

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



**УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ**  
**ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА**

**Милан Јовановић**

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

**ДОКТОРСКА ДИСЕРТАЦИЈА**

**Ментор: Проф. др Дарко Мирковић**

**КРАГУЈЕВАЦ, 2018. Године**

## Абстракт:

### АБ

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

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

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

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

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

**Abstract:**

**AB**

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

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

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

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

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

## САДРЖАЈ

<b>1. УВОД.....</b>	<b>5</b>
<b>1.1. Епидемиологија колоректалног карцинома.....</b>	<b>5</b>
<b>1.2. Етиопатогенза колоректалног карцинома.....</b>	<b>5</b>
1.2.1. Биологија колоректалног тумора.....	5
1.2.2. Иmunски одговор код колоректалног карцинома.....	6
1.2.3. Улога галектина-1 и галектина-3 у биологији колоректалног карцинома.....	8
<b>1.3. Класификација колоректалног карцинома.....</b>	<b>10</b>
1.3.1. Муцинозни аденокарцином .....	10
1.3.2. Аденокарцином ћелија прстена печатњака (Signet ring cell carcinoma; SRC) .....	12
1.3.3. Медуларни аденокарцином .....	12
<b>1.4. Патохистолошка класификација и процена исхода.....</b>	<b>13</b>
<b>1.5. Дијагностика.....</b>	<b>15</b>
<b>1.6. Лечење.....</b>	<b>15</b>
<b>2. ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА .....</b>	<b>17</b>
<b>3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ .....</b>	<b>18</b>
<b>3.1. ИСПИТИВАНИ УЗОРАК.....</b>	<b>19</b>
<b>3.2. ИСТРАЖИВАЧКИ ПОСТУПАК.....</b>	<b>20</b>
<b>4. РЕЗУЛТАТИ .....</b>	<b>28</b>
<b>5. ДИСКУСИЈА .....</b>	<b>80</b>
<b>6. ЗАКЉУЧЦИ.....</b>	<b>88</b>
<b>7. СКРАЋЕНИЦЕ .....</b>	<b>90</b>
<b>8. РЕФЕРЕНЦЕ .....</b>	<b>91</b>

## 1. УВОД

### 1.1. Епидемиологија колоректалног карцинома

Колоректални карцином (енгл. Colorectal Carcinoma CRC) је други најчешћи карцином код жена и трећи најчешћи код мушкараца. Стопа инциденције је већа у развијеним земљама него у неразвијеним. Међутим, морталитет је већи у неразвијеним (52% од укупних смртних случајева), што говори о лошијем преживљавању.<sup>[1]</sup> CRC је трећи најчешћи карцином у свету, и један је од водећих узрока смрти које су повезане са карциномом.<sup>[1]</sup> Упркос задовољавајућем петогодишњем преживљавању код раних стадијума што је верификовано од стране *Union for International Cancer Control*, прогноза у поодмаклој фази је веома лоша, поготово за IV стадијум (петогодишње укупно преживљавање <5%).<sup>[2]</sup> Због тога је неопходно пронаћи ефикасне индикаторе за рано откривање рака и правилну процену статуса болести.

### 1.2. Етиопатогенза колоректалног карцинома

#### 1.2.1. Биологија колоректалног тумора

У основи CRC идентификован је велики број генетских аберација.<sup>[3,4]</sup> Недавно, неколико фактора привукло је већу пажњу улогом у одвајању туморских ћелија чиме значајно доприносе напредовању карцинома. На основу геномске нестабилности могу се разликовати два пута настанка KRK-a, супресорски (традиционални) и мутаторски пут.<sup>[5]</sup> Поред ова два предложен је и трећи, молекуларни пут канцерогенезе карцинома колона, метилаторски пут.<sup>[6]</sup> Класификација KRK-a, са молекуларне тачке гледишта, базира се на ћелијским догађајима који карактеришу ова три пута карциногенезе: хромозомска нестабилност, микросателитска нестабилност и метилаторски фенотип CpGострваца (енгл. CpG island methylator phenotype, CIMP).<sup>[7]</sup> Супресорски пут или традиционални пут колоректалне карциногенезе предложили су још 90-тих година прошлог века Fearon и Vogelstein.<sup>[8]</sup> Овај модел настанка тумора од аденома до микросателитски стабилних карцинома може се уочити код 60-85% спорадичних

CRC-a.<sup>[9]</sup>Молекуларни профилових тумора карактерише се хромозомском нестабилношћу која укључује губитаки амплификацију хромозома, анеуплоидију, транслокације, губитак хетерозиготности и то најчешће за: 5q(*APC*ген), 8p, 17p(*TP53*ген) и 18q(гени *DCC*, *SMAD2* и *SMAD4*).<sup>[9]</sup>Тригером овог пута сматра се губитак или мутација у туморсупресорском *APC* гену (енг. *Adenomatous Polyposis Coli, APC*), али карактеристичне су и мутације прото-онкогена *KRAS*. Губитак гена *DCC*, *SMAD2* и *SMAD4* индукује даљу прогресију тумора и то онемогућавањем апоптозе туморских ћелија. Мутације *TP53* гена дешавају се касније током преласка бенигне лезије у инвазивну болест.<sup>[9]</sup>Карциноми који настају мутаторским путем колоректалне карциногенезе имају оштећен механизам за поправку погрешно спарених база у ДНК, чиме је омогућено накупљање мутација.<sup>[5]</sup>Овај механизам за поправку погрешно спарених база је под контролом неколико гена при чему су најчешћи *MLH1*, *MLH2*, *MLH6*, *PMS2*. Немогућност поправке може се лако уочити јер резултује у варијабилности дужина кратких, поновљених нуклеотидних секвенци у ДНК (микросателита) од ћелије до ћелије, тј. у микросателитској нестабилности.<sup>[5]</sup>Метилаторски пут колоректалне карциногенезе подразумева пажљиву карактеризацију епигенетских фактора, нарочито метилацију промоторских секвенци гена, што доводи до дефиниције *CIMP* (енгл. *CpG island methylator phenotype, CIMP*) карцинома.<sup>[9]</sup>Око 40% генских промотора сисара садржи *CpG* острвца која су неметилована код експримираних гена.<sup>[7]</sup>Сматра се да механизам метилације промоторских региона има улогу у настанку око 35% CRC-a.<sup>[10]</sup>За разлику од традиционалног „аденом-карцином“ пута настанка тумора, метилаторски пут започиње од прекурсорских лезија званих „сесилни рецкасти аденоми/полипи“ (енг. *sessil serrated adenoma/polyp*), па се често и сам пут назива „*serrated pathway*“.<sup>[10]</sup>

### 1.2.2. Имуни одговор код колоректалног карцинома

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

дендритске ћелије, такође могу секретовати цитокине.<sup>[11]</sup> Прецизније је имунски одговор означити као тип-1, тип-2 или тип-17. Критеријум за разликовање специфичног цитокинског профила обухвата следеће цитокине: *IFN- $\gamma$* , *TNF- $\alpha$* , *IL-2*, *IL-12* и *IL-18* за тип-1; *IL-4*, *IL-5*, *IL-9*, *IL-10* и *IL-13* за тип-2; *IL-6* и *IL-17* за тип-17; док су регулаторни цитокини *IL-10* и *TGF- $\beta$* . Најважнији цитокини *Th1* лимфоцита су *IFN- $\gamma$*  и *TNF- $\alpha$* . *Th1* лимфоцити покрећу ћелијски имунски одговор у борби против вируса и других интрацелуларних микроба, елиминишу туморске ћелије и стимулишу каснитип преосетљивости. Тип-2 имунски одговор је праћен секрецијом *IL-4*, *IL-5*, *IL-9* и *IL-13*.<sup>[12]</sup> Тип-2 цитокини активирају *B* лимфоците и учествују у хуморалном имунском одговору, укључујући продукцију антитела против екстрацелуларних патогена.<sup>[13]</sup> Обележје тип-17 имунског одговора је *IL-17*, потентни медијатор инфламаторног одговора у аутоимунским болестима.<sup>[14,15]</sup> Последњих година *IL-17* је класификован као медијатор урођеног и стеченог имунитета.<sup>[16]</sup> *IL-17* игра важну улогу у одбрани од инфекција као и у запаљенским и аутоимуним болестима, укључујући хроничну грануломатозну болест црева<sup>[17]</sup>, мултиплу склерозу<sup>[18]</sup> и реуматоидни артритис.<sup>[19]</sup> Показано је да *IL-17* игра кључну улогу у акутној инфламацији, у којој доминирају неутрофили.<sup>[20]</sup> На тип-17 имунски одговор, као негативни регулатор, утиче *IL-27*, цитокин који продукују углавном дендритске ћелије, моноцити и макрофаги.<sup>[21]</sup> Улога *IL-1* у CRC-у је контроверзна. *IL1B* транскрипти су повећани у биоптату туморског ткива код пацијената са метастатским CRC-ом<sup>[22]</sup> и полиморфизмантагониста *IL-1* рецептора (*IL1RN*) може бити повезан са CRC-ом.<sup>[23]</sup> Као одговор на стрес ћелије или инфекцију, долази до активације *IL-1 $\beta$*  каспазом посредованим цепањем након активације инфлазома богатог леуцином (*NLR*). *IL-4* је прекомерно експримиран у раним догађајима настанка CRC-а, обухватајући хиперпластичне полипе, аденоме и рецкасте аденоме, док код аденокарцинома ниво *IL-4* није повишен у поређењу са нормалним слузокожом.<sup>[24]</sup> Осим тога, повишен ниво *IL-4* у серуму пронађен је код пацијената са удаљеним метастазама (M1) за разлику од пацијената без метастаза (M0).<sup>[25]</sup> *IL-6* је прототип инфламаторних цитокина који је очигледно повезан са развојем спорадичних CRC-а и карцинома удружених са колитисом (енг. *colitis associated cancer*; *CAC*).<sup>[26]</sup> *IL-6* је прекомерно експримиран у ткиву CRC-а<sup>[27,28]</sup> и повишен ниво овог цитокина у серуму корелира са већим

димензијама тумора, појавом метастаза у јетри и смањеним преживљавањем.<sup>[29]</sup> Штавише, повећана концентрација *IL-6* у крви је независан неповољан прогностички показатељ преживљавања код пацијената са CRC-ом.<sup>[30]</sup> Пацијенти оболели од инфламаторне болести црева (енг. *IBD*) који имају повећан ризик за развој САС показују повишене вредности *IL-6* у серуму и подслугокожи (*lamina propria*).<sup>[31,32]</sup> Код пацијената са CRC-ом, експресија *IL-8* је усходно регулисана у туморском ткиву за разлику од суседног здравог ткива дебелог црева.<sup>[33]</sup> Штавише, полиморфизми матичних ћелија *IL-8* и *VEGF* (енг. *vascular endothelial growth factor*), два гена који су укључени у ангиогенезу тумора, повезани су са повећаним ризиком од рецидива у III стадијуму болести код пацијената са CRC-ом који су третирани адјувантном хемиотерапијом.<sup>[34]</sup> *IL-9* изгледа да има двоструку улогу у развоју тумора. Иако *IL-9* вероватно потпомаже настанак лимфома<sup>[35]</sup>, такође инхибира раст меланома директно или посредством антитуморског имуног одговора.<sup>[36,37]</sup> У поређењу са здравим особама, пацијенти са CRC-ом имају снижен ниво *IL-9* у серуму и интестиналном ткиву, и експресија *IL-9* у овим случајевима негативно корелира са прогресијом тумора.<sup>[38]</sup> Насупрот томе, једна студија није показала битне промене експресије *IL-9* у серуму пацијената са CRC-ом, са могућом тенденцијом ка повишеним нивоима *IL-9* код тумора високог степена.<sup>[25]</sup>

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

#### Галектин-1 (*gal-1*)

Велики број доказа показује да галектини учествују у бројним нормалним ћелијским функцијама и да су неправилни код пацијената са CRC-ом.<sup>[39-42]</sup> Међу свим познатим галектинима, гал-1 је добро описан. Гал-1 је вишефункционални  $\beta$ -галактозид који везује лектин синтетисан од стране различитих васкуларних, интерстицијалних, епителних, имунских ћелија, као и неопластичних ћелија.<sup>[43,44]</sup> Може се налазити унутар ћелија у једру и цитоплазми или у ванћелијском простору.<sup>[43,44]</sup> Показано је да је гал-1 укључен у неколико биолошких процеса и у различитим фазама туморогенезе попут регулације ћелијског раста и миграција, интеракција ћелија-екстрацелуларни матрикс и ћелија-ћелија интеракција, ангиогенезе, избегавања имуног система од стране туморских ћелија.<sup>[45,46]</sup> Примећена је повећана експресија гал-1 у ткивима



различитих солидних малигних тумора, док у нормалном ткиву није пронађена никаква експресија или врло слаба.<sup>[39-42]</sup> Имуномодулаторна улога гал-1 је такође позната, а и његов јак утицај на инфламацију је добро установљен.<sup>[47]</sup> Улога гал-1 у настанку, прогресији и смањењу инфламације је добро позната.<sup>[47]</sup> Претходне студије показале су да гал-1 инхибира раст ћелија и индукује апоптозу активираних имунских ћелија.<sup>[48,49]</sup> Показано је да гал-1 скреће баланс према типу 2 имуног одговора, истовремено инхибирајући продукцију *IFN $\gamma$* , *TNF $\alpha$* , *IL-2* и *IL-12* и олакшавајући секрецију *IL-5*, у *in vitro* и *in vivo* условима.<sup>[50-52]</sup> Неке студије сугеришу да гал-1 може инхибирати Т-ћелијску ефекторску функцију или индуковати смрт туморских ћелија инфилтришући их леукоцитима, и накнадно сузбити јак имуни одговор изазван проинфламаторним цитокинима.<sup>[51,53-55]</sup> *Camby 1* и сарадници<sup>[55]</sup> закључили су да туморске ћелије могу умањити Т-ћелијску ефекторску функцију помоћу секреције гал-1 што фаворизује настанак имуносупресивног окружења на месту тумора.

### Галектин-3 (gal-3)

Гал-3 је вишефункционални  $\beta$ -галактозид везујући лектин високо експримиран у различитим инфламаторним и епителним ћелијама.<sup>[56]</sup> Вишеструке функције гал-3 зависе од његовог положаја унутар ћелије или на ћелијској површини.<sup>[57]</sup> Добро је познато да гал-3 учествује у неколико биолошких процеса, као што су ћелијско везивање, ћелијска диференцијација и пролиферација, ембриогенеза, инфламација, инвазија туморских ћелија и метастазе.<sup>[58,59]</sup> Претходне студије су откриле важност гал-3 као прогностичког маркера за CRC. Показано је да болесници са детектабилном експресијом гал-3 у тумору имају више лимфних и удаљених метастаза, често венску инвазију и инвазију дубљих зидова у односу на гал-3 недетектабилне случајеве.<sup>[60]</sup> Штавише, недавна студија показала је да серумски гал-3 и карциноембриогени антиген (*CEA*) поспешују миграцију и метастазе туморских ћелија CRC-а.<sup>[61]</sup> Гал-3 има важне улоге у различитим биолошким и патолошким процесима, као што су раст ћелија и диференцијација, интеракција ћелија-екстрацелуларни матрикс метастазе, регулација апоптозе.<sup>[62,63]</sup> Раније студије су испитивале могућу повезаност између гал-3 и CRC-а. Имунохистохемијским бојењем потврђено је да је CRC са детектабилним гал-3 значајно већих димензија, са дубљом инвазијом зида

Колоректални карцином: Значај концентрација цитокина у серуму и фецесу за процену тежине болести колона и са лошијом хистолошком диференцијацијом.<sup>[60,63]</sup> Други су показали да је гал-3 усходна регулација у корелацији са прогресијом тумора и предвиђа краће преживљавање пацијената са CRC-ом.<sup>[63]</sup>

### **1.3. Класификација колоректалног карцинома**

Више од 90% CRC-а су аденокарциноми епителног порекла, потичу из мукозе колоректума.<sup>[64]</sup> Остали ретки типови су аденосквамозни, сквамозни, CRC вретенастих ћелија, недиферентовани. Класични аденокарцином карактеришу гландуларне формације, које чине основу хистолошког градирања. Код добро диферентованих тумора, 95% тумора чине гландуларне формације. Умерено диферентоване аденокарциноме чини између 50 и 95% гландуларних формација. Лоше диферентовани су углавном солидни са мање од 50% гландуларних формација. У клиничкој пракси најчешћи је умерено диферентовани који чини око 70% свих аденокарцинома. У класификацији Светске здравствене организације, постоји више хистолошких варијанти колоректалног карцинома, као што су: муцинозни, ћелија прстена печатњака, медуларни, микропапиларни, назубљени, крибриформни, вретенастих ћелија, недиферентовани.<sup>[65]</sup> Само прве три варијанте биће разматране у овом тексту.

#### **1.3.1. Муцинозни аденокарцином**

Чини 10-15% свих дијагностикованих КРК-а. Код овог типа карцинома више од 50% екстрацелуларног муцина чини укупни туморски волумен (слика 1). Тумори са значајном муцинозном компонентом, више од 10%, а мања од 50 %, називају се аденокарциноми са муцинозном диференцијацијом. Прогноза муцинозног аденокарцинома у односу на конвенционални аденокарцином је различита међу ауторима и студијама. Исто тако, постоје значајне разлике у клиничким и хистопатолошким карактеристикама између муцинозног и конвенционалног аденокарцинома колоректума. Муцинозни се чешће налази код карцинома колона него код карцинома ректума. Муцинозни карцином је подтип CRC-а који се чешће јавља

код жена него код мушкараца, и преобладајно, али не и ексклузивно, локализован у проксималном колону. Демографски, чешће се налази у Европи, Северној Америци и у Аустралији. Даље, муцинозни аденокарцином је чешће дијагностикован код пацијената са инфламаторним болестима црева, као и што пацијенти са историјом пелвичног и абдоминалног зрачења, чешће обољевају од аденокарцинома муцинозног типа. Муцинозни аденокарцином се сматра лоше диферентованим (градус 3), и генерално се дијагностикују у каснијем стадијуму болести. Постоји више хипотеза које покушавају да објасне овај феномен. На првом месту муцинозни аденокарцином се чешће јавља у проксималном колону, исто тако мање је солидан што га укупно чини тежим за дијагнозу. Такође, у односу на класични аденокарцином има другачији молекуларни „потпис“, што хипотетички може условити бржу прогресију болести. Многи муцинозни аденокарциноми се јављају код пацијената са херидитарним неполипозним CRC-ом (*HNPCC* или *Lynch* синдром), када најчешће испољавају висок ниво микросателитне нестабилности (енг. *High microsatellite instability MSI-H*). За разлику од *MSI-H* муцинозних тумора који су боље прогнозе, муцинозни аденокарциноми (енг. *Mucinous colorectal carcinoma; MCC*) су агресивнији и повезани са лошијом прогнозом, када се дијагностикују у каснијем стадијуму болести. *BRAF* мутација се такође, чешће налази код муцинозних аденокарцинома и повезана је са инфилтративним начином раста. Занимљиво је да је учесталија и *KRAS* и *PIK3CA* мутација код пацијената са муцинозним CRC-ом. *MUC 2* ген, који кодира муцин-2 протеин, је често повећане експресије код пацијената са муцинозним аденокарциномом. Из горе наведеног, проистичу механизми који покушавају да објасне релативну резистентност муцинозних аденокарцинома на хемио и радио терапију, у поређењу са класичним аденокарциномом. Ова резистенција је вероватно узрокована комбинацијом другачије молекуларне основе, клиничке експресије у односу на класични аденокарцином.<sup>[64]</sup> Муцинозни аденокарцином дијагностикован у метастатској болести је уопштено, лошије прогнозе у поређењу са метастатском болешћу аденокарцинома.

### 1.3.2. Аденокарцином ћелија прстена печатњака (Signet ring cell carcinoma; SRC)

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

Ретроспективна студија Турских аутора, са приказом 22 случајева дијагностикованог *SRC* CRC-а, долази до закључка да постоји полна разлика у дистрибуцији овог карцинома, са доминантном појавом у мушкој популацији. Већина болесника је млађе животне доби, око 40 година живота, односно четврта деценија живота и јавља се око 10-ак година раније него конвенционални аденокарцином. За разлику од Јапанске студије, која проксимални колон идентификује као доминантно место појаве *SRC* CRC-а, у Турској студији ректум је најчешћа локализација. У односу на стадијум, већина студија показује да се дијагноза *SRC* CRC-а поставља у III или IV стадијуму болести (78-80%), са захватањем лимфних нодуса у 77.4%, перитонеалним метастазама у 38.7% и хепатичном болешћу у само 2.9% случајева. *SRC* CRC је тумор са дифузном инфилтрацијом и циркуларним задебљањем зида црева, зато се често назива „колонични линитис пластика“, мада у каснијим стадијума може имати клиничку презентацију у виду вегетације или велике туморске масе. Куративна, онколошка ресекција је била изводљива у нешто више од 50 % случајева.<sup>[66]</sup> У већини студија, просечно време преживљавања је између 20 и 45 месеци.

### 1.3.3. Медуларни аденокарцином

Овај карцином је екстремно редак, са просечном инциденцом од 3.47 на популацији од 10 милиона становника. Просечно се се дијагностикује 5-7 случајева медуларног CRC-а на 10 000 дијагностикованих CRC-а. Медуларни аденокарцином колоректума јеподтип аденокарцинома са снажном повезаношћу са *MSI-H*. И поред лоше диференцијације релативно је боље прогнозе.<sup>[65]</sup>

#### 1.4. Патохистолошка класификација и процена исхода

Ресецирани сегмент дебелог црева је кључни извор података релевантних за исход оперативног лечења и постоперативно праћење болесника. Анализирани су извештаји о макроскопској и микроскопској патохистолошкој анализи да би се болесници сврстали у хомогене групе са различитим ризиком од периоперативне смрти. Овај модел дозвољава и категоризацију болесника у различите групе са идентичним стадијумом тумора и хистолошком грађом у циљу ефикасније прогнозе периоперативног морталитета болесника након хируршког лечења карцинома дебелог црева.<sup>[67,68]</sup>

Да би се постигла униформност и конзистентност у патохистолошким извештајима, препоручује се хистолошка класификација тумора предложена 2003. године од стране Светске здравствене организације (СЗО).<sup>[67,68]</sup> Патохистолошка класификација СЗО за одређивање стадијума тумора јесте *tumor, nodes, metastases (TNM)* класификација, а за одређивање резидуалног статуса тумора *residual (R)* класификација.<sup>[67,68]</sup> Најпознатија и највише коришћена класификација је она коју је 1932. године предложио *Cuthbert Dukes*, а која прати трансмуралну пенетрацију инвазивног карцинома према околном ткиву, као и присуство лимфонодалних метастаза: *A* – раст карцинома ограничен на мукозу и субмукозу без захватања лимфних чворова, *B* – карцином захвата цео зид црева, али без метастаза у регионалне лимфне чворове, *C* – карцином захвата зид дебелог црева до различите дубине, али су присутне метастазе у регионалне лимфне чворове, *D* – присутне су удаљене метастазе без обзира на друге факторе или локално иноперабилан тумор.<sup>[68,69]</sup> Оригинална *Dukes* класификација модификована је и допуњена *Astler-Coller* класификацијом, са подгрупама *B1* и *C1*.

Данас се најчешће користи *UICC/AJCC (International Union Against Cancer/American Joint Committee on Cancer)* *TNM* класификација, која се базира на суштинским елементима *Astler-Coller-Dukes* класификације: *Tis – carcinoma in situ*, стадијум 0, *A* – карцином ограничен на мукозу – *T1*, стадијум I; *B1* – карцином захвата мукозу и субмукозу – *T1N0*, стадијум II; *B2* – карцином продире кроз мускуларис проприју – *T3N0*, стадијум II; *C1* – тумор ограничен на мускуларис проприју, метастазе у регионалне лимфне чворове – *T2N1-2*, стадијум III; *C2* – тумор инфилтрише кроз мускуларис проприју, метастазе у лимфне чворове, тумор пробија цео зид црева (тумор захвата овојницу црева) – *T3N1-2*, стадијум III; *D* – удаљене метастазе или локално

инооперабилан тумор *T1-4, N0-2, M1*, стадијум IV.<sup>[69,70]</sup> Важан корак у патохистолошком испитивању интраоперативно и постоперативно је одређивање класификације *R*, односно потврда или искључивање присуства резидуалног туморског ткива, посебно у околини ресекционих линија. У том смислу најважније је постићи комплетну туморску ресекцију без резидуалног тумора (*R0*). Распон од случајева са микроскопским (категорија *R1*) или случајева са макроскопским резидуалним тумором представља независни прогностички фактор.<sup>[70-4]</sup> Хистолошки градус је полуквантитативни параметар који одређује степен диферентованости туморског ткива. Мултидисциплинарна радна група за колоректалне карциноме на консензус конференцији 2000. године препоручила је поједностављену поделу на: а) добро диферентоване (*low grade*) аденокарциноме и б) слабо диферентоване (*high grade*) аденокарциноме. Према овој препоруци, подела се врши на основу процента заступљености glandуларних формација у тумору (више или мање од 50%).<sup>[71,72]</sup> Поред субкласификације колоректалних карцинома по *Astler-Coller-Dukes*, присутна је и субкласификација коју је дала *Gastrointestinal Tumor Study Group (GITSG)* која са *C1* означава тумор са метастазама у 1–4 лимфна чвора, а са *C2* тумор са метастазама у 5 и више лимфних чворова, што треба имати у виду због могућег неслагања.<sup>[73]</sup> Паралелна процена по различитим системима веома је важна и у литератури је познат случај исто тако познатог болесника, председника САД, коме је оперисан аденокарцином дебелог црева *Dukes A, Astler-Coller B1*, који није еквивалент *Dukes B* стадијуму. Болесници са колоректалним карциномом *Dukes A* имају петогодишње преживљавање 80–90%, што је више него што имају болесници са *Dukes B* карциномом.<sup>[73]</sup> Литературни подаци показују да тумор са више од 50% муцинозног карцинома има знатно лошију прогнозу од немучинозног тумора, али само у стадијумима *A* и *C*, док муциозна диференцијација не корелише са прогнозом у стадијумима *B* и *D*.<sup>[74]</sup> Пропорција муциозних аденокарцинома и *Astler-Coller-Dukes* група *C2* чешћа је код болесника млађих од 30 година, те приликом процене прогностичких фактора ваља узети у обзир и године болесника. На прогнозу хируршке терапије има утицаја и венска инвазија туморских ћелија, док налаз малигних ћелија у циркулишућој крви није везан за венску инвазију и нема прогностичког значаја у односу на преживљавање болесника.<sup>[73,74]</sup> Болесници са патохистолошким *D* степеном тумора (*Astler-Coller- Dukes*), стадијума

IV болести (*TNM, T1-4, N0-2, M1*), слабо диферентованим муцинозним аденокарциномом, имају статистички значајно виши морталитет у периперативном току (77,8%).

### 1.5. Дијагностика

Златни стандард за дијагностику CRC-а је колоноскопија са биопсијом.<sup>[75,76]</sup> Ендоскопски се констатује постојање туморске инфилтрације и одређује се њена локализација у смислу удаљености од анокутане линије. Хистопатолошки налаз биоптата тумора обезбеђује потврду постојања малигне неопластичне пролиферације и у највећем броју случајева утврђивање хистолошког типа тумора. Степен диференцијације тумора одређен на биоптичком узорку показује ниску подударност са степеном диференцијације истог тумора, одређеним на оперативном материјалу.<sup>[77]</sup> Код оперисаних болестника се дефинитивна дијагноза тумора, са одређивањем свих прогностичких и предиктивних фактора, поставља хистопатолошком експертизом оперативног материјала одстрањеног колона са тумором. Радиолошке методе, као нпр. *СТ* (компјутеризована томографија, енгл. *Computerized Tomography*) преглед абдомена и грудног коша имају своју улогу у процени дисеминације болести, али не и у дијагностици примарног тумора. Радиолошка дијагностика је, међутим, од изузетног значаја за евалуацију локорегионалног статуса примарног карцинома ректума.<sup>[76]</sup>

### 1.6. Лечење

Карцином колона је болест код које је у великом броју случајева терапија мултимодална. Потенцијално куративан је хируршки третман, који је довољан код пацијената у стадијумима I и II.<sup>[75,76,78]</sup> Међутим, уколико постоје индикатори високог ризика, као што су висок хистолошки градус, лимфо-васкуларна инвазија, перинеурална инвазија или илеус у време операције, онда се наког хируршког лечења додаје и адјувантна хемиотерапија 5- флуороурацилом и леуковорином.<sup>[76]</sup> У III стадијуму болести (локо-регионална болест) се постоперативно даје капецитабин, док

се пацијентима са удаљеним метастазама поред флуоропиримидина у терапију укључује још и иринотекан или оксалиплатин. Болесници са удаљеним, а потенцијално ресектабилним метастазама у јетри и плућима, додатно добијају и имунотерапију антителом на рецептор васкуларног ендотелијалног фактора раста – бевацизумаб, или на рецептор епидермалног фактора раста – цетуксимаб, у зависности од мутационог *K-ras* статуса. Зрачна терапија има своје место и у неoadјувантном и у постоперативном третману пацијената са карциномом ректума, али не и пацијената са карциномом колона.<sup>[76]</sup>



## 2. ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА

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

У складу са основним циљем поставили смо следеће експерименталне задатке:

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

### ХИПОТЕЗЕ СТУДИЈЕ

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

### **3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ**

Студија је спроведена у Центру за гастроентерохепатологију, Клиничког центра Крагујевац и у Центру за молекулску медицину и истраживање матичних ћелија Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, у периоду од марта 2017. године до јануара 2018. године.

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

### 3.1. ИСПИТИВАНИ УЗОРАК

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

Испитаници који су уврштени у студију су по процени специјалисте гастроентерохепатолога испунили све укључујуће и ниједан искључујући критеријум. Општи укључујући критеријум су старосна доб изнад 18 година, добровољни пристанак за учешће у студији и индикација за извођење колоноскопског прегледа према симптоматологији болесника (поремећај цревног пражњења, крв у столицу, анемија, губитак апетита и тежине, позитиван тест на фекално окултно крварење). Искључујући критеријуми су раније ресекције колоректалног карцинома, рецидивантни тумори колоне и спроведена зрачна и/или хемиотерапија, коморбидитет са другим гастроентеролошким болестима (рефлуксна болест једњака, улкусна болест, хеликобактер пилори инфекција, малапсорптивни синдром, дивертикулозна болест црева), аутоимунским, запаљенским, малигним и инфективним болестима.

### 3.2. ИСТРАЖИВАЧКИ ПОСТУПАК

Свим испитаницима укљученим у истраживање урађен је колоноскопски преглед и биопсијом *ex tempore* дијагностикован је колоректални карцином. Колоноскопски прегледи су обављани у Центру за гастроентерохепатологију, Клиничког центра Крагујевац, уз одговарајућу припрему испитаника. Испитаницима на дан пријема је узета крв за рутинске лабораторијске анализе, одређивање концентрације туморских маркера и цитокина у серуму. Узет је и узорак столице за одређивање концентрације цитокина. За одређивање концентрације цитокина у серуму, свим испитаницима венепункцијом узето је по 10 ml крви. Узорак је центрифугиран на 2000 обртаја 5 минута, а затим је издвојен серум аликвотиран и чуван на температури од -20°C.

Колоноскопија је ендоскопска процедура којом се откривају патолошке промене и абнормалности у дебелом цреву. Колоноскопија се изводи уз помоћ колоноскопа и на врху овог апарата је камера која омогућава визуализацију унутрашњости црева. За колоноскопију је неопходна припрема испитаника у периоду од неколико дана и изводи се по стандардним протоколима припреме.

### ВАРИЈАБЛЕ КОЈЕ СЕ МЕРЕ У СТУДИЈИ

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

Као *зависне варијабле* праћене су концентрације цитокина TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-22, IL-27, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, IL-13, IL-17, IL-33, sST2, TGF- $\beta$ , IFN- $\gamma$ , Gal-1 и Gal-3 у серуму и фецесу.

*Збуњујуће варијабле:*

- удружене болести (дијабетес, повишен крвни притисак...)

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

- лекови које узимају пацијенти
- лабораторијске анализе крви ( функција јетре и бубрега)
- навике пацијената (пушач, конзумирање алкохола, кафе)

Свим испитаницима са колоректалним карциномом урађен је ултразвучни преглед стомака, радиографски преглед плућа и срца, компјутеризована томографија стомака и мале карлице код ректалне и дисталне локализације тумора. Ултразвучни прегледи стомака су рађени у Центру за гастроентерохепатологију, уз одговарајућу припрему. Компјутеризована томографија стомака и мале карлице је рађена у Служби за радиолошку дијагностику по стандардним протоколима. Радиографски прегледи су обављени у Служби за радиолошку дијагностику по стандардним протоколима и испитаници су сврстани у групу са дијагностикованом метастатском болешћу јетре и плућа и групу испитаника без дијагностикованих метастаза у јетри и плућима. Свим испитаницима код којих је верификована слободна течност у стомаку, узет је пунктат који је послат у Службу за патологију где је анализарано присуство малигнух ћелија у пунктату. Карциноматоза перитонеума је верификована налазом малигнух ћелија у пунктату. Даље су болесници сврстани у две групе, односно у групу са карциноматозом перитонеума и у групу без карциноматозе перитонеума.

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

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

### **Патохистолошка анализа ткивних исечака**

Ткивни исечци за патохистолошку анализу су анализирани у Служби за патологију. Исечци ткива су фиксирани у пуферисаном 4% формалину, 18-24 сата, дехидрисани у алкохолу и калупљени у парафин. Парафински блокови ткива су серијски сечени на пресеке дебљине 5–7  $\mu\text{m}$ . Уследило је бојење ткивних пресека методом хематоксилин-

еозин по Heidenhain-у (79) и сагласно препорукама Gurr-а (80): на почетку су плочице са ткивним пресецима излагане пуферу формалдехида 10 секунди, онда су опране у текућој води, а затим су потопљене два минута у Mayer-ов хематоксилин (Merck). На крају су плочице са ткивним пресецима испране један минут у текућој води и бојене алкохолним еозином (Merck) у трајању од једног минута. Након бојења исечци су дехидрирани тако што су потапани у серију растућих концентрација алкохола и то следећим редом: најпре један минут у 85%-тном алкохолу, затим два пута по 50 секунди у 96%-тном и на крају два пута по 50 секунди у апсолутном алкохолу. Након бојења и дехидратације, уследио је поступак просвет- љавања потапањем у мешавину ксилола и алкохола у односу 1:1, 50 секунди, а затим два пута по 50 секунди само у ксилолу. На крају је на ткивне исечке нанет Канада балзам (Canadabalsam, Centrophem, Србија) и препарати су прекривени покровним стаклима. Овако припремљени ткивни исечци су, након 24-часовног сушења, анализирани светлосном микроскопијом (увеличање 10x и 40x).

Хистопатолошке (микроскопске) особине су подразумевале одређивање хистолошког (HG) и нуклеарног градуса (NG) тумора. Хистолошки градус тумора означава степен диференцијације и број митоза туморских ћелија и у складу је са агресивношћу тумора. Хистолошки градус тумора је препознат као важан прогностички параметар код колоректалног карцинома. Препоручен је и двоструки систем градирања тумора: тумор ниског градуса (добро диферентовани и умерено диферентовани) и високог градуса (слабо диферентовани и недиферентовани) (81). Према светској здравственој организацији разликује се добро, умерено, слабо диферентовани и недиферентовани тумор (82). Оба система су заснована искључиво на проценту жлезданих формација.

Нуклеарни градус је такође параметар који указује на степен ћелијске малигности, а заснива се на одређивању морфолошке измењености једра малигне ћелије у односу на непромењену, здраву ћелију. Дефинише се као низак (NGI), средњи (NGII) и висок (NGIII) (83).

У нашој студији испитаници са колоректалним карциномом у односу на хистолошки градус су сврстани у две групе: 1) градус I, добро диферентован и 2) градус II, умерено диферентован + градус III, лоше диферентован, а у односу на нуклеарни градус у три

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

групе: низак (I), средњи (II) и висок (III). Ниједан од анализираних тумора није имао недиферентован хистолошки и нуклерани градус.

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

### **Изолација течне фракције фецеса**

Узорци столице пацијената (1-10 g) сакупљани су у стерилним контејнерима и премерени. Подељени су на аликвоте од по 1 g и затим ресуспендовани у 5 ml коктела инхибитора протеазе (protease inhibitor cocktail- SIGMA, P83401), разблаженог 1:100, и центрифугирани 5 минута на G, на 4°C, како је претходно описано (84, 85). Супернатанти су сакупљени и складиштени на - 80°C до анализе.

