



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ  
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА

Миодраг В. Јоцић

**КОЛОРЕКТАЛНИ КАРЦИНОМ: УТИЦАЈ  
СИСТЕМСКИХ КОНЦЕНТРАЦИЈА ЦИТОКИНА И  
ПАТОХИСТОЛОШКИХ КАРАКТЕРИСТИКА НА  
АНЕМИЈУ И ТРОМБОЦИТОЗУ**

докторска дисертација

Крагујевац, 2021



UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC  
FACULTY OF MEDICAL SCIENCES

Miodrag V. Jocić

**COLORECTAL CARCINOMA: INFLUENCE OF  
SYSTEMIC CYTOKINE CONCENTRATIONS AND  
PATHOHISTOLOGICAL CHARACTERISTICS ON  
ANEMIA AND THROMBOCYTOSIS**

Doctoral Dissertation

Kragujevac, 2021

## ИДЕНТИФИКАЦИОНА СТРАНИЦА ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ

<b>Аутор</b>
Име и презиме: Миодраг Јоцић
Датум и место рођења: 13.01.1974.године, Ниш, Србија
Садашње запослење: Асистент на катедри за физиолошке науке, Медицинског факултета Војномедицинске академије, Универзитета одбране. Лекар специјалиста трансфузиологије. Начелник Одељења за продукте од крви са контролом квалитета, Институт за трансфузиологију и хемобиологију, Војномедицинска академија.
<b>Докторска дисертација</b>
Наслов: „Колоректални карцином: утицај системских концентрација цитокина и патохистолошких карактеристика на анемију и тромбозу“
Број страница: 82
Број слика и табела: 27 слика и 8 табела
Број библиографских података: 123
Установа и место где је рад израђен: КЦ Крагујевац, Факултет медицинских наука Универзитета у Крагујевцу.
Научна област (УДК): Медицина
<b>Коментори:</b>
1. Доц. др Марина Јовановић, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, за ужу научну област Интерна медицина
2. Доц. др Милан Јовановић, доцент Медицинског факултета Војномедицинске академије Универзитета одбране у Београду, за ужу научну област Хирургија
<b>Оцена и одбрана</b>
Датум пријаве теме: 22.07.2019.
Број одлуке и датум прихватања теме докторске дисертације: IV-03-460/5 од 01.10.2020. године
Комисија за оцену научне заснованости теме и испуњености услова кандидата:
1. Проф.др Наташа Здравковић, ванредовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, за ужу научну област интерна медицина, председник;
2. Проф.др Светлана Ђукић, ванредовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, за ужу научну област интерна медицина, члан;
3. Проф.др Данило Војводић, редовни професор Медицинског факултета Војномедицинске академије Универзитета одбране, за ужу научну област имунологија, члан.
Комисија за оцену и одбрану докторске дисертације:
1. Проф. др Наташа Здравковић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, за ужу научну област Интерна медицина, председник
2. Проф. др Светлана Ђукић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, за ужу научну област Интерна медицина, члан
3. Проф. др Дарко Мирковић, редовни професор Медицинског факултета Војномедицинске академије Универзитета одбране у Београду, за ужу научну област Хирургија, члан
Датум одбране дисертације:

## ЗАХВАЛНОСТ

Захвалан сам породици и родитељима на подршци, а засебно супруги која ме је искрено храбрила да се увек максимално потрудим, и ћерки Катарини која ми је свесрдно помагала и радила са мном на техничким деловима у сваком сегменту рада, као и ћерки Александри које ме је бодрила да будем што успешнији тата.

Захваљујем својим менторима доц. др Марини Јовановић и доц. др Милