Lipogenesis Protects Cancer Cells from Free Radicals and Chemotherapeutics by Promoting Membrane Lipid Saturation. *Cancer Res.* 2010;70(20):8117-26.
316. Zhang J, Zhang L, Ye X, Chen L, Zhang L, Gao Y, et al. Characteristics of fatty acid distribution is associated with colorectal cancer prognosis. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids.* 2013;88(5):355-60.
317. Neoptolemos JP, Husband D, Imray C, Rowley S, Lawson N. Arachidonic acid and docosahexaenoic acid are increased in human colorectal cancer. *Gut.* 1991;32(3):278-81.
318. Neoptolemos JP, Clayton H, Heagerty AM, Nicholson MJ, Johnson B, Mason J, et al. Dietary fat in relation to fatty acid composition of red cells and adipose tissue in colorectal cancer. *Br J Cancer.* 1988;58(5):575-9.
319. Hietanen E, Bartsch H, Bereziat JC, Camus AM, McClinton S, Eremin O, et al. Diet and oxidative stress in breast, colon and prostate cancer patients: a case-control study. *Eur J Clin Nutr.* 1994;48(8):575-86.
320. Slattery ML, Potter JD, Duncan DM, Berry TD. Dietary fats and colon cancer: assessment of risk associated with specific fatty acids. *Int J Cancer.* 1997;73(5):670-7.
321. Baro L, Hermoso JC, Nunez MC, Jimenez-Rios JA, Gil A. Abnormalities in plasma and red blood cell fatty acid profiles of patients with colorectal cancer. *Br J Cancer.* 1998;77(11):1978-83.
322. Hendrickse CW, Kelly RW, Radley S, Donovan IA, Keighley MR, Neoptolemos JP. Lipid peroxidation and prostaglandins in colorectal cancer. *Br J Surg.* 1994;81(8):1219-23.
323. Kondo Y, Nishiumi S, Shinohara M, Hatano N, Ikeda A, Yoshie T, et al. Serum fatty acid profiling of colorectal cancer by gas chromatography/mass spectrometry. *Biomark Med.* 2011;5(4):451-60.
324. Butler LM, Yuan J-M, Huang JY, Su J, Wang R, Koh W-P, et al. Plasma fatty acids and risk of colon and rectal cancers in the Singapore Chinese Health Study. *NPJ Precis Oncol.* 2017;1(1):38.
325. Rocha DM, Bressan J, Hermsdorff HH. The role of dietary fatty acid intake in inflammatory gene expression: a critical review. *Sao Paulo Med J.* 2017;135(2):157-68.
326. Mika A, Kobiela J, Czumaj A, Chmielewski M, Stepnowski P, Sledzinski T. Hyper-Elongation in Colorectal Cancer Tissue - Cerotic Acid is a Potential Novel Serum Metabolic Marker of Colorectal Malignancies. *Cell Physiol Biochem.* 2017;41(2):722-30.
327. Cao H, Gerhold K, Mayers JR, Wiest MM, Watkins SM, Hotamisligil GS. Identification of a lipokine, a lipid hormone linking adipose tissue to systemic metabolism. *Cell.* 2008;134(6):933-44.
328. Kuda O, Stankova B, Tvrzicka E, Hensler M, Jelenik T, Rossmeisl M, et al. Prominent role of liver in elevated plasma palmitoleate levels in response to rosiglitazone in mice fed high-fat diet. *J Physiol Pharmacol.* 2009;60(4):135-40.