### **Одређивање концентрације медијатора инфламације у серуму и фецесу**

Издвојени серум и течна фракција фецеса испитаника који учествују у истраживању су замрзнути на -20°C до извођења анализе. Концентрације TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-22, IL-27, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, IL-13, IL-17, IL-33, sST2, TGF- $\beta$ , IFN- $\gamma$ , Gal-1 и Gal-3 одређиване су одговарајућим комерцијалним ELISA тестовима специфичним за хумане цитокине (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), као што је описано у нашим претходним истраживањима (86, 87).

Стандарди су пре употребе растворени у PBS-у (pH 7.2), тако да почетне концентрације буду 250 pg/ml за IL-1 $\beta$ ; 600 pg/ml за IL-6; 1000pg/ml за IL-17, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ; 1500 за IL-33; 2000 pg/ml за IL-4, IL-10, TGF- $\beta$ , sST2; 4000 pg/ml за Gal-3; 6000 pg/ml за IL-13; 8000 pg/ml за IL-12; 20ng/ml за Gal-1. Од оваквих штокова направљена су серијска разблажења у 7 тачака у комерцијалном растварачу, према упутству произвођача. 100  $\mu$ l радне концентрације везујућег антитела (енгл. Capture Antibody) сипано је у бунарчиће полистиренских микротитар плоча (MTP, енгл. Microtiter-plate) са 96 бунарчића са равним дном (SARSTED). Плоче су прелепљене адхезивном фолијом (енгл. ELISA Plate Sealers) и остављене преко ноћи на собној температури, након чега су бунарчићи испрани пуфером за испирање (енгл. Wash Buffer) у аутоматској машини за испирање MTP-а. Затим је у све бунарчиће додат блокирајући пуфер (Block Buffer, 1% BSA у PBS-у) финалног волумена 300  $\mu$ l и MTP су остављене минимум један сат на собној температури, а потом испране пуфером за испирање. Сви узорци су претходно разблажени 10 пута у дејонизованој води. Разблажени узорци и припремљени стандарди насути су у MTP, прекривени адхезивном фолијом и остављени два сата на собној температури. Након инкубације и испирања MTP, у све бунарчиће је додато 100  $\mu$ l радне концентрације детекционог антитела (енгл. Detection Antibody), плоче су обложене адхезивном фолијом и поново остављене два сата на соб-



Колоректални карцином: Значај концентрација цитокина у серуму и фецесу за процену тежине болести  
ној температуре. Плоче су потом испране, а у бунарчиће сипано 100  $\mu$ l радне концент-  
рације Streptavidin-HRP (енгл. Streptavidin horseradish peroxidase). Инкубација на собној  
температури и без директног излагања светлости прекинута је након 20 минута, испи-  
рањем МТР-а. У бунарчиће је сипано 100  $\mu$ l раствора супстрата (енгл. Substrate Solution:  
Colorreagent A+Colorreagent B, 1:1). Двадесет минута касније, додато је 50  $\mu$ l стоп  
раствора (енгл. Stop Solution: 2  $\text{NH}_2\text{SO}_4$ ) и апсорбанца је мерена одмах у сваком  
бунарчету, помоћу Micro platereader-а (Zenyth, Anthos, UK) подешеног на 450 nm. Све  
измерене вредности су умањене за вредности апсорбанце слепе пробе (дејонизо-вана  
вода). На основу измерених вредности стандарда направљена је стандардна крива, а  
помоћу ње су израчунате вредности за сваки појединачан узорак. Сви узорци су ме-  
рени у дуплику.

### **Одређивање серумских концентрација CRP и туморских маркера AFP, CEA и СА 19-9**

За одређивање концентрације CRP и туморских маркера AFP, CEA и СА 19-9 у серуму,  
свим испитаницима венепункцијом узето је по 5 ml крви. Узорак је центрифугиран на  
3000 обртаја 20 минута. Серумске концентрације CRP (енгл. C-reactive protein) су  
одређиване турбидиметријском методом, док серумске концентрације туморских  
маркера AFP (енгл. Alpha phetoprotein), CEA (енгл. Carcinoembryonic antigen) и СА  
19-9 (енгл. Carbohydrate antigen) су одређиване методом хемилуминисценције, у  
централној лабораторији Клиничког центра.

## **СНАГА СТУДИЈЕ И ВЕЛИЧИНА УЗОРКА**

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

## **СТАТИСТИЧКА ОБРАДА ПОДАТАКА**

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

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

За поређење средњих вредности једног обележја више популација коришћен је тест за вишеструку компарацију или Kruskal-Wallis-ов тест за вредности које нису пратиле нормалну расподелу и One-Way ANOVA тест за вредности са нормалном расподелом. Интензитет и смер повезаности између варијабли су одређивани Pearson-овим и Spearman-овим коефицијентом корелације. За приказ односа сензитивности и специфичности и да ли неко обележје може да буде маркер за неку појаву коришћена је крива оперативне карактеристике примаоца (енгл. Receiver operating characteristic curve,

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

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

## 4. РЕЗУЛТАТИ

### Карактеристике испитаника

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

**Табела 1.** Основне карактеристике испитаника

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

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

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

Оболели од CRC-a подељени су на три групе, на основу нуклеарног градуса (I/II/III). Анализиране су концентрације цитокина IL-2, IL-22, IL-27, IL-17, IL-33, sST2, IL-4, IL-6, IL-1- $\beta$ , TGF- $\beta$ , IFN- $\gamma$ , IL-10, IL-12, IL-13, TNF- $\alpha$ , gal-1 и gal-3 у серуму испитаника и упоређене између дефинисаних група. На табели 2 уочава се да је серумски ниво IL-4 статистички значајно већи у групи испитаника са нуклеарним градусом II, у односу на

градус III. Није нађена статистички значајна разлика у системским и фецесним вредностима цитокина IL-2, IL-22 и IL-27 (резултати нису приказани).

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

Концентрација цитокина (pg/ml)	Нуклеарни градус			p
	I	II	III	
IL-17	74,08±2,85	71,83±15,91	76,39±5,89	p>0.05
IL-33	89,98±37,39	67,29±71,38	98,43±59,22	p>0.05
sST2	1469,96±250,09	921,45±672,21	669,02±467,89	p>0.05
IL-4	625,52±28,76	<b>713,11±133,78</b>	<b>594,31±60,45</b>	<b>p=0.014</b>
IL-6	8,86±0,44	7,81±2,09	12,28±16,85	p>0.05
IL-1β	11,76±2,26	11,05±9,52	10,28±2,64	p>0.05
TGF-β	1374,12±43,72	1118,08±563,47	1072,70±480,53	p>0.05
IFN-γ	187,80±126,29	194,47±130,36	162,27±73,67	p>0.05
IL-10	4,91±0,61	4,47±2,39	4,41±0,74	p>0.05
IL-12	57,13±13,47	47,44±21,41	55,46±14,13	p>0.05
IL-13	351,93±84,22	411,19±102,29	437,85±100,67	p>0.05

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

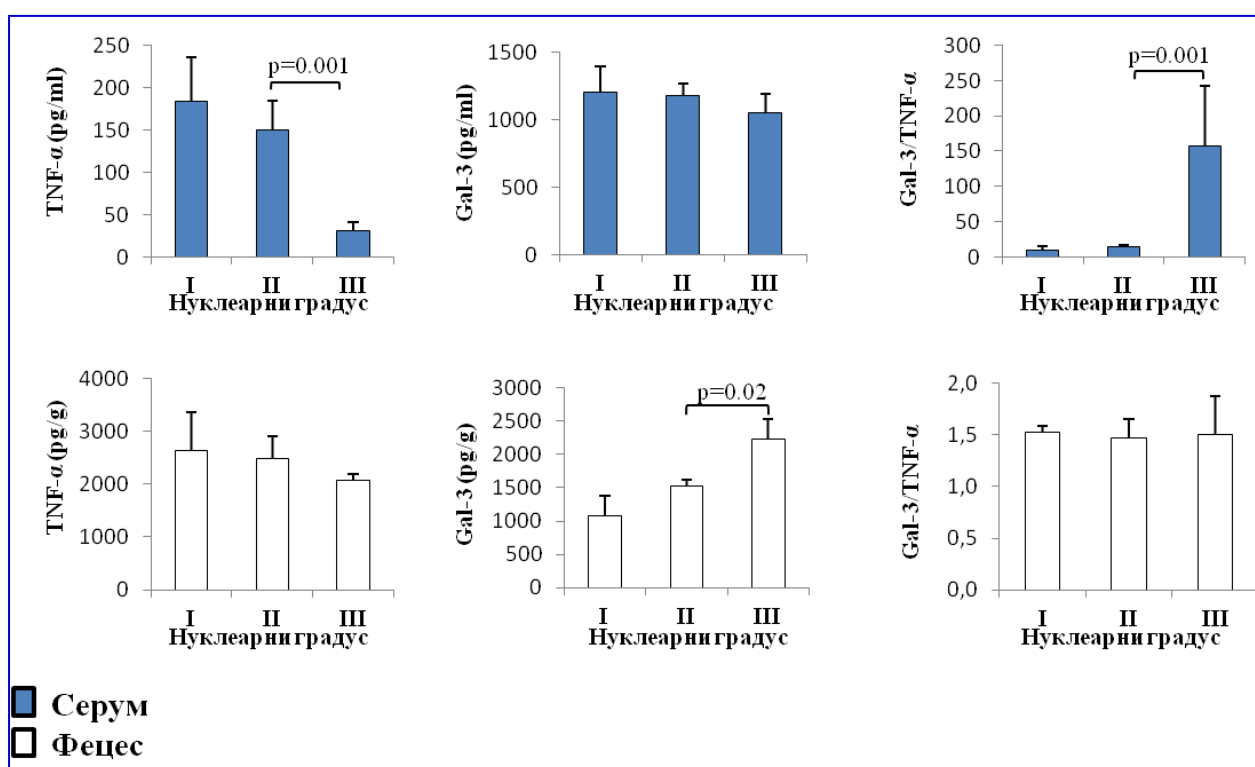
**Табела 5.** Односи концентрација испитиваних биомаркера у фецесу болесника са CRC-ом у односу на нуклеарни градус

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

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

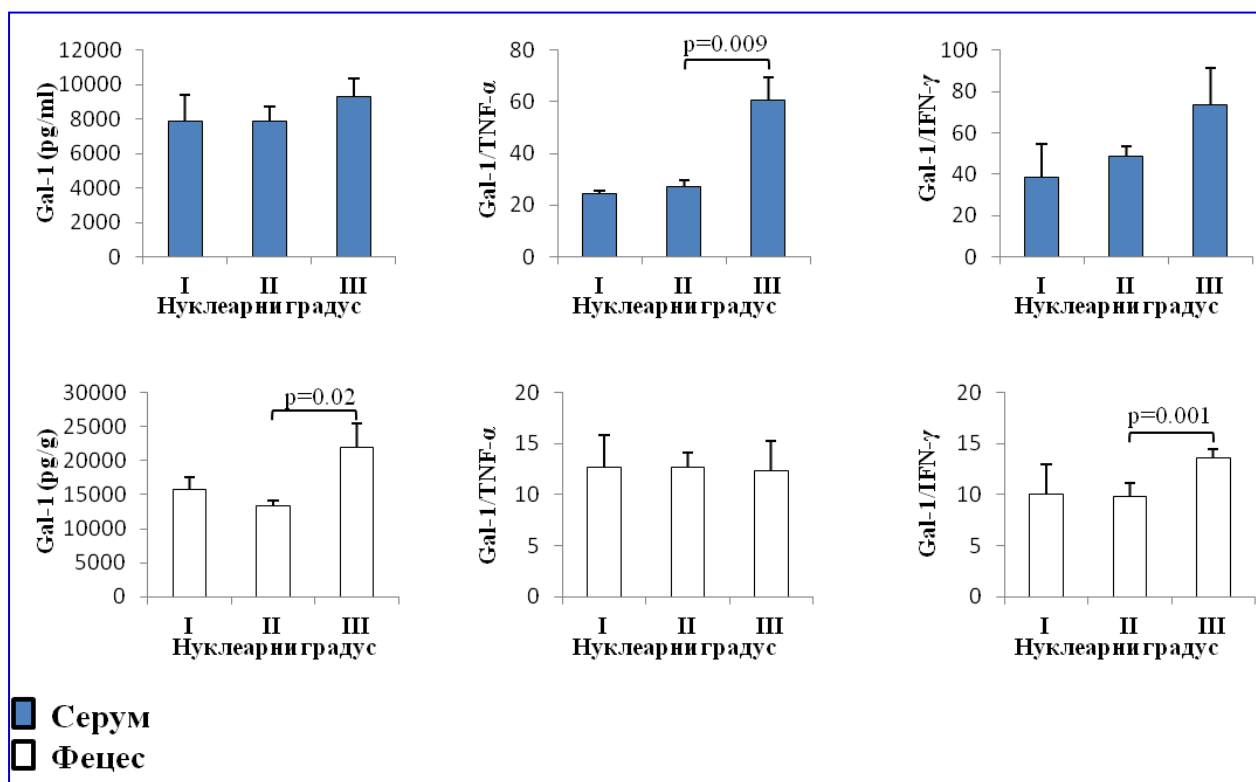


Евалуација системских нивоа претходно дефинисаних маркера од интереса показала је значајно нижи ниво TNF- $\alpha$  у групи пацијената са нуклеарним градусом III у односу на пацијенте са градусом I или II ( $p = 0,001$ ; Фигура 1). Није било статистичких разлика у серумском нивоу Gal-3 између дефинисаних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



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

Као што је приказано на фигури 2, оболели од CRC-а са већим нуклеарним градусом имају веће фецесне вредности Gal-1 (III vs. II:  $21936,14 \pm 3601,19$  vs.  $13286,97 \pm 782,97$  pg/ml;  $p=0.020$ ; III vs. I:  $21936,14 \pm 3601,19$  vs.  $15724.30 \pm 1903.49$  pg/ml;  $p=0.047$ ), системске вредности односа Gal-1/TNF- $\alpha$  (III vs. II:  $60,46 \pm 9,01$  vs.  $27,17 \pm 2,62$ ;  $p=0.009$ ; III vs. I:  $60,46 \pm 9,01$  vs.  $24.44 \pm 0.89$ ;  $p=0.032$ ), као и фецесног односа Gal-1/IFN- $\gamma$  (III vs. II:  $13,64 \pm 0,78$  vs.  $9,76 \pm 1,39$ ;  $p=0.001$ ; III vs. I:  $13,64 \pm 0,78$  vs.  $10.03 \pm 2.96$ ;  $p=0.048$ ).



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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

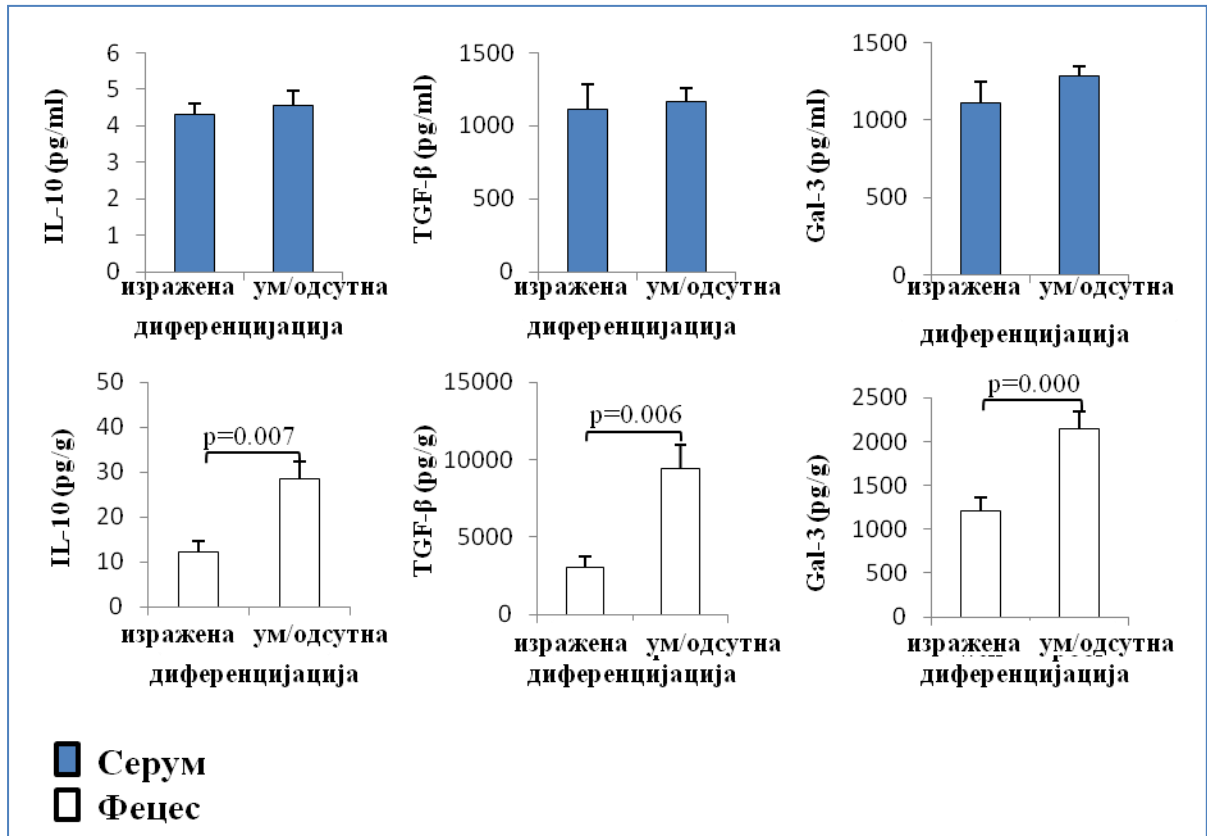
Анализом односа концентрација испитиваних биомаркера у фецесу болесника са CRC-ом у односу на стадијум диференцијације тумора, показано је да је однос концентрација sST2/IL-33 статистички значајно већи у групи болесника са умереном + одсутном диференцијацијом тумора у односу на групу болесника са израженом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

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

Односи citoкина	Стадијум диференцијације		p
	Изражена	умерена + одсутна	
TGF- $\beta$ /IL-12	14,33 $\pm$ 9,95	26,26 $\pm$ 36,43	p>0.05
TGF- $\beta$ /TNF- $\alpha$	4,80 $\pm$ 3,69	7,70 $\pm$ 9,55	p>0.05
TGF- $\beta$ /IL-1 $\beta$	12,78 $\pm$ 19,64	27,43 $\pm$ 36,91	p>0.05
TGF- $\beta$ /IL-17	1,78 $\pm$ 1,30	2,43 $\pm$ 2,95	p>0.05
TGF- $\beta$ /IFN- $\gamma$	3,40 $\pm$ 2,97	5,49 $\pm$ 4,75	p>0.05
TNF- $\alpha$ /IL-10	79,12 $\pm$ 22,83	79,76 $\pm$ 36,67	p>0.05
IL-1 $\beta$ /IL-10	145,70 $\pm$ 162,86	77,88 $\pm$ 109,05	p>0.05
IFN- $\gamma$ /IL-10	109,90 $\pm$ 62,21	82,17 $\pm$ 41,48	p>0.05
IL-17/IL-10	35,49 $\pm$ 27,37	21,54 $\pm$ 11,77	p>0.05
sST2/IL-33	<b>1,56<math>\pm</math>0,69</b>	<b>2,55<math>\pm</math>1,45</b>	<b>p=0.018</b>

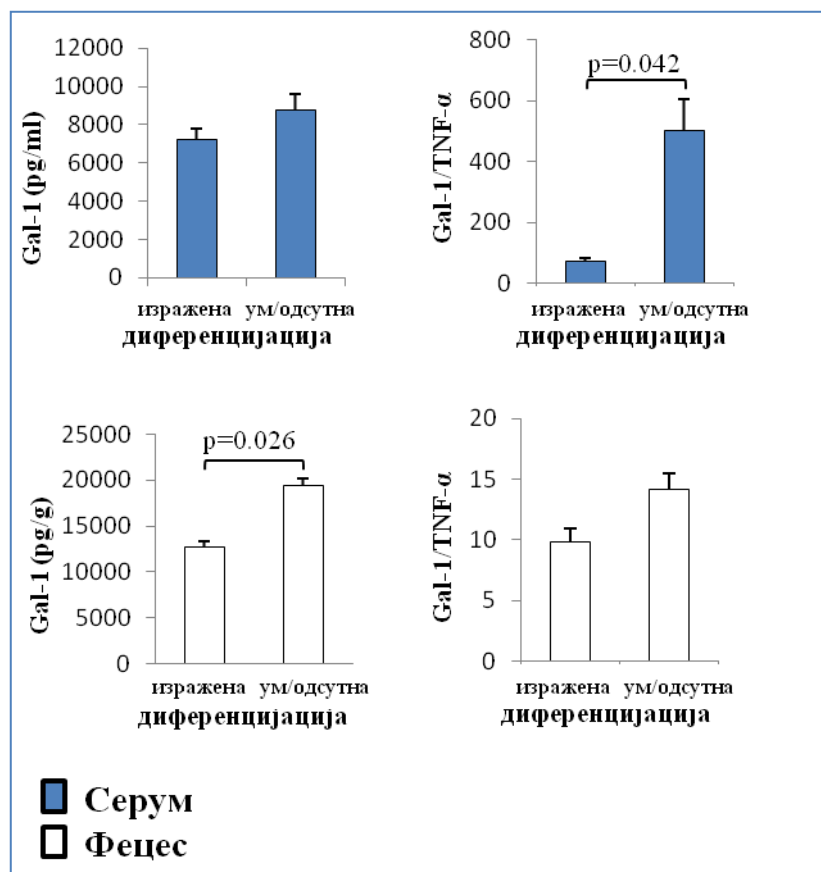
Анализа обухвата 60 испитаника са CRC-ом, који су подељени на две групе: Изражена диференцијација, умерена + одсутна диференцијација. Анализирани су односи фецесних концентрација испитиваних биомаркера и упоређене између дефинисаних група. Статистичка значајност је тестирана Mann-Whitney-евим тестом.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

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



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

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



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



**Серумске и фецесне вредности Gal-3, Gal-3/TNF- $\alpha$  и Gal-1/TNF- $\alpha$  корелирају са TNM стадијумом и инвазијом лимфних и крвних судова**

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

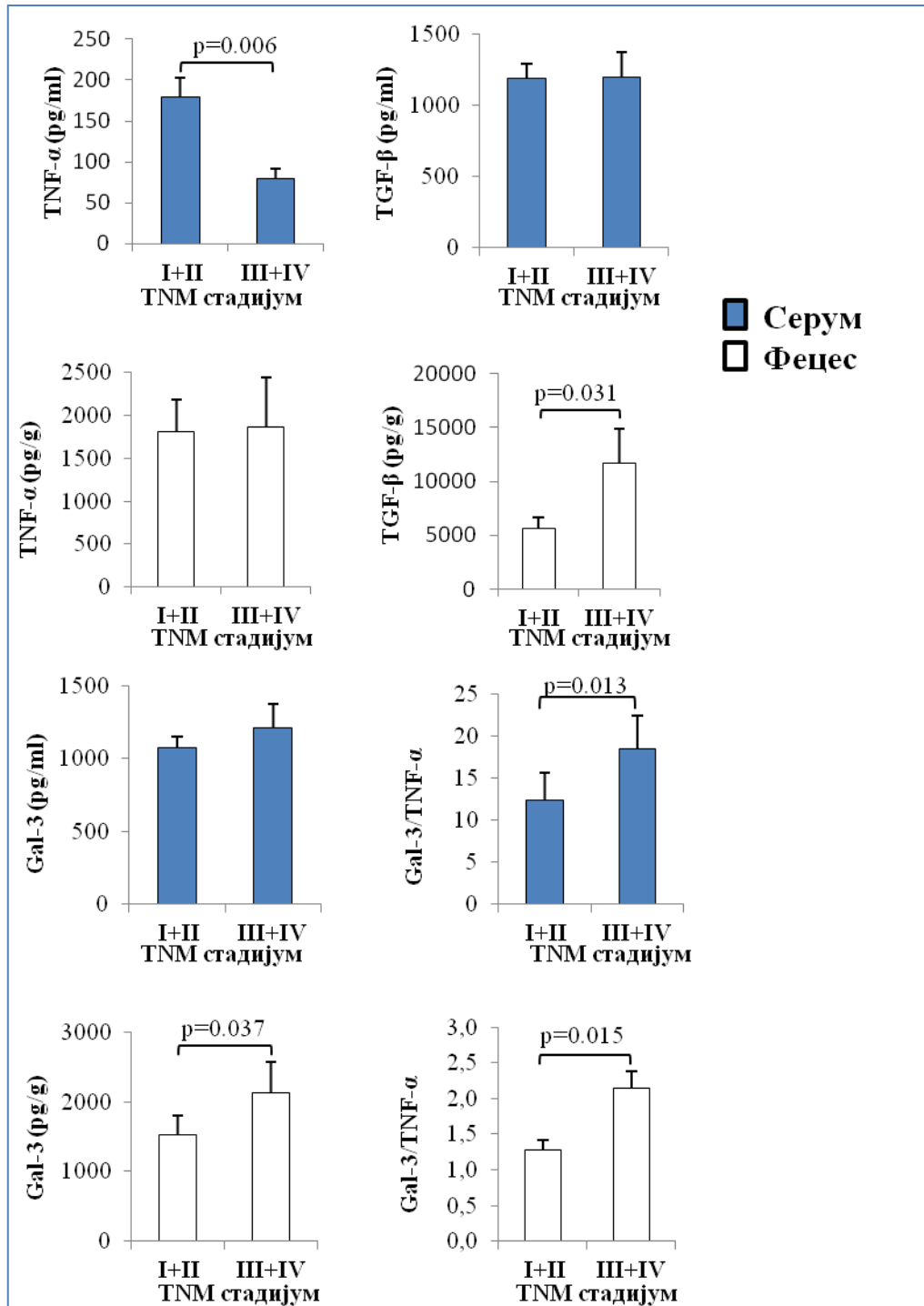
**Табела 13.** Односи концентрација испитиваних биомаркера у фецесу болесника са CRC-ом у односу на TNM стадијум тумора

Односи citoкина	TNM стадијум		p
	I + II	III + IV	
TGF- $\beta$ /IL-12	24,22 $\pm$ 34,67	27,49 $\pm$ 22,96	p>0.05
TGF- $\beta$ /TNF- $\alpha$	5,55 $\pm$ 6,81	10,64 $\pm$ 10,78	p>0.05
TGF- $\beta$ /IL-1 $\beta$	23,32 $\pm$ 32,65	25,24 $\pm$ 34,07	p>0.05
TGF- $\beta$ /IL-17	2,59 $\pm$ 2,61	2,83 $\pm$ 2,96	p>0.05
TGF- $\beta$ /IFN- $\gamma$	<b>4,09<math>\pm</math>3,66</b>	<b>7,20<math>\pm</math>5,42</b>	<b>p=0.04</b>
TNF- $\alpha$ /IL-10	77,59 $\pm$ 27,84	77,82 $\pm$ 33,16	p>0.05
IL-1 $\beta$ /IL-10	104,38 $\pm$ 148,45	100,68 $\pm$ 107,63	p>0.05
IFN- $\gamma$ /IL-10	99,46 $\pm$ 58,48	91,08 $\pm$ 36,11	p>0.05
IL-17/IL-10	25,16 $\pm$ 19,79	25,19 $\pm$ 9,96	p>0.05
sST2/IL-33	2,42 $\pm$ 1,56	2,23 $\pm$ 0,73	p>0.05

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

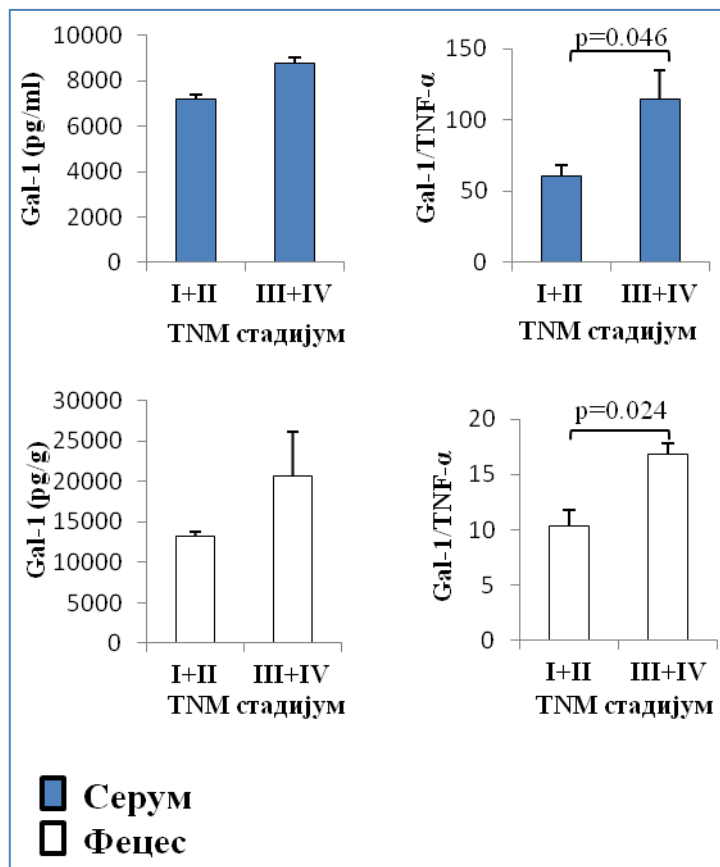
Пацијенти са TNM стадијумима III+IV су имали знатно нижи TNF- $\alpha$  у серуму у поређењу са пацијентима са TNM стадијумима I+II (p=0,006, Фигура 5). Није било разлика у серумском нивоу TGF- $\beta$  и Gal-3. Однос Gal-3/TNF- $\alpha$  био је већи у серуму пацијената са TNM стадијумима III+IV, али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

нивоу TNF- $\alpha$  између дефинисаних група. Приметили смо већи фекални ниво Gal-3 ( $p=0.037$ ), као и Gal-3/TNF- $\alpha$  однос ( $p=0.015$ ) код пацијената са TNM стадијумима III+IV.



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

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



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

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

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

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

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

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

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

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

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



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

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

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

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

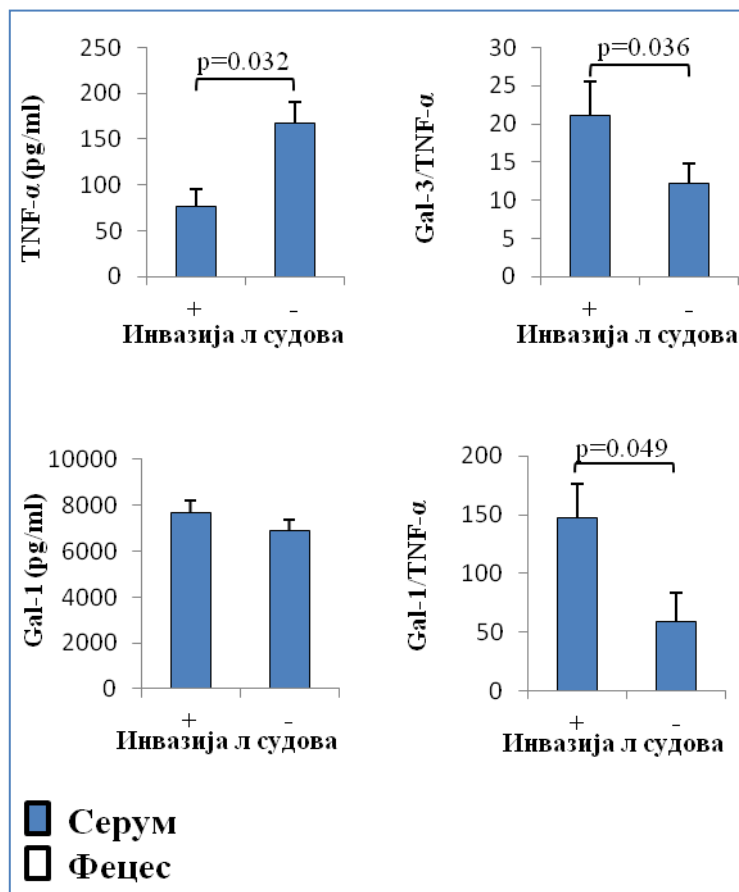
Анализом односа концентрација испитиваних биомаркера у фецесу болесника са CRC-ом у односу на инвазију лимфних судова, нисмо пронашли статистички значајну разлику концентрација наведених биомаркера у односу на инвазију лимфних судова.

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

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

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

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



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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Однос концентрација citoкина	Инвазија крвних судова		p
	+	-	
TGF- $\beta$ /IL-12	28,83 $\pm$ 19,11	27,88 $\pm$ 17,69	p>0.05
TGF- $\beta$ /TNF- $\alpha$	21,84 $\pm$ 13,21	14,96 $\pm$ 22,11	p>0.05
TGF- $\beta$ /IL-1 $\beta$	131,29 $\pm$ 73,55	139,12 $\pm$ 89,74	p>0.05
TGF- $\beta$ /IL-17	17,70 $\pm$ 7,91	16,04 $\pm$ 7,55	p>0.05
TGF- $\beta$ /IFN- $\gamma$	6,88 $\pm$ 4,43	9,58 $\pm$ 8,39	p>0.05
IL-10/TNF- $\alpha$	0,73 $\pm$ 1,32	1,87 $\pm$ 5,49	p>0.05
IL-10/IL-1 $\beta$	0,50 $\pm$ 0,18	0,43 $\pm$ 0,16	p>0.05
IFN- $\gamma$ /IL-10	43,55 $\pm$ 8,48	45,95 $\pm$ 18,65	p>0.05
IL-17/IL-10	<b>15,59<math>\pm</math>3,97</b>	<b>19,73<math>\pm</math>5,34</b>	<b>p=0.049</b>
sST2/IL-33	23,00 $\pm$ 16,77	15,95 $\pm$ 12,64	p>0.05

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

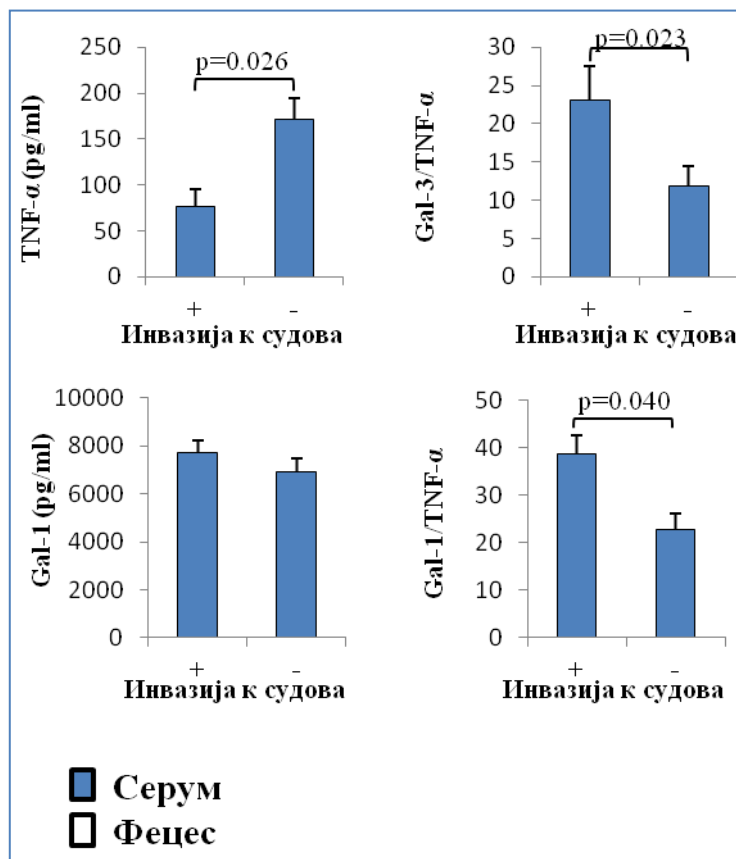
Анализом односа концентрација испитиваних биомаркера у фецесу болесника са CRC-ом у односу на инвазију крвних судова, нисмо пронашли статистички значајну разлику односа концентрација наведених биомаркера у односу на инвазију крвних судова (Табела 21).

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

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

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

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



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



***Присуство метастаза у јетри, плућима и перитонеалне карциноматозе прате веће вредности Gal-3 и односа Gal-1/TNF- $\alpha$***

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

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

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

Анализа обухвата 60 испитаника са CRC-ом, који су подељени на две групе: присутне метастазе у јетри (+), нема детектабилних метастаза у јетри (-). Анализиране су серумске концентрације испитиваних

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

биомаркера и упоређене између дефинисаних група. Статистичка значајност је тестирана Mann-Whitney-евим тестом. Вредности су приказане као средње вредности  $\pm$  стандардна девијација.