329. Nkondjock A, Shatenstein B, Maisonneuve P, Ghadirian P. Specific fatty acids and human colorectal cancer: an overview. *Cancer Detect Prev.* 2003;27(1):55-66.
330. Colomer R, Menendez JA. Mediterranean diet, olive oil and cancer. *Clin Transl Oncol.* 2006;8(1):15-21.
331. Llor X, Pons E, Roca A, Alvarez M, Mane J, Fernandez-Banares F, et al. The effects of fish oil, olive oil, oleic acid and linoleic acid on colorectal neoplastic processes. *Clin Nutr.* 2003;22(1):71-9.
332. Berger E, Nassra M, Atgie C, Plaisancie P, Geloen A. Oleic Acid Uptake Reveals the Rescued Enterocyte Phenotype of Colon Cancer Caco-2 by HT29-MTX Cells in Co-Culture Mode. *Int J Mol Sci.* 2017;18(7).
333. Koundouros N, Pouligiannis G. Reprogramming of fatty acid metabolism in cancer. *Br J Cancer.* 2020;122(1):4-22.
334. Azrad M, Turgeon C, Demark-Wahnefried W. Current evidence linking polyunsaturated Fatty acids with cancer risk and progression. *Front Oncol.* 2013;3:224.
335. Das UN, Madhavi N. Effect of polyunsaturated fatty acids on drug-sensitive and resistant tumor cells in vitro. *Lipids Health Dis.* 2011;10(1):159.
336. Mansara PP, Deshpande RA, Vaidya MM, Kaul-Ghanekar R. Differential Ratios of Omega Fatty Acids (AA/EPA+DHA) Modulate Growth, Lipid Peroxidation and Expression of Tumor Regulatory MARBPs in Breast Cancer Cell Lines MCF7 and MDA-MB-231. *PLoS One.* 2015;10(9):e0136542.
337. Nicholson ML, Neoptolemos JP, Clayton HA, Talbot IC, Bell PR. Increased cell membrane arachidonic acid in experimental colorectal tumours. *Gut.* 1991;32(4):413-8.
338. Marventano S, Kolacz P, Castellano S, Galvano F, Buscemi S, Mistretta A, et al. A review of recent evidence in human studies of n-3 and n-6 PUFA intake on cardiovascular disease, cancer, and depressive disorders: does the ratio really matter? *Int J Food Sci Nutr.* 2015;66(6):611-22.
339. Pakiet A, Kobiela J, Stepnowski P, Sledzinski T, Mika A. Changes in lipids composition and metabolism in colorectal cancer: a review. *Lipids Health Dis.* 2019;18(1):29.
340. Taha AY, Cheon Y, Faurot KF, Macintosh B, Majchrzak-Hong SF, Mann JD, et al. Dietary omega-6 fatty acid lowering increases bioavailability of omega-3 polyunsaturated fatty acids in human plasma lipid pools. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2014;90(5):151-7.
341. Horas HNS, Nishiumi S, Kawano Y, Kobayashi T, Yoshida M, Azuma T. Adrenic acid as an inflammation enhancer in non-alcoholic fatty liver disease. *Arch Biochem Biophys.* 2017;623-624:64-75.
342. Carey AM, Pramanik R, Nicholson LJ, Dew TK, Martin FL, Muir GH, et al. Ras-MEK-ERK signaling cascade regulates androgen receptor element-inducible gene transcription and DNA synthesis in prostate cancer cells. *Int J Cancer.* 2007;121(3):520-7.
343. Serhan CN. Resolution phase of inflammation: novel endogenous anti-inflammatory and proresolving lipid mediators and pathways. *Annu Rev Immunol.* 2007;25:101-37.
344. Yang K, Li H, Dong J, Dong Y, Wang CZ. Expression profile of polyunsaturated fatty acids in colorectal cancer. *World J Gastroenterol.* 2015;21(8):2405-12.
345. Kurabe N, Hayasaka T, Ogawa M, Masaki N, Ide Y, Waki M, et al. Accumulated phosphatidylcholine (16:0/16:1) in human colorectal cancer; possible involvement of LPCAT4. *Cancer Sci.* 2013;104(10):1295-302.
346. Wang C, Li P, Xuan J, Zhu C, Liu J, Shan L, et al. Cholesterol Enhances Colorectal Cancer Progression via ROS Elevation and MAPK Signaling Pathway Activation. *Cell Physiol Biochem.* 2017;42(2):729-42.
347. Yang MH, Rampal S, Sung J, Choi YH, Son HJ, Lee JH, et al. The association of serum lipids with colorectal adenomas. *Am J Gastroenterol.* 2013;108(5):833-41.
348. Bompard J, Rosso A, Brizuela L, Mebarek S, Blum LJ, Trunfio-Sfarghiu AM, et al. Membrane Fluidity as a New Means to Selectively Target Cancer Cells with Fusogenic Lipid Carriers. *Langmuir.* 2020;36(19):5134-44.