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

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

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

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

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

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

Однос концентрација цитокина	Метастазе у јетри		p
	+	-	
TGF- $\beta$ /IL-12	23,59 $\pm$ 11,34	27,98 $\pm$ 17,79	p>0.05
TGF- $\beta$ /TNF- $\alpha$	<b>80,61<math>\pm</math>116,94</b>	<b>15,22<math>\pm</math>20,34</b>	<b>p=0.004</b>
TGF- $\beta$ /IL-1 $\beta$	122,64 $\pm$ 59,50	135,96 $\pm$ 85,20	p>0.05
TGF- $\beta$ /IL-17	15,69 $\pm$ 7,40	16,17 $\pm$ 7,32	p>0.05
TGF- $\beta$ /IFN- $\gamma$	9,81 $\pm$ 6,73	9,70 $\pm$ 8,02	p>0.05
IL-10/TNF- $\alpha$	<b>0,48<math>\pm</math>0,99</b>	<b>1,59<math>\pm</math>4,95</b>	<b>p=0.015</b>
IL-10/IL-1 $\beta$	0,51 $\pm$ 0,13	0,44 $\pm$ 0,17	p>0.05
IFN- $\gamma$ /IL-10	32,77 $\pm$ 13,18	43,97 $\pm$ 18,44	p>0.05
IL-17/IL-10	16,41 $\pm$ 3,70	19,20 $\pm$ 5,11	p>0.05
sST2/IL-33	20,77 $\pm$ 17,48	16,76 $\pm$ 13,59	p>0.05

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

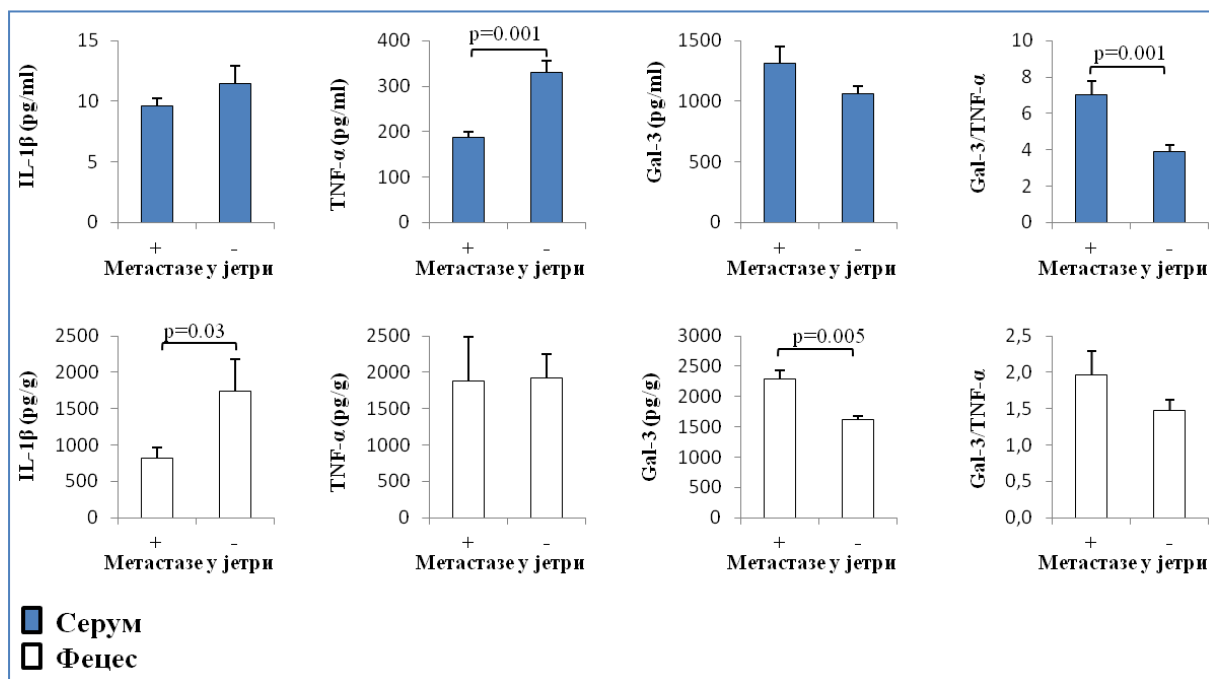
Анализом односа концентрација испитиваних биомаркера у фецесу болесника са CRC-ом у односу на присуство метастаза у јетри, нисмо пронашли статистички значајну разлику односа концентрација наведених биомаркера у односу на присуство метастаза у јетри.

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

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

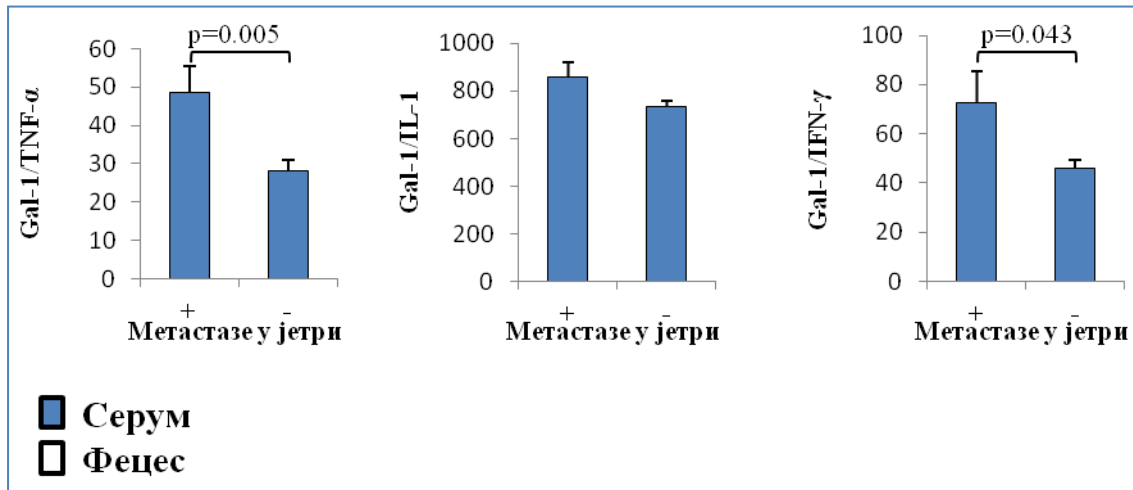
Анализа обухвата 60 испитаника са CRC-ом, који су подељени на две групе: присутне метастазе у јетри (+), нема детектабилних метастаза у јетри (-). Анализирани су односи фецесних концентрација испитиваних биомаркера и упоређене између дефинисаних група. Статистичка значајност је тестирана Mann-Whitney-евим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

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



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

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



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

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

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

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

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



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

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

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

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

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

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

Однос концентрација цитокина	Метастазе у плућима		p
	+	-	
TGF- $\beta$ /IL-12	21,04 $\pm$ 11,32	27,56 $\pm$ 16,97	p>0.05
TGF- $\beta$ /TNF- $\alpha$	<b>165,93<math>\pm</math>158,70</b>	<b>15,94<math>\pm</math>19,26</b>	<b>p=0.001</b>
TGF- $\beta$ /IL-1 $\beta$	109,85 $\pm$ 47,79	135,28 $\pm$ 82,54	p>0.05
TGF- $\beta$ /IL-17	15,01 $\pm$ 6,66	16,17 $\pm$ 7,48	p>0.05
TGF- $\beta$ /IFN- $\gamma$	12,38 $\pm$ 9,04	9,42 $\pm$ 7,61	p>0.05
IL-10/TNF- $\alpha$	<b>0,07<math>\pm</math>0,06</b>	<b>1,45<math>\pm</math>4,55</b>	<b>p=0.001</b>
IL-10/IL-1 $\beta$	0,43 $\pm$ 0,10	0,46 $\pm$ 0,17	p>0.05
IFN- $\gamma$ /IL-10	30,80 $\pm$ 18,14	42,37 $\pm$ 17,72	p>0.05
IL-17/IL-10	17,78 $\pm$ 3,48	18,58 $\pm$ 5,11	p>0.05
sST2/IL-33	14,17 $\pm$ 16,26	18,18 $\pm$ 14,76	p>0.05

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

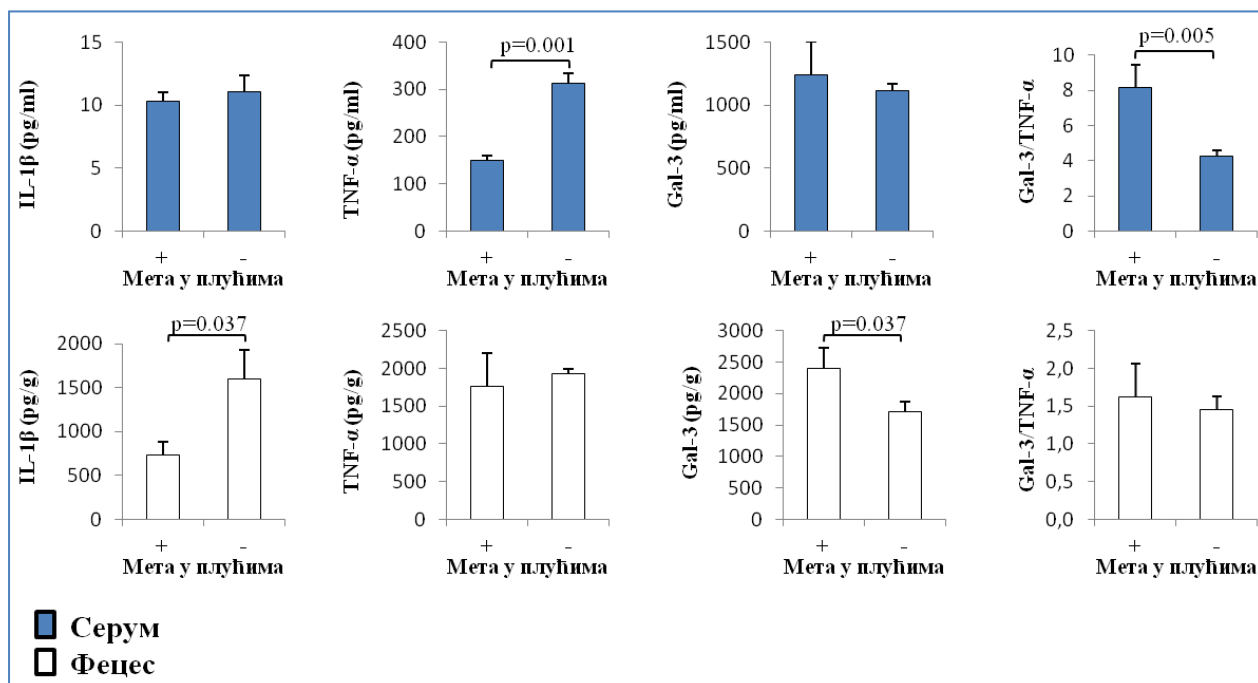
Анализом односа концентрација испитиваних биомаркера у фецесу болесника са CRC-ом у односу на присуство метастаза у плућима, однос концентрација TGF- $\beta$ /IL-12 је статистички значајно већи у групи болесника без присутних метастаза у плућима у односу на групу болесника са присутним метастазама у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

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

Однос концентрација citoкина	Метастазе у плућима		p
	+	-	
TGF- $\beta$ /IL-12	<b>7,22<math>\pm</math>4,33</b>	<b>23,91<math>\pm</math>30,35</b>	<b>p=0.025</b>
TGF- $\beta$ /TNF- $\alpha$	2,35 $\pm$ 2,23	6,96 $\pm$ 8,06	p>0.05
TGF- $\beta$ /IL-1 $\beta$	6,69 $\pm$ 3,01	24,03 $\pm$ 32,12	p>0.05
TGF- $\beta$ /IL-17	1,69 $\pm$ 0,91	1,43 $\pm$ 0,74	p>0.05
TGF- $\beta$ /IFN- $\gamma$	2,96 $\pm$ 1,32	4,83 $\pm$ 4,25	p>0.05
TNF- $\alpha$ /IL-10	106,57 $\pm$ 67,73	77,25 $\pm$ 28,81	p>0.05
IL-1 $\beta$ /IL-10	36,43 $\pm$ 38,39	97,86 $\pm$ 132,35	p>0.05
IFN- $\gamma$ /IL-10	64,69 $\pm$ 32,12	97,99 $\pm$ 52,29	p>0.05
IL-17/IL-10	19,98 $\pm$ 5,72	26,13 $\pm$ 17,50	p>0.05
sST2/IL-33	1,92 $\pm$ 0,70	2,34 $\pm$ 1,33	p>0.05

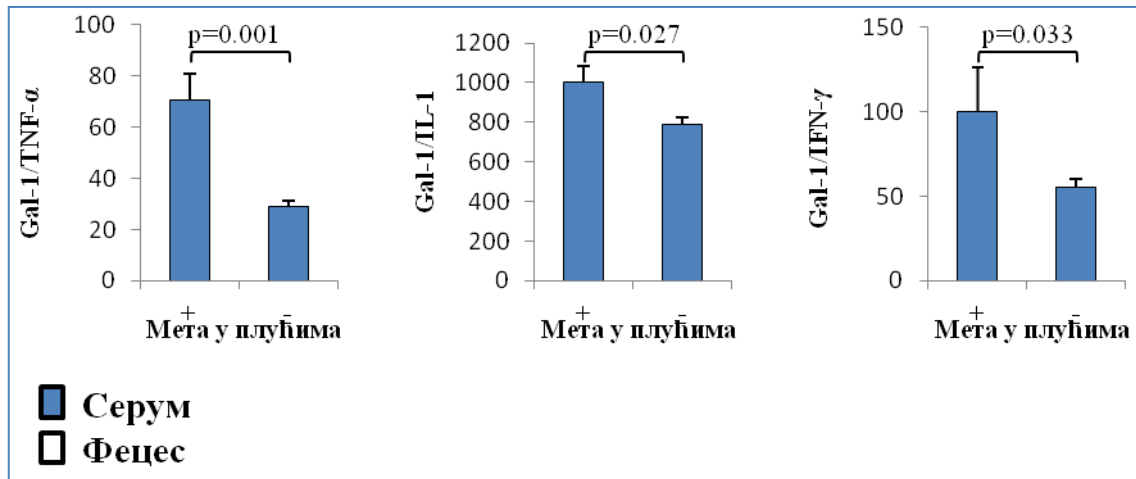
Анализа обухвата 60 испитаника са CRC-ом, који су подељени на две групе: присутне метастазе у плућима (+), нема детектабилних метастаза у плућима (-). Анализирани су односи фецесних концентрација испитиваних биомаркера и упоређене између дефинисаних група. Статистичка значајност је тестирана Mann-Whitney-евим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

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



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

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



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

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

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

Концентрација citoкина (pg/ml)	Карциноматоза		p
	+	-	
IL-17	76,54±6,97	72,85±13,42	p>0.05
IL-33	95,59±58,36	75,17±63,90	p>0.05
sST2	818,99±583,51	928,63±616,91	p>0.05
IL-4	605,64±75,23	690,87±122,41	p>0.05
IL-6	14,93±18,73	8,39±6,12	p>0.05
TGF- $\beta$	1207,29±488,54	1150,27±519,98	p>0.05
IFN- $\gamma$	<b>110,60±40,75</b>	<b>190,24±117,38</b>	<b>p=0.042</b>
IL-10	4,66±0,76	4,31±2,00	p>0.05
IL-12	131,78±24,80	130,14±34,44	p>0.05
IL-13	444,23±93,63	399,16±102,98	p>0.05

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

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

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

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

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

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

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

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

Однос концентрација citoкина	Карциноматоза		p
	+	-	
TGF- $\beta$ /IL-12	25,16 $\pm$ 11,80	27,18 $\pm$ 17,27	p>0.05
TGF- $\beta$ /TNF- $\alpha$	<b>71,04<math>\pm</math>96,17</b>	<b>24,83<math>\pm</math>60,99</b>	<b>p=0.012</b>
TGF- $\beta$ /IL-1 $\beta$	124,22 $\pm$ 55,72	134,07 $\pm$ 83,51	p>0.05
TGF- $\beta$ /IL-17	16,00 $\pm$ 6,69	16,06 $\pm$ 7,52	p>0.05
TGF- $\beta$ /IFN- $\gamma$	12,99 $\pm$ 7,36	9,17 $\pm$ 7,72	p>0.05
IL-10/TNF- $\alpha$	<b>0,21<math>\pm</math>0,21</b>	<b>1,50<math>\pm</math>4,66</b>	<b>p=0.033</b>
IL-10/IL-1 $\beta$	0,49 $\pm$ 0,14	0,45 $\pm$ 0,17	p>0.05
IFN- $\gamma$ /IL-10	<b>24,43<math>\pm</math>10,98</b>	<b>44,03<math>\pm</math>17,39</b>	<b>p=0.011</b>
IL-17/IL-10	16,92 $\pm$ 3,97	18,77 $\pm$ 5,08	p>0.05
sST2/IL-33	15,06 $\pm$ 16,83	18,22 $\pm$ 14,59	p>0.05

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



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

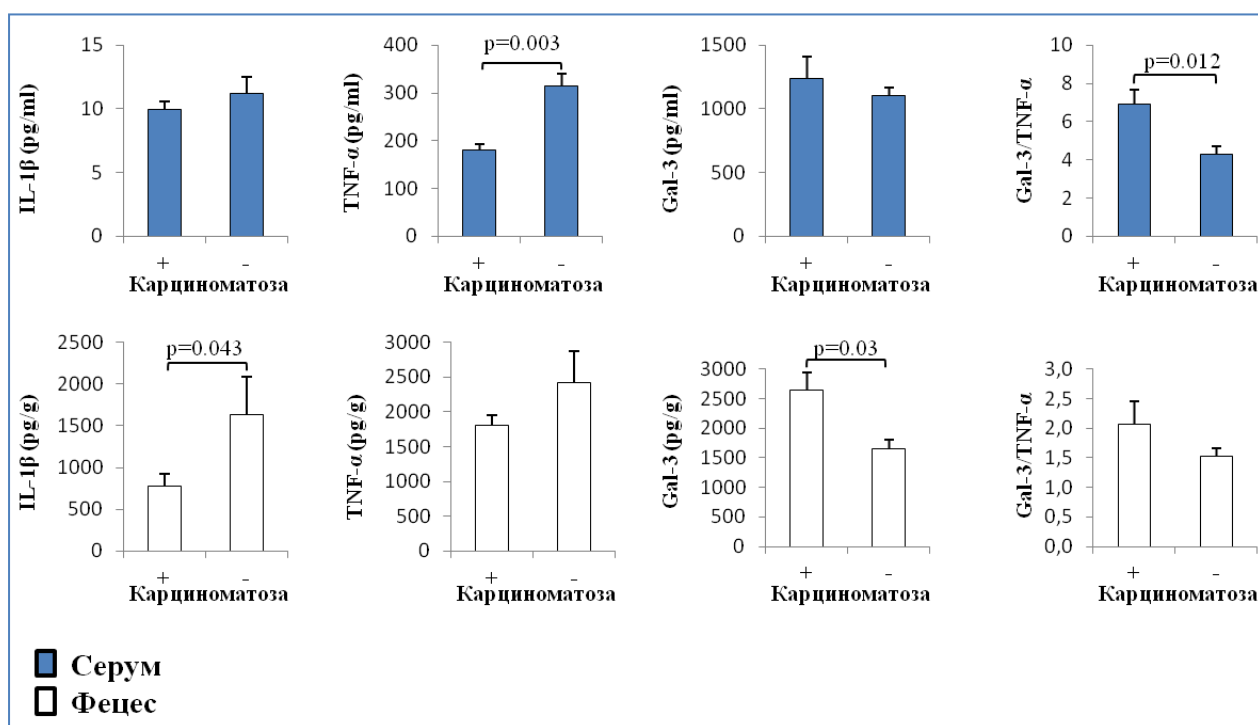
Анализом односа концентрација испитиваних биомаркера у фецесу болесника са CRC-ом у односу на присуство карциноматозе перитонеуманисмо пронашли статистички значајну разликуодноса концентрација наведених биомаркера у односу на присуство карциноматозе перитонеума (Табела 33).