349. Wood CB, Habib NA, Apostolov K, Thompson A, Barker W, Hershman M, et al. Reduction in the stearic to oleic acid ratio in human malignant liver neoplasms. *Eur J Surg Oncol*. 1985;11(4):347-8.
350. Habib NA, Wood CB, Apostolov K, Thompson A, Barker W, Mentha G, et al. Desaturation-producing factor present in the tissue, blood, and urine of cancer patients. *Cancer Detect Prev*. 1987;10(1-2):57-61.
351. Hac-Wydro K, Wydro P. The influence of fatty acids on model cholesterol/phospholipid membranes. *Chem Phys Lipids*. 2007;150(1):66-81.
352. Leekumjorn S, Cho HJ, Wu Y, Wright NT, Sum AK, Chan C. The role of fatty acid unsaturation in minimizing biophysical changes on the structure and local effects of bilayer membranes. *Biochimica et biophysica acta*. 2009;1788(7):1508-16.
353. Amézaga J, Arranz S, Urruticoechea A, Ugartemendia G, Larraioz A, Louka M, et al. Altered Red Blood Cell Membrane Fatty Acid Profile in Cancer Patients. *Nutrients*. 2018;10(12).
354. Aclimandos WA, Heinemann D, Kelly SB, Sheraidah GAK, Hungerford JL. Erythrocyte stearic to oleic acid ratio in patients with ocular melanoma. *Eye*. 1992;6(4):416-9.
355. Neoptolemos JP, Thomas BS. Erythrocyte membrane stearic acid: oleic acid ratios in colorectal cancer using tube capillary column gas liquid chromatography. *Ann Clin Biochem*. 1990;27 (Pt 1):38-43.
356. Baba Y, Yagi T, Kosumi K, Okadome K, Nomoto D, Eto K, et al. Morphological lymphocytic reaction, patient prognosis and PD-1 expression after surgical resection for oesophageal cancer. *Br J Surg*. 2019;106(10):1352-61.
357. Nishibeppu K, Komatsu S, Ichikawa D, Imamura T, Kosuga T, Okamoto K, et al. Venous invasion as a risk factor for recurrence after gastrectomy followed by chemotherapy for stage III gastric cancer. *BMC Cancer*. 2018;18(1):108.
358. Katayama S, Shiota G, Oshimura M, Kawasaki H. Clinical usefulness of telomerase activity and telomere length in the preoperative diagnosis of gastric and colorectal cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*. 1999;125(7):405-10.
359. O'Sullivan J, Risques RA, Mandelson MT, Chen L, Brentnall TA, Bronner MP, et al. Telomere length in the colon declines with age: a relation to colorectal cancer? *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2006;15(3):573-7.
360. Valls-Bautista C, Piñol-Felis C, Reñé-Espinet JM, Buenestado-García J, Viñas-Salas J. In colon cancer, normal colon tissue and blood cells have altered telomere lengths. *J Surg Oncol*. 2015;111(7):899-904.
361. Svenson U, Roos G. Telomere length as a biological marker in malignancy. *Biochim Biophys Acta*. 2009;1792(4):317-23.
362. Cosme-Blanco W, Chang S. Dual roles of telomere dysfunction in initiation and suppression of tumorigenesis. *Exp Cell Res*. 2008;314(9):1973-9.
363. Shay JW. Determining if telomeres matter in colon cancer initiation or progression. *J Natl Cancer Inst*. 2013;105(16):1166-8.
364. Hung K, Hayashi R, Lafond-Walker A, Lowenstein C, Pardoll D, Levitsky H. The central role of CD4(+) T cells in the antitumor immune response. *J Exp Med*. 1998;188(12):2357-68.
365. Klintrup K, Mäkinen JM, Kauppila S, Väre PO, Melkko J, Tuominen H, et al. Inflammation and prognosis in colorectal cancer. *Eur J Cancer*. 2005;41(17):2645-54.
366. Roxburgh CS, Salmond JM, Horgan PG, Oien KA, McMillan DC. Comparison of the prognostic value of inflammation-based pathologic and biochemical criteria in patients undergoing potentially curative resection for colorectal cancer. *Ann Surg*. 2009;249(5):788-93.
367. Baxevanis CN, Papamichail M, Perez SA. Immune classification of colorectal cancer patients: impressive but how complete? *Expert Opin Biol Ther*. 2013;13(4):517-26.
368. Svenson U, Grönlund E, Söderström I, Sitaram RT, Ljungberg B, Roos G. Telomere length in relation to immunological parameters in patients with renal cell carcinoma. *PLoS One*. 2013;8(2):e55543.