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

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

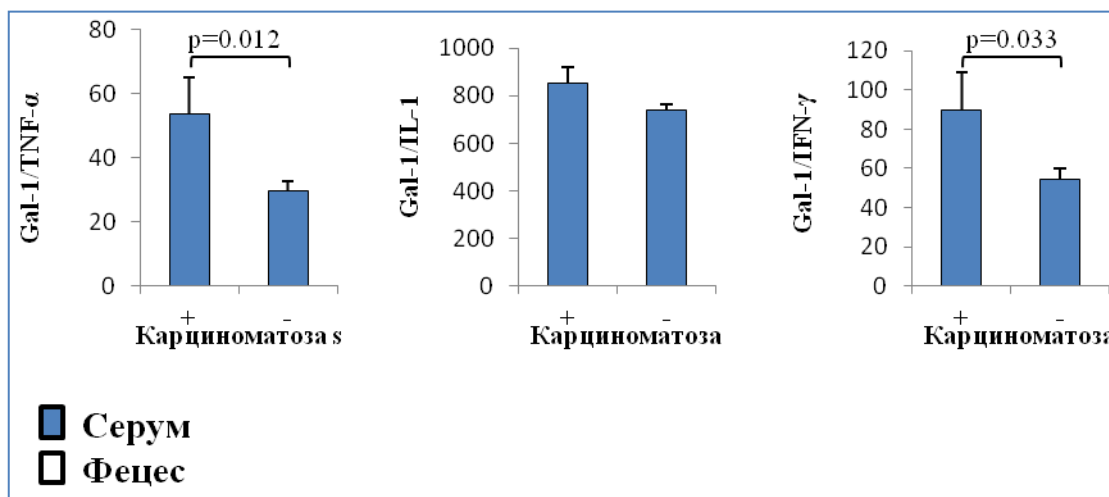
Анализа обухвата 60 испитаника са CRC-ом, који су подељени на две групе: присутна карциноматоза (+), нема детектабилне карциноматозе (-).Анализирани су односи фецесних концентрација испитиваних биомаркера и упоређене између дефинисаних група.Статистичка значајност је тестирана Mann-Whitney-евим тестом.Вредности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

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



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

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



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

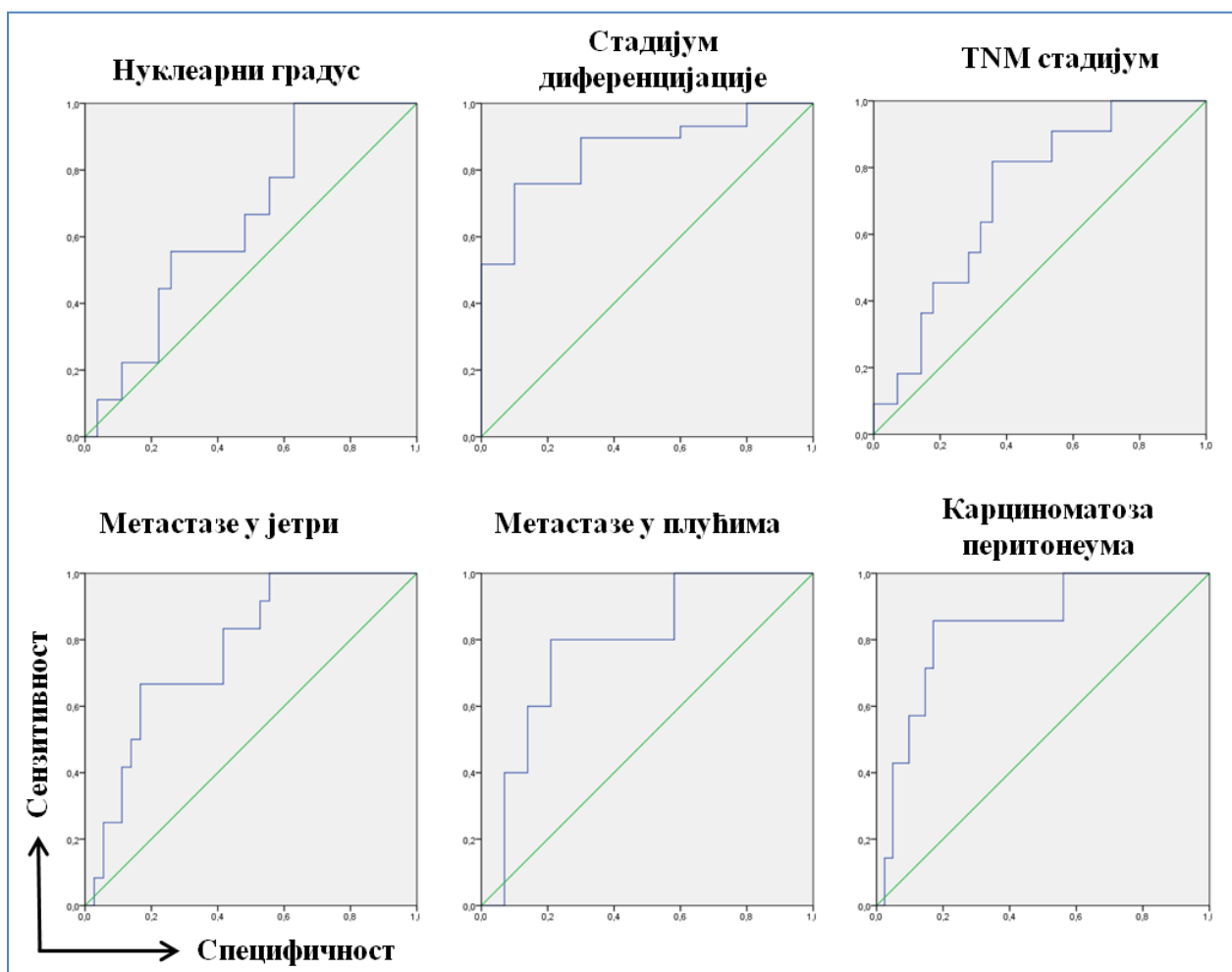
### ***Фецесне вредности Gal-3 и Gal-1 значајно корелирају са параметрима тежине болести***

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

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

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

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



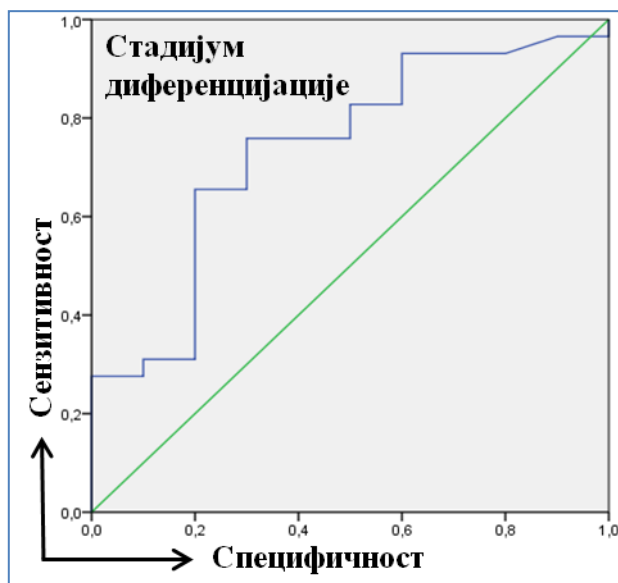
**Фигура 15.** Специфичност и сензитивност фекалног Gal-3. ROC криве илуструју специфичност и сензитивност фекалног Gal-3 у односу на нуклеарни градус, хистолошки тип туморског ткива (добро/умерено и лоше диференцирано), TNM стадијум (I+II vs. III+IV), присуство метастаза у јетри (+ vs. -), метастаза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

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

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

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

Варијабле	фецесни Gal-1	
	<i>Spearman's rho</i>	<i>p</i>
Диференцијација	0,357	0.025
AFP	0,317	0.028
СЕА	0,230	0.115
СА 19-9	0,296	0.049



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

## 5. ДИСКУСИЈА

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

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

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



Тежина болести зависи од цитокинског миљеа који је најзаступљенији у окружењу тумора. Претходне студије утврдиле су да присуство  $CD4^+Th1$  лимфоцита и цитотоксичких  $CD8^+$   $T$  лимфоцита у туморској микросредини представља позитиван прогностички знак, док присуство  $Treg$  и  $Th2/Th17$  лимфоцита указује на смањено преживљавање пацијената са колоректалним карциномом (117, 118). Преминација проинфламацијских  $Th1$  лимфоцита који продукују  $TNF-\alpha/IFN-\gamma$ , осим што повећавају активност цитотоксичких ћелија, такође олакшавају урођене анти-туморске механизме и доводе се у везу са одсуством метастатске инвазије, рецидива и повећаним преживљавањем пацијената са колоректалним карциномом (119-121). Напротив, поларизација ка  $Th2$  лимфоцитима и продукцији  $IL-4$ ,  $IL-10$  и  $IL-13$  олакшава развој локалног хуморалног имунског одговора и супресију  $Th1$  имунског одговора (118). У складу са овим феноменом, претходне студије су показале да болесници са карциномом мокраћне бешике и колоректалним карциномом имају смањен проценат  $Th1$  лимфоцита које продукују  $IFN-\gamma/IL-2$ , док имају повећан проценат  $Th2$  лимфоцита које продукују  $IL-4/IL-10$  у периферној циркулацији (122,123).

Присуство имunosупресивних урођених/стечених ћелија које луче  $TGF-\beta/IL-10$  корелира са узнапредовањем болешћу и лошом прогнозом (117). У овој студији анализирали смо про и антиинфламацијске цитокине у серуму и фецесу пацијената са колоректалним карциномом. Системске вредности проинфламацијског цитокина  $TNF-\alpha$  биле су значајно ниже код пацијената са тежом болешћу (TNM стадијум III и IV, лоша хистолошка диференцијација, нуклеарни градус III) (Фигуре 1-6). Штавише, системски  $TNF-\alpha$  био је значајно нижи код пацијената са прогресивнијом болешћу (инвазија лимфних и крвних судова, присуство метастаза у јетри, плућима, перитонеална карциноматоза (Фигуре 7-12). Локалне вредности цитокина у течној фракцији фецеса показале су преминацију анти-инфламацијских цитокина  $TGF-\beta$  и  $IL-10$  код пацијената са тежим стадијумом колоректалног карцинома (TNM стадијум III и IV, лоша хистолошка диференцијација) као и нижи ниво проинфламацијског  $IL-1\beta$  код испитаника са већом прогресијом болести, присуством метастаза у јетри, плућима, перитонеалном карциноматозом (Фигуре 7-12). Ови резултати су у складу са нашим и другим претходним студијама тврдећи да су серумске концентрације  $IL-10$  и  $TGF-\beta$  повећане код пацијената са колоректалним карциномом у поређењу са здравом контролном групом и да ови пацијенти са лошијом прогнозом имају повећану

системску концентрацију IL-10 у поређењу са пацијентима са бољом прогнозом (124,125).

Познато је да Gal-3 игра битну улогу у различитим биолошким и патолошким процесима, као што су ћелијски раст и диференцијација, интеракције целуларног и екстрацелуларног матрикса, метастазе, регулација апоптозе (126,127). Раније студије су истраживале могућу повезаност Gal-3 и колоректалног карцинома. Имунохистохемијским бојењем потврђено је да су колоректални карциноми са експресијом Gal-3 значајно већи, са дубљом инвазијом зида колоне и лошијом хистолошком диференцијацијом (128,129). Друге су показале да појачана експресија Gal-3 колерира са прогресијом тумора и представља предиктор краћег преживљавања пацијената са колоректалним карциномом (130). На супрот томе, неке студије су показале смањену експресију Gal-3 код прогресије колоректалног карцинома и да није било значајне корелације између Gal-3 и стадијума колоректалног карцинома (131,132). Ови налази указују на значај екстрацелуларног Gal-3 у биологији колоректалног карцинома.

Недавне студије наглашавају значајност мерења биомаркера у фецесу (133,134). На овај начин, протеини и молекули који се стварају у интестиналној мукози могу бити мерени и најбоље осликати стање унутар црева (135). Недавна студија показала је повишене фекалне вредности M2 пируват киназе, фекалног калпротектина и *iFOBT* код колоректалног карцинома и наведени маркери су предложени за скрининг високоризичне групе пацијената за ову болест (136). Данас, истраживачи тестирају дијагностичку прецизност различитих фекалних маркера у откривању канцерогених лезија у дебелом цреву, како би се пронашли најтачнији за скрининг на колоректални карцином. Према нашим сазнањима, ово је прва студија која тестира фекални Gal-3 као маркер за детекцију тешких и прогресивних облика колоректалног карцинома. Ми нисмо пронашли разлике у системском нивоу Gal-3 између различитих фаза колоректалног карцинома. Међутим, знатно повећан фекални ниво Gal-3 је детектован код пацијената са тежим стадијумом болести (лоша хистолошка диференцијација, већи нуклеарни градус и TNM стадијуми III и IV; Фигуре 1-6). Штавише, фекални Gal-3 је значајно повећан код пацијената са инвазијом лимфних и крвних судова и присуством метастаза у јетри, плућима или перитонеалном карциноматозом (Фигуре 7-14).

Као што је добро познато, контрарегулаторни цитокини су поуздан маркер болести, и ми смо анализирали однос Gal-3 и про и антиинфламацијских цитокина. Није било разлике у односу Gal-3 и TGF- $\beta$ , IL-10 и IL-1 $\beta$ . Међутим, приметили смо преминацију Gal-3 над проинфламацијским цитокином TNF- $\alpha$  у серуму и фецесу код пацијената са тежим и прогресивним стадијумом колоректалног карцинома (Фигуре 1, 3, 5). На основу ових налаза, верујемо да Gal-3/TNF- $\alpha$  однос може бити предиктор за унапредовали стадијум колоректалног карцинома. Постоји неколико могућих механизма који могу да објасне потенцијалну улогу Gal-3 у прогресији колоректалног карцинома. Прво, Gal-3 може деловати директно антиинфламаторно. Улога Gal-3 у почетку, прогресији и смањењу инфламације је добро утврђена (137). Познато је да се током запаљења, реактивне врсте кисеоника и друге токсичне супстанце акумулирају у ћелији и индукују продукцију AGEs (138). Надаље, AGEs се везује за рецептор RAGE како би олакшао локалну инфламацију (139). Gal-3 инхибира AGE-RAGE сигнални пут и потом супримира RAGE-индуковану инфламацију у ткиву (140). Други могући механизам деловања Gal-3 је директна инхибиција ћелијског имунског одговора, инхибицијом интеракције Т лимфоцита и антиген презентујућих ћелија (141). Друге студије показују да екстрацелуларни галектин-3 индукује апоптозу CD4 или CD8 Т лимфоцита у туморима и да то супримира секрецију IFN- $\gamma$  у цитотоксичких Т лимфоцита у тумору (142). Ми смо први описали преминацију Gal-3 над TNF- $\alpha$  у столици пацијената са тешким и прогресивним облицима колоректалног карцинома (Фигуре 1, 3, 5, 7).

Поред ових улога у имуномодулацији, Gal-3 може да олакша миграцију ћелија рака дебелог црева помоћу *K-Ras-Raf-Erk1/2* сигнализације (143). Gal-3 може индуковати груписање интегрина, изазивајући ћелијску покретљивост, док везивање за муцин-1, молекула који доминира у гастроинтестиналном окружењу, олакшава трансендотелну инвазију (144). Даље у овој студији смо претпоставили могућу улогу фекалног галектина-3 као биомаркера у предикцији тежине болести и прогресије. Добили смо позитивну корелацију између фекалног Gal-3 и тежине болести (унапредовали TNM стадијум, виши нуклеарни градус, лоша туморска диференцијација; Табела 34 и Фигура 15). Штавише, фекални ниво Gal-3 је у позитивној корелацији са прогресивнијим стадијумом колоректалног карцинома (метастазе у јетри и плућима, перитонеална карциноматоза; Фигура 15). Такође смо показали јаку корелацију између фекалног Gal-

3 и биомаркера AFP и CEA (Табела 34). Занимљиво је да нисмо нашли корелацију између серумског Gal-3 са истим параметрима и маркерима тежине болести. Такође, вредности Gal-3 у фецесу су око два до три пута веће него у серуму, што чини мерења у фецесу много сензитивнијом методом. Код колоректалног карцинома, AFP и CEA су коришћени као поуздани маркери за праћење прогресије тумора. Недавне студије су показале да Gal-3 интерагује са CEA поспешујући миграцију туморских ћелија, адхезију и касније метастазирање (145, 146). Анализирањем ROC кривуље Gal-3 и параметара и маркера болести за колоректални карцином показују да би Gal-3 могао бити предиктор узнапредовалог TNM стадијума, већег нуклеарног градуса и лошије диференцијације тумора као и присуства метастаза у плућима или јетри или перитонеалне карциноматозе, са добром специфичношћу и сензитивношћу. Према нашим резултатима, фекални Gal-3 може бити користан маркер за тежину колоректалног карцинома и прогресију.

Повећане локалне вредности Gal-3, које се огледају кроз већу фекалну концентрацију, код пацијената са CRC са већим нуклеарним градусом, лошом диференцијацијом туморског ткива и напредним TNM стадијумом болести, може се сматрати знаком малигног прогреса тумора и, с тога, лоше прогнозе за пацијенте. Преминација Gal-3 у односу на проинфламацијски цитокин TNF- $\alpha$ , код испитаника са напредном и прогресивном болешћу, може указати на имуномодулаторну улогу Gal-3 у ограничавању континуираних проинфламацијских процеса и спречавању снажног антитуморског имунског одговора. Овај феномен фаворизује избегавање потентног антитуморског имунског одговора и дисеминацију туморских ћелија (метастазе). Штавише, фекалне вредности Gal-3 могу се користити као значајан маркер за тежину и прогресију CRC-а. Ови налази указују да Gal-3 може допринети имунолошкој привилегији тумора модулацијом локалног имунског одговора и указују на могућу улогу фекалног Gal-3 као маркера прогресије CRC-а и његову потенцијалну употребу као терапеутску мету.

Биолошка улога Gal-1 је добро позната у пролиферацији туморских ћелија, инвазији, апоптози, метастази, имуносупресији и ангиогенези тумора (88-95). У корелацији је са лошом прогнозом и метастатским фенотипом (91,92). Галектин-1 након секреције делује како интрацелуларно, тако и екстрацелуларно (96). Излучен Gal-1 може интераговати са протеинима на ћелијској површини као што су фибронектин, интегрин, ламинин и *VEGFR2*, и потом утицати на пролиферацију, адхезију, миграцију и ангиогенезу (97,98). Ови налази истичу важност екстрацелуларног Gal-1 у биологији тумора. У овој студији смо анализирали системски и фекални ниво Gal-1 и његов однос са неколико проинфламацијских цитокина, у различитим фазама колоректалног карцинома. Нашли смо повећану концентрацију Gal-1 у столицама пацијената са колоректалним карциномом већег нуклеарног градуса (III насупрот II и III насупрот I) и лошом диференцијацијом тумора (Фигуре 2 и 4).

Претходне студије су показале да је Gal-1 као протеин обично повишен у серуму пацијената са туморима (99-101). Такође, серумске вредности Gal-1 су значајно повећане код пацијената са метастатском болешћу у поређењу са пацијентима са локализованим туморима (102). Нисмо пронашли да је средња вредност серумске концентрације Gal-1 значајно другачија код облећих у односу на патохистолошке карактеристике тумора, док је фекална концентрација Gal-1 показала значајно измењена у односу на патохистолошке карактеристике (Фигуре 2, 4 и 6). Заиста, у недавним студијама, фецес се користио као узорак за тестирање различитих биомаркера (103,104). На пример, фекални калпротектин (FK), биомаркер интестиналне инфламације који је у клиничкој употреби већ годинама (103-105), такође је повишен код пацијената са колоректалним карциномом и предлаже се као скрининг код ризичних група за колоректални карцином (106). Према доступној литератури, ово је прва студија која тестира и фекални Gal-1 (поред Gal-3) за детекцију унапредовалих и прогресивних облика колоректалног карцинома.

Како је однос контрарегулаторних цитокина поуздан маркер прогресије болести (107), анализирали смо однос Gal-1 и проинфламацијских цитокина и показали

предоминацију Gal-1 над проинфламацијским цитокинима TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  и IFN- $\gamma$  код пацијената са прогресивним колоректалним карциномом. Однос Gal-1 и TNF- $\alpha$  у серуму и фецесу је значајно већи код пацијената са напредним TNM стадијумом (III+IV), као и детектабилном инвазијом лимфних и крвних судова (Фигуре 6, 7 и 8). У складу са овим налазима, повећан однос Gal-1/TNF- $\alpha$  и Gal-1/IFN- $\gamma$  детектован је у серуму пацијената са метастатским промената у плућима или јетри или са перитонеалном карциноматозом, док је повећан однос Gal-1/IL-1 детектован само у серуму пацијената са метастатским променама у плућима (Фигуре 10, 12 и 14). На основу ових налаза, верујемо да однос Gal-1/TNF- $\alpha$  може бити предиктор напредног стадијума колоректалног карцинома.

Улога Gal-1 у настанку, прогресији и смањењу инфламације је добро утврђена (108). Раније студије су откриле да Gal-1 инхибира раст ћелија и индукује апоптозу активираних имунских ћелија (109,110). Показано је да Gal-1 преусмерава баланс према типу 2 имунског одговора, истовремено инхибирајући продукцију IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-2 и IL-12 и олакшавајући секрецију IL-5 *in vitro* и *in vivo* (111-113). Неке студије сугеришу да Gal-1 може инхибирати Т-ћелијску ефекторску функцију или индуковати смрт тумор инфилтришућих леукоцита и накнадно супримирати јак имуни одговор изазван проинфламацијским цитокинима (112, 114-116). Ми смо први описали предоминацију Gal-1 над TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  и IFN- $\gamma$  у столици пацијената са тешким и прогресивним облицима колоректалног карцинома (Фигуре 6, 7, 8, 10, 12 и 14).

У складу са нашим налазима *Camby* и сарадници (116) закључили су да ћелије тумора могу умањити Т-ћелијску ефекторску функцију секрецијом Gal-1, који фаворизује настанак имunosупресивног окружења на месту тумора.

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

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

результатима, фекални Gal-1 може бити користан маркер за тежину колоректалног карцинома.

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

## 6. ЗАКЉУЧЦИ

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

Закључак је изведен на основу следећих доказа:

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



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

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

## 7. СКРАЋЕНИЦЕ

<b>AFP</b>	(енгл. <i>Alpha-fetoprotein</i> )
<b>APC</b>	Антиген презентујућа ћелија
<b>CA19-9</b>	(енгл. <i>Cancer antigen 19-9</i> )
<b>CEA</b>	(енгл. <i>Carcino-embryonic antigen</i> )
<b>CTL</b>	Цитотоксички Т лимфоцити (енгл. <i>Cytotoxic T Lymphocytes</i> )
<b>DCs</b>	Дендритске ћелије
<b>DNA</b>	(енгл. <i>Deoxyribonucleic acid</i> )
<b>ELISA</b>	(енгл. <i>EnzymeLinkedImmunoSorbentAssay</i> )
<b>IL</b>	Интерлеукин (енгл. <i>Interleukin</i> )
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	Интерферон гама (енгл. <i>Interferon-gama</i> )
<b>MTP</b>	(енгл. <i>Microtiter plate</i> )
<b>NK ћелије</b>	Урођене убилачке ћелије (енгл. <i>Natural Killer cells</i> )
<b>RNK</b>	Рибонуклеинска киселина
<b>ROS</b>	(енгл. <i>Reactive Oxygen Species</i> )
<b>Th ћелије</b>	Помагачки Т лимфоцити (енгл. <i>T helper cells</i> )
<b>TLR</b>	(енгл. <i>Toll like receptor</i> )
<b>Treg</b>	Регулаторни Т лимфоцити
<b>TNF</b>	Фактор некрозе тумора (енгл. <i>Tumor necrosis factor</i> )
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Трансформишући фактор раста бета (енгл. <i>Transforming growth factor <math>\beta</math></i> )

## 8. РЕФЕРЕНЦЕ

1. Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2013. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2013;63(1):11–30.
2. Connell W. PRO: Endoscopic surveillance minimizes the risk of cancer. *The American journal of gastroenterology*. 2004;99(9):1631–3.
3. De la Chapelle A. Genetic predisposition to colorectal cancer. *Nat Rev Cancer* (2004) 4:769–80.
4. Vasovcak P, Pavlikova K, Sedlacek Z, Skapa P, Kouda M, Hoch J, et al. Molecular genetic analysis of 103 sporadic colorectal tumours in Czech patients. *PLoSOne* (2011) 6:e24114.10.1371/journal.pone.0024114
5. Deschoolmeester V, Baay M, Specenier P, Lardon F, Vermorken JB. A review of the most promising biomarkers in colorectal cancer: one step closer to targeted therapy. *Oncologist* 2010; 15: 699-731.
6. Jass JR, Whitehall VL, Young J, Leggett BA. Emerging concepts in colorectal neoplasia. *Gastroenterology* 2002; 123: 862-76.
7. Perea J, Lomas M, Hidalgo M. Molecular basis of colorectal cancer: Towards an individualized management? *Rev Esp Enferm Dig* 2011; 103: 29-35.
8. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990; 61: 759.
9. Worthley DL, Leggett BA. Colorectal cancer: Molecular features and clinical opportunities. *Clin Biochem Rev* 2010; 31: 31-8.
10. Markowitz SD, Bertagnolli MM. Molecular Basis of Colorectal Cancer. *N Engl J Med* 2009; 361: 2449-2460.
11. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Cellular and molecular immunology. Seventh edition, Elsevier 2012; 225-243.
12. Fort MM, Cheung J, Yen D, Li J, Zurawski SM, Lo S, Menon S, Clifford T, Hunte B, Lesley R, Muchamuel T, Hurst SD, Zurawski G, Leach MW, Gorman DM, Rennick DM. IL-25 induces IL-4, IL-5, and IL-13 and Th2-associated pathologies in vivo. *Immunity* 2001; 15: 985-95.

13. Müller H and Schwarz MJ. Immune System and Schizophrenia. *Curr Immunol Rev* 2010; 6: 213–220.
14. Tzartos JS, Friese MA, Craner MJ, Palace J, Newcombe J, Esiri MM, Fugger L. Interleukin-17 production in central nervous system-infiltrating T cells and glial cells is associated with active disease in multiple sclerosis. *Am J Pathol* 2008; 172: 146-55.
15. Steinman L. A brief history of T(H)17, the first major revision in the T(H)1/T(H)2 hypothesis of T cell-mediated tissue damage. *Nat Med* 2007;13: 139-45.
16. Zhu X, Mulcahy LA, Mohammed RA, Lee AH, Franks HA, Kilpatrick L, Yilmazer A, Paish EC, Ellis IO, Patel PM, Jackson AM. IL-17 expression by breast-cancer-associated macrophages: IL-17 promotes invasiveness of breast cancer cell lines. *Breast Cancer Res* 2008; 10: 95.
17. Fujino S, Andoh A, Bamba S, Ogawa A, Hata K, Araki Y, Bamba T, Fujiyama Y. Increased expression of interleukin 17 in inflammatory bowel disease. *Gut* 2003; 52: 65-70.
18. Yen D, Cheung J, Scheerens H et al. IL-23 is essential for T cell-mediated colitis and promotes inflammation via IL-17 and IL-6. *J Clin Invest* 2006; 116: 1310-1316.
19. Chabaud M, Garnero P, Dayer JM, Guerne PA, Fossiez F, Miossec P. Contribution of interleukin 17 to synovium matrix destruction in rheumatoid arthritis. *Cytokine* 2000; 12: 1092-1099.
20. Miossec P, Korn T, Kuchroo V. Interleukin-17 and type 17 helper T cells. *N Engl J Med* 2009; 361: 888–898.
21. Korn T, Bettelli E, Gao W, Awasthi A, Jäger A, Strom TB, Oukka M, Kuchroo VK. IL-21 initiates an alternative pathway to induce proinflammatory TH17 cells. *Nature* 2007; 448: 484-487.
22. Elaraj DM, Weinreich DM, Varghese S, Puhlmann M, Hewitt SM, Carroll NM, et al. The role of interleukin 1 in growth and metastasis of human cancer xenografts. *Clin Cancer Res* (2006) 12:1088–96.10.1158/1078-0432.CCR-05-1603
23. Viet HT, Wagsater D, Hugander A, Dimberg J. Interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphism in human colorectal cancer. *Oncol Rep* (2005) 14:915–8.10.3892/or.14.4.915
24. Marszałek A, Szyłberg L, Wisniewska E, Janiczek M. Impact of COX-2, IL-1beta, TNF-alpha, IL-4 and IL-10 on the process of carcinogenesis in the large bowel. *Pol J Pathol* (2012) 63:221–7.10.5114/pjp.2012.32768

25. Kantola T, Klintrup K, Vayrynen JP, Vornanen J, Bloigu R, Karhu T, et al. Stage-dependent alterations of the serum cytokine pattern in colorectal carcinoma. *Br J Cancer* (2012) 107:1729–36.10.1038/bjc.2012.456
26. Waldner MJ, Foersch S, Neurath MF. Interleukin-6 – a key regulator of colorectal cancer development. *Int J Biol Sci* (2012) 8:1248–53.10.7150/ijbs.4614
27. Komoda H, Tanaka Y, Honda M, Matsuo Y, Hazama K, Takao T. Interleukin-6 levels in colorectal cancer tissues. *World J Surg* (1998) 22:895–8.10.1007/s002689900489
28. Maihofner C, Charalambous MP, Bhambra U, Lightfoot T, Geisslinger G, Gooderham NJ, et al. Expression of cyclooxygenase-2 parallels expression of interleukin-1beta, interleukin-6 and NF-kappaB in human colorectal cancer. *Carcinogenesis*
29. Chung YC, Chang YF. Serum interleukin-6 levels reflect the disease status of colorectal cancer. *J Surg Oncol* (2003) 83:222–6.
30. Belluco C, Nitti D, Frantz M, Toppan P, Basso D, Plebani M, et al. Interleukin-6 blood level is associated with circulating carcinoembryonic antigen and prognosis in patients with colorectal cancer. *Ann Surg Oncol* (2000) 7:133–8.
31. Heits F, Stahl M, Ludwig D, Stange EF, Jelkmann W. Elevated serum thrombopoietin and interleukin-6 concentrations in thrombocytosis associated with inflammatory bowel disease. *J Interferon Cytokine Res* (1999) 19:757–60.
32. Atreya R, Mudter J, Finotto S, Mullberg J, Jostock T, Wirtz S, et al. Blockade of interleukin 6 trans signaling suppresses T-cell resistance against apoptosis in chronic intestinal inflammation: evidence in crohn disease and experimental colitis in vivo. *Nat Med* (2000) 6:583–8.
33. Asfaha S, Dubeykovskiy AN, Tomita H, Yang X, Stokes S, Shibata W, et al. Mice that express human interleukin-8 have increased mobilization of immature myeloid cells, which exacerbates inflammation and accelerates colon carcinogenesis. *Gastroenterology* (2013) 144:155–66.
34. Lurje G, Zhang W, Schultheis AM, Yang D, Groshen S, Hendifar AE, et al. Polymorphisms in VEGF and IL-8 predict tumor recurrence in stage III colon cancer. *Ann Oncol* (2008) 19:1734–41.
35. Lv X, Wang X. The role of interleukin-9 in lymphoma. *Leuk Lymphoma* (2013) 54:1367–72.10.3109/10428194.2012.745072

36. Purwar R, Schlapbach C, Xiao S, Kang HS, Elyaman W, Jiang X, et al. Robust tumor immunity to melanoma mediated by interleukin-9-producing T cells. *Nat Med* (2012) 18:1248–53.10.1038/nm.2856
37. Fang Y, Chen X, Bai Q, Qin C, Mohamud AO, Zhu Z, et al. IL-9 inhibits HTB-72 melanoma cell growth through upregulation of p21 and TRAIL. *J Surg Oncol* (2015) 111:969–74.10.1002/jso.23930
38. Huang Y, Cao Y, Zhang S, Gao F. Association between low expression levels of interleukin-9 and colon cancer progression. *Exp Ther Med* (2015) 10:942–6.10.3892/etm.2015.2588
39. Kim HJ, Jeon HK, Cho YJ, Park YA, Choi JJ, Do IG, et al. High galectin-1 expression correlates with poor prognosis and is involved in epithelial ovarian cancer proliferation and invasion. *Eur J Cancer*. 2012; 48:1914-21
40. Zhang P, Zhang P, Shi B, Zhou M, Jiang H, Zhang H, et al. galectin-1 overexpression promotes progression and chemoresistance to cisplatin in epithelial ovarian cancer. *Cell Death Dis*. 2014; 5: e991
41. Ouyang J, Plütschow A, Pogge von Strandmann E, Reiners KS, Ponader S, Rabinovich GA, et al. Galectin-1 serum levels reflect tumor burden and adverse clinical features in classical Hodgkin lymphoma. *Blood*. 2013; 121: 3431-3
42. Chen L, Yao Y, Sun L, Zhou J, Liu J, Wang J, et al. Clinical implication of the serum galectin-1 expression in epithelial ovarian cancer patients. *J Ovarian Res*. 2015; 8: 78
43. Al-Salam S, Hashmi S. Galectin-1 in early acute myocardial infarction. *PLoS One*. 2014; 9: e86994. doi: 10.1371/journal.pone.0086994.
44. Nakahara S, Raz A. Biological modulation by lectins and their ligands in tumor progression and metastasis. *Anticancer Agents Med Chem*. 2008; 8: 22-36
45. Camby I, Le Mercier M, Lefranc F, Kiss R. Galectin-1: a small protein with major functions. *Glycobiology*. 2006; 16: 137-157
46. Spano D, Russo R, Di Maso V, Rosso N, Terracciano LM, Roncalli M, et al. Galectin-1 and its involvement in hepatocellular carcinoma aggressiveness. *Mol Med*. 2010; 16: 102-15
47. Almkvist, J. and Karlsson, A. Galectins as inflammatory mediators. *Glycoconj. J*. 2004; 19: 575-581

48. *Blaser, C, Kaufmann, M, Muller, C, Zimmermann, C, Wells, V, Mallucci, L, et al.* Beta-galactoside-binding protein secreted by activated T cells inhibits antigen-induced proliferation of T cells. *Eur. J. Immunol.* 1998; 28: 2311-2319
49. *He, J. and Baum, L.G.* Presentation of galectin-1 by extracellular matrix triggers T cell death. *J. Biol. Chem.* 2004; 279: 4705-4712
50. *Allione, A, Wells, V, Forni, G, Mallucci, L, and Novelli, F.* Betagalactoside-binding protein (beta GBP) alters the cell cycle, upregulates expression of the alpha- and beta-chains of the IFN-gamma receptor, and triggers IFN-gamma-mediated apoptosis of activated human T lymphocytes. *J. Immunol.* 1998; 161: 2114-2119
51. *Baum L.G, Blackall DP, Arias-Magallano S, Nanigian D, Uh SY, Browne JM, et al.* Amelioration of graft versus host disease by galectin-1. *Clin. Immunol.* 2003; 109: 295-307
52. *Santucci, L, Fiorucci, S, Rubinstein, N, Mencarelli, A, Palazzetti, B, Federici, B, et al.* Galectin-1 suppresses experimental colitis in mice. *Gastroenterology.* 2003; 124: 1381-1394
53. *van der Leij, J, van den Berg, A, Blokzijl, T, Harms, G, van Goor, H, Zwiars, P, van Weeghel, R, Poppema, S, and Visser, L.* Dimeric galectin-1 induces IL-10 production in T-lymphocytes: an important tool in the regulation of the immune response. *J. Pathol.* 2004; 204: 511-518
54. *Van den Brule, FA, Waltregny, D, and Castronovo, V.* Increased expression of galectin-1 in carcinoma-associated stroma predicts poor outcome in prostate carcinoma patients. *J. Pathol* 2001; 193: 80-87.
55. *Camby I, Le Mercier M, Lefranc F, Kiss R.* Galectin-1: a small protein with major functions. *Glycobiology.* 2006; 16: 137-157.
56. *Larsen L, Chen HY, Saegusa J, et al.:* Galectin-3 and the skin. *J Dermatol Sci* 2011;64:85-91.
57. *Chen HY, Liu FT, Yang RY:* Roles of galectin-3 in immune responses. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2005;53:497-504.
58. *Desmedt V, Desmedt S, Delanghe JR, et al.:* Galectin-3 in Renal Pathology: More Than Just an Innocent Bystander. *Am J Nephrol* 2016;43:305-17.
59. *Lukic R, Gajovic N, Jovanovic I, et al.:* Potential Hepatoprotective Role of Galectin-3 during HCV Infection in End-Stage Renal Disease Patients. *Dis Markers* 2017;2017:6275987.