369. Koelzer VH, Lugli A. The tumor border configuration of colorectal cancer as a histomorphological prognostic indicator. *Front Oncol*. 2014;4:29.
370. Suzuki T, Suwa K, Ogawa M, Eto K, Kawahara H, Fujita T, et al. Adjuvant chemotherapy for the perineural invasion of colorectal cancer. *J Surg Res*. 2015;199(1):84-9.
371. Xie W, Liu J, Huang X, Wu G, Jeen F, Chen S, et al. A nomogram to predict vascular invasion before resection of colorectal cancer. *Oncol Lett*. 2019;18(6):5785-92.
372. Koelzer VH, Zlobec I, Lugli A. Tumor budding in colorectal cancer--ready for diagnostic practice? *Hum Pathol*. 2016;47(1):4-19.
373. Liu F, Zhao J, Li C, Wu Y, Song W, Guo T, et al. The unique prognostic characteristics of tumor deposits in colorectal cancer patients. *Ann Transl Med*. 2019;7(23):769.
374. Engelhardt M, Drullinsky P, Guillem J, Moore MA. Telomerase and telomere length in the development and progression of premalignant lesions to colorectal cancer. *Clin Cancer Res*. 1997;3(11):1931-41.
375. Ghorri A, Usselman B, Ferryman S, Morris A, Fraser I. Telomerase expression of malignant epithelial cells correlates with Dukes' stage in colorectal cancer. *Colorectal Dis*. 2002;4(6):441-6.
376. Rigas B, Morgello S, Goldman IS, Wong PT. Human colorectal cancers display abnormal Fourier-transform infrared spectra. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990;87(20):8140-4.
377. Rehman IM, Z.; Rehman, S. *Vibrational Spectroscopy for Tissue Analysis*. first ed: CRC Press, A Taylor & Francis Book; 2013.
378. Li Q, Hao C, Kang X, Zhang J, Sun X, Wang W, et al. Colorectal Cancer and Colitis Diagnosis Using Fourier Transform Infrared Spectroscopy and an Improved K-Nearest-Neighbour Classifier. *Sensors (Basel)*. 2017;17(12).
379. Artyushenko V, Schulte F, Zabarylo U, Berlien H-P, Usenov I, Saeb Gilani T, et al. Spectral fiber sensors for cancer diagnostics in vitro: SPIE; 2015.

Lista skraćenica

5-FU- 5-fluoro uracil
AJCC- American Joint Committee on Cancer
ALDH- alkoholna dehidrogenaza
ALP- alkalna fosfataza
ALT- alanin aminotransferaza
APC- Adenomatous polyposis coli
aPTT R- activated partial thromboplastin time ratio - odnos aktiviranog parcijalnog tromboplastinskog vremena
aPTT- activated partial thromboplastin time - aktivirano parcijalno tromboplastinsko vreme
AST- aspartat aminotransferaza
BMI- body mass index
BRAF- B-Rapidly Accelerated Fibrosarcoma
CA 19-9- Carbohydrate antigen 19-9
CEA- carcinoma embrional antigen
CIMP- CpG island methylator phenotype
CIN- Chromosomal instability
CLR- Crohn like response (peritumorski limfocitni odgovor)
CRP- C reaktivni protein
DNK- Dezoksi-ribo-nukleinska kiselina
EGFR- epidermal growth factor receptor
Er- eritorciti
FAP- Familijarna adenomatozna polipoza
FIT- Fecal Immunochemical Test
FOBT- Fecal Occult Blood Test
FTIR- Fourier-ova infracrvena spektroskopija
GDP- guanozin difosfat
GGT- gama-glutamil transpeptidaza
GTP- guanozin trifosfat
HBG- humani beta globin
HBV- hepatitis B virus
Hct- hematocrit
HCV- hepatitis C virus
HDL-holesterol- High-density lipoprotein - lipoproteini velike gustine
Hgb-hemoglobin
HIV- human immunodeficiency virus
IBD- inflamatorne bolesti creva
IG- Immature Granulocytes
IG- Immature Granulocytes
IGF 1- insulin like growth factor 1
IHR- Indeks humanog razvoja
IL-6- interleukin 6
INR- international normalised ratio
IR- infracrvena
K-ras- Kirsten rat sarcoma
KBC- Kliničko bolnički centar
KRK- kolorektalni karcinom
LDH- laktat dehidrogenaza
LDL – holesterol- low-density lipoprotein - lipoproteini male gustine
Le- leukociti
LOH- loss of heterozygosity