60. Endo K, Kohnoe S, Tsujita E, et al.: Galectin-3 expression is a potent prognostic marker in colorectal cancer. *Anticancer Res* 2005;25:3117-21.
61. Wu KL, Huang EY, Yeh WL, et al.: Synergistic interaction between galectin-3 and carcinoembryonic antigen promotes colorectal cancer metastasis. *Oncotarget* 2017;8:61935-61943.
62. Johnson KD, Glinskii OV, Mossine VV, et al.: Galectin-3 as a potential therapeutic target in tumors arising from malignant endothelia. *Neoplasia* 2007;9:662-70.
63. Nangia-Makker P, Balan V, Raz A.: Regulation of tumor progression by extracellular galectin-3. *Cancer Microenviron* 2008;1:43-51.
64. Huguenot N, Brown G, Glynn-Jones R, et al. Advances in the care of patients with mucinous colorectal cancer. *Nature Reviews Clinical Oncology* 2015.
65. Matthew Fleming, Sreelakshmi Ravula, Sergei F. Tatishchev, and Hanlin L. Wang Colorectal carcinoma: Pathologic aspects *J Gastrointest Oncol.* 2012; 3(3): 153–173
66. Sedat Belli, Huseyin Ozgur Aytac, Erdal Karagulle, Hakan Yabanoglu, Fazilet Kayaselcuk, and Sedat Yildirim. Outcomes of Surgical Treatment of Primary Signet Ring Cell Carcinoma of the Colon and Rectum: 22 Cases Reviewed With Literature *Int Surg.* 2014; 99(6).
67. Compton C, Fenoglio-Preiser CM, Pettigrew N, Fielding LP. American joint committee on cancer prognostic factors consensus conference: colorectal working group. *Cancer* 2000; 88(7): 1739–57.
68. Jass JR, O'Brien J, Riddell RH, Snover DC. Recommendations for the reporting of surgically resected specimens of colorectal carcinoma: association of directors of anatomic and surgical pathology. *Am J Clin Pathol* 2008;129(1):13–23.
69. Sobin LH, Wittekind C. TNM classification of malignant tumours. 6th ed. New York: Wiley-Liss;2003.
70. Kjellmo A, Drolsum A. Diagnosis and staging of colorectal cancer. *Tidsskr Nor Laegeforen* 2007;127(21):2824–8.
71. Compton CC, Fielding LP, Burgart LJ, Conley B, Cooper HS, Hamilton SR, et al. Prognostic factors in colorectal cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999. *Arch Pathol Lab Med* 2000; 124(7):979–94.
72. Jass JR. Classification of colorectal cancer based on correlation of clinical, morphological and molecular features. *Histopathology* 2007;50(1):113-30.
73. Bajwa A, Blunt N, Suliman I, Bridgewater J, Hochhauser D, et al. Primary tumour



- resection and survival in the palliative management of metastatic colorectal cancer. *Eur JSurg Oncol* 2009; 35(2):164–7.
74. Allen DC. Histopathology reporting. Guidelines for surgical cancer. 2nd ed. London: Springer-Verlag; 2006. p. 14–28.
75. Tomislav Dragovich, MD. Colon Cancer. Section of Hematology and Oncology. Jan 30, 2018. <https://emedicine.medscape.com/article/277496-overview>
76. Republička stručna komisija za izradu i implementaciju vodiča dobre kliničke prakse. Vodič za dijagnostikovanje i lečenje raka kolona i rektuma [Internet]. 2013 [cited 2016 May 16]; Available from: [http://www.zdravlje.gov.rs/downloads/2013/Novembar/Vodic\\_Za\\_Dijagnostikovanje\\_I\\_Le\\_cenje\\_Raka\\_Kolona\\_I\\_Rektuma.pdf](http://www.zdravlje.gov.rs/downloads/2013/Novembar/Vodic_Za_Dijagnostikovanje_I_Le_cenje_Raka_Kolona_I_Rektuma.pdf)
77. Zlobec I, Lugli A. Prognostic and predictive factors in colorectal cancer. *J Clin Pathol* 2008 May; 61(5):561-9.
78. Tournigand C, Andre T, Achille E, et al. FOLFIRI followed by FOLFOX6 or the reverse sequence in advanced colorectal cancer: a randomized GERCOR study. *J Clin Oncol*. 2004 Jan 15. 22(2):229-37.
79. Heidenhain M. Noch einmal uber die darstellung der centralkorper durch eishamatoxylin nebst einigen allgemeinen bemerkungen uber die hamatoxylinfarben. *Z Wiss Mikrosk* 1896; 13: 186.
80. Gurr AB. Biological staining methods. *Hopkin and Williams Chadowell Heath* 1976.
81. International Agency for Research on Cancer. Tumours of the colon and rectum. In: Hamilton SR, Aaltonen LA, editors. Pathology and genetics. Tumours of the digestive system. Lyon: IARC Press; 2000; p. 110–111.
82. Compton CC, Fielding LP, Burgart LJ et al. Prognostic factors in colorectal cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999. *Arch Path Lab Med* 2000; 124: 979-94.
83. Understanding Your Pathology Report: Colon Cancer. Vachani C, Di Lullo G, and. Giantonio BJ. Abramson Cancer Center of the University of Pennsylvania Last Modified: June 26, 2013.
84. Heilmann RM, Cranford SM, Ambrus A, et al. Validation of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the measurement of canine S100A12. *Vet Clin Pathol*. 2016; 45: 135-47.

85. Prakash N, Stumbles P, Mansfield C. Initial Validation of Cytokine Measurement by ELISA in Canine Feces. *Open Journal of Veterinary Medicine*, 2013; 3: 282-288.
86. Jovanovic M, Zdravkovic N, Jovanovic I, Radosavljevic G, Gajovic N, Zdravkovic N, Maric V, Arsenijevic N. TGF- $\beta$  as a marker of ulcerative colitis and disease severity. *Ser J Exp Clin Res* DOI: 10.1515/sjecr-2017-0019
87. Zdravkovic N, Pavlovic M, Radosavljevic G, Jovanovic M, Arsenijevic A, Zdravkovic N, Maric V, Loncarevic S, Srzentic Z, Jovanovic I. Serum levels of immunosuppressive cytokines and tumor markers in metastatic colorectal carcinoma. *JBUON* 2017; 22: 1-8.
88. Wu MH, Hong TM, Cheng HW, Pan SH, Liang YR, Hong HC, et al. Galectin-1-mediated tumor invasion and metastasis, up-regulated matrix metalloproteinase expression, and reorganized actin cytoskeletons. *Mol Cancer Res* 2009; 7: 311-318.
89. Thijssen VL, Postel R, Brandwijk RJ, Dings RP, Nesmelova I, Satijn S, et al. Galectin-1 is essential in tumor angiogenesis and is a target for antiangiogenesis therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103: 15975-15980
90. Tang D, Gao J, Wang S, Yuan Z, Ye N, Chong Y, et al. Apoptosis and anergy of T cell induced by pancreatic stellate cells-derived galectin-1 in pancreatic cancer. *Tumour Biol* 2015; 36: 5617-5626
91. Grosset AA, Labrie M, Vladioiu MC, Yousef EM, Gaboury L, St-Pierre Y. Galectin signatures contribute to the heterogeneity of breast cancer and provide new prognostic information and therapeutic targets. *Oncotarget*. 2016; 7: 18183-203. doi: 10.18632/oncotarget.7784.
92. Astorgues-Xerri L, Riveiro ME, Tijeras-Raballand A, Serova M, Rabinovich GA, Bieche I, et al. OTX008, a selective small-molecule inhibitor of galectin-1, downregulates cancer cell proliferation, invasion and tumour angiogenesis. *Eur J Cancer*. 2014; 50: 2463-77
93. Jung EJ, Moon HG, Cho BI, Jeong CY, Joo YT, Lee YJ, et al. Galectin-1 expression in cancer-associated stromal cells correlates tumor invasiveness and tumor progression in breast cancer. *Int J Cancer*. 2007 Jun 1;120(11):2331-8.
94. Croci DO, Salatino M, Rubinstein N, Cerliani JP, Cavallin LE, Leung HJ, et al. Disrupting galectin-1 interactions with N-glycans suppresses hypoxia-driven angiogenesis and tumorigenesis in Kaposi's sarcoma. *J Exp Med* 2012; 209: 1985-2000

95. Brandt B, Abou-Eladab EF, Tiedge M and Walzel H. Role of the JNK/c-Jun/AP-1 signaling pathway in galectin-1-induced T-cell death. *Cell Death Dis* 2010; 1: e23
96. Barondes SH, Castronovo V, Cooper DN, Cummings RD, Drickamer K, Feizi T, et al. Galectins: a family of animal beta-galactoside-binding lectins. *Cell* 1994; 76: 597-598
97. D'Haene N, Sauvage S, Maris C, Adanja I, Le Mercier M, Decaestecker C, et al. VEGFR1 and VEGFR2 involvement in extracellular galectin-1- and galectin-3-induced angiogenesis. *PLoS One* 2013; 8: e67029
98. Suzuki O and Abe M. Galectin-1-mediated cell adhesion, invasion and cell death in human anaplastic large cell lymphoma: regulatory roles of cell surface glycans. *Int J Oncol* 2014; 44: 1433-1442.
99. Kim HJ, Jeon HK, Cho YJ, Park YA, Choi JJ, Do IG, et al. High galectin-1 expression correlates with poor prognosis and is involved in epithelial ovarian cancer proliferation and invasion. *Eur J Cancer*. 2012; 48:1914-21.
100. Zhang P, Zhang P, Shi B, Zhou M, Jiang H, Zhang H, et al. galectin-1 overexpression promotes progression and chemoresistance to cisplatin in epithelial ovarian cancer. *Cell Death Dis*. 2014; 5: e991
101. Ouyang J, Plütschow A, Pogge von Strandmann E, Reiners KS, Ponader S, Rabinovich GA, et al. Galectin-1 serum levels reflect tumor burden and adverse clinical features in classical Hodgkin lymphoma. *Blood*. 2013; 121: 3431-3
102. Chen L, Yao Y, Sun L, Zhou J, Liu J, Wang J, et al. Clinical implication of the serum galectin-1 expression in epithelial ovarian cancer patients. *J Ovarian Res*. 2015; 8: 78
103. Wagner M, Peterson CG, Ridefelt P, Sangfelt P, Carlson M. Fecal markers of inflammation used as surrogate markers for treatment outcome in relapsing inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*. 2008 Sep 28;14(36):5584-9; discussion 5588.
104. Tibble J. A., Sigthorsson G., Bridger S., Fagerhol M. K., Bjarnason I. Surrogate markers of intestinal inflammation are predictive of relapse in patients with inflammatory bowel disease *Gastroenterology* 2000; 119: 15-22.
105. Tibble J., Teahon K., Thjodleifsson B. et al., "A simple method for assessing intestinal inflammation in Crohn's disease," *Gut* 2000; 47: 506-513

106. Johne B, Kronborg O, Tøn HI, Kristinsson J, Fuglerud P. A new fecal calprotectin test for colorectal neoplasia. Clinical results and comparison with previous method. *Scand J Gastroenterol.* 2001;36(3):291-6.
107. Borovcanin M, Jovanovic I, Radosavljevic G, Djukic Dejanovic S, Stefanovic V, Arsenijevic N, Lukic ML. Antipsychotics can modulate the cytokine profile in schizophrenia: attenuation of the type-2 inflammatory response. *Schizophr Res.* 2013;147(1):103-9.
108. Almkvist, J. and Karlsson, A. Galectins as inflammatory mediators. *Glycoconj. J.* 2004; 19: 575-81.
109. Blaser, C, Kaufmann, M, Muller, C, Zimmermann, C, Wells, V, Mallucci, L, et al. Beta-galactoside-binding protein secreted by activated T cells inhibits antigen-induced proliferation of T cells. *Eur. J. Immunol.* 1998; 28: 2311-19.
110. He, J. and Baum, L.G. Presentation of galectin-1 by extracellular matrix triggers T cell death. *J. Biol. Chem.* 2004; 279: 4705-12.
111. Allione, A, Wells, V, Forni, G, Mallucci, L, and Novelli, F. Betagalactoside-binding protein (beta GBP) alters the cell cycle, upregulates expression of the alpha- and beta-chains of the IFN-gamma receptor, and triggers IFN-gamma-mediated apoptosis of activated human T lymphocytes. *J. Immunol.* 1998; 161: 2114-2119
112. Baum L.G, Blackall DP, Arias-Magallano S, Nanigian D, Uh SY, Browne JM, et al. Amelioration of graft versus host disease by galectin-1. *Clin. Immunol.* 2003; 109: 295-307
113. Santucci, L, Fiorucci, S, Rubinstein, N, Mencarelli, A, Palazzetti, B, Federici, B, et al. Galectin-1 suppresses experimental colitis in mice. *Gastroenterology.* 2003; 124: 1381-94.
114. van der Leij, J, van den Berg, A, Blokzijl, T, Harms, G, van Goor, H, Zwiers, P, van Weeghel, R, Poppema, S, and Visser, L. Dimeric galectin-1 induces IL-10 production in T-lymphocytes: an important tool in the regulation of the immune response. *J. Pathol.* 2004; 204: 511-518
115. van den Brule, FA, Waltregny, D, and Castronovo, V. Increased expression of galectin-1 in carcinoma-associated stroma predicts poor outcome in prostate carcinoma patients. *J. Pathol* 2001; 193: 80-87.
116. Camby I, Le Mercier M, Lefranc F, Kiss R. Galectin-1: a small protein with major functions. *Glycobiology.* 2006; 16: 137-157.

117. Formica V, Cereda V, Nardecchia A, et al.: Immune reaction and colorectal cancer: friends or foes? *World J Gastroenterol* 2014;20:12407-19.
118. Johansson M, Denardo DG, Coussens LM.: Polarized immune responses differentially regulate cancer development. *Immunol Rev* 2008;222:145-54.
119. Klampfer L.: Cytokines, inflammation and colon cancer. *Curr Cancer Drug Targets* 2011;11:451-64.
120. Pernot S, Terme M, Voron T, et al.: Colorectal cancer and immunity: what we know and perspectives. *World J Gastroenterol* 2014;20:3738-50.
121. Kitajima M, Ito T, Tumes DJ, et al: Memory type 2 helper T cells induce long-lasting antitumor immunity by activating natural killer cells. *Cancer Res* 2011;71:4790-8.
122. Kanazawa M, Yoshihara K, Abe H, et al.: Effects of PSK on T and dendritic cells differentiation in gastric or colorectal cancer patients. *Anticancer Res* 2005;25:443-9.
123. Agarwal A, Verma S, Burra U, et al.: Flow cytometric analysis of Th1 and Th2 cytokines in PBMCs as a parameter of immunological dysfunction in patients of superficial transitional cell carcinoma of bladder. *Cancer Immunol Immunother* 2006;55:734-43.
124. Zdravkovic N, Pavlovic M, Radosavljevic G, et al. Serum levels of immunosuppressive cytokines and tumor markers in metastatic colorectal carcinoma. *JBUON* 2017; 22: 1-8.
125. Abtahi S, Davani F, Mojtahedi Z, et al. Dual association of serum interleukin-10 levels with colorectal cancer. *J Cancer Res Ther* 2017;13:252-256.
126. Johnson KD, Glinskii OV, Mossine VV, et al.: Galectin-3 as a potential therapeutic target in tumors arising from malignant endothelia. *Neoplasia* 2007;9:662-70.
127. Nangia-Makker P, Balan V, Raz A.: Regulation of tumor progression by extracellular galectin-3. *Cancer Microenviron* 2008;1:43-51.
128. Endo K, Kohnoe S, Tsujita E, et al.: Galectin-3 expression is a potent prognostic marker in colorectal cancer. *Anticancer Res* 2005;25:3117-21.
129. Tao L, Jin L, Dechun L, et al.: Galectin-3 Expression in Colorectal Cancer and its Correlation with Clinical Pathological Characteristics and Prognosis. *Open Med (Wars)* 2017;12:226-230.

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

143. Wu KL, Huang EY, Jhu EW, et al.: Overexpression of galectin-3 enhances migration of colon cancer cells related to activation of the K-Ras-Raf-Erk1/2 pathway. *J Gastroenterol.* 2013;48:350-9.
144. Fortuna-Costa A, Gomes AM, Kozlowski EO, et al.: Extracellular galectin-3 in tumor progression and metastasis. *Front Oncol.* 2014;16;4:138.
145. Wu KL, Huang EY, Yeh WL, Hsiao CC, Kuo CM.: Synergistic interaction between galectin-3 and carcinoembryonic antigen promotes colorectal cancer metastasis. *Oncotarget* 2017; 8: 61935-61943.
146. Cvejic D, Savin S, Golubovic S, Paunovic I, Tatic S et al.: Galectin-3 and carcinoembryonic antigen expression in medullary thyroid carcinoma: possible relation to tumour progression. *Histopathology* 2000; 37: 530-5.