MAC- Modified Astler-Coller
MCH- mean corpuscular hemoglobin - prosečna količina hemoglobina u eritrocitu
MCHC- mean corpuscular hemoglobin concentration - srednja koncentracija hemoglobina na decilitar eritrocita
MCV- Mean corpuscular volume - prosečna zapremina eritrocita
MDA- malondialdehid
MET- Metabolic Equivalent of Task
MGMT- O-6-Methylguanine-DNA Methyltransferase
MLH 1- MutL homolog 1
MMR- mismatch repair
MPV- mean platelet volume - prosečna zapremina trombocita
MSI- Microsatellite instability
MSP- mikrospektroskopija
MUFA-monounsaturated fatty acids
MYH- Mut Y homolog
NMR- nuclear magnetic resonance
NNPKK- nasledni nepolipozni karcinom kolona
NOS- NO sintaza
PBL- peripheral blood leucocytes
PCT- plateletcrit - procenat krvi koji zauzimaju trombociti
PDW- platelet distribution width - raspodela trombocita po zapremini
PMS 2- Postmeiotic segregation increased 2
PUFA-polyunsaturated fatty acids
RDW CV- red cell distribution width coefficient of variation - raspodela eritrocita po zapremini koeficijent varijacije
RDW SD- red cell distribution width standard deviation - raspodela eritrocita po zapremini standardna devijacija
RT PCR- real-time polymerase chain reaction
RTL- relative telomere length
SAD- Sjedinjene Američke Države
SAT- subcutaneous adipose tissue
SFA- saturated fatty acids
SZO- Svetska zdravstvena organizacija
TBA- tiobarbiturnom kiselinom
TCA- trihlorsirćetna kiselina
TIBC- total iron-binding capacity - ukupni kapacitet vezivanja gvožđa
TIL- intratumorski limfocitni odgovor
TNF- tumor necrosis factor
TNM- tumor, nodusi, metastaze
Tr- trombociti
UIBC- unsaturated iron-binding capacity - nezasićeni kapacitet vezivanja gvožđa
UICC- Union for International Cancer Control
VAT- Visceral adipose tissue
WC- waist circumference

Biografija autora

Dr Jovan Juloski je rođen 02. septembra 1987. godine u Beogradu, gde je završio osnovnu školu „Pavle Savić“ i Prvu beogradsku gimnaziju. Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu je upisao 2006. godine, a diplomirao 04. juna 2012. godine sa prosečnom ocenom 9,59 i odbranjenim diplomskim radom pod nazivom „Troponin u univerzalnoj definiciji srčanog udara“, pod mentorstvom doc. dr Nebojše Despotovića. Specijalističke akademske studije je upisao 2012. godine, diplomirao jula 2014. godine sa prosečnom ocenom 9,55. Drugog jula 2014. godine je odbranio završni specijalistički akademski rad pod nazivom „Prednosti i mane korišćenja različitih materijala u endoskopskom lečenju veziko-ureteralnog refluksa“ pod mentorstvom doc. Dr Vojkana Vukadinovića i stekao akademski naziv Specijalista doktor medicine. Od februara 2013. godine je zaposlen je na Klinici za hirurgiju „Nikola Spasić“, Kliničko-bolničkog centra Zvezdara u Beogradu. U periodu od decembra 2014. do januara 2020. godine pohađao je specijalizaciju iz Opšte hirurgije. Specijalistički ispit položio je 16. januara 2020. godine sa ocenom odličan pred komisijom u sastavu: prof. dr Dušan Kostić, prof. dr Velimir Marković, prof. dr Milorad Petrović. Doktorske akademske studije na Medicinskom fakultetu u Beogradu, smer Fiziološke nauke, je upisao 2015. godine, pod mentorstvom prof. dr Silvia de Luke. Izborna veće Medicinskog fakulteta u Beogradu je na sednici održanoj 04.02.2021. izabralo dr. Jovana Juloskog za kliničkog asistenta za užu naučnu oblast Hirurgija sa anesteziologijom (opšta hirurgija).

Autor je i koautor više radova objavljenih u domaćim i međunarodnim časopisima. Učestvovao je na više nacionalnih i internacionalnih stručnih seminara, kongresa i edukacija.

Tečno govori engleski i nemački jezik.

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора: **Јован Т. Јулоски**

Број индекса: **ФН-12/15**

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

„Биохемијска карактеризација туморског ткива колоректалног карцинома”

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

У Београду, 28.06.2022. год.

Потпис аутора

образац изјаве о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора: **Јован Т. Јулоски**

Број индекса: **ФН-12/15**

Студијски програм: **Физиолошке науке**

Наслов рада „**Биохемијска карактеризација туморског ткива колоректалног карцинома**”

Ментор проф. др Силвио де Лука.

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

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

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

У Београду, 28.06.2022. год.

Потпис аутора

Изјава о коришћењу

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

„Биохемијска карактеризација туморског ткива колоректалног карцинома”

која је моје ауторско дело.

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

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

1. Ауторство (CC BY)

2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)

3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)

5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)

6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци. Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

У Београду, 28.06.2022. год.

Потпис аутора

1. **Ауторство.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. **Ауторство – некомерцијално.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. **Ауторство – некомерцијално – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. **Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. **Ауторство – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. **Ауторство – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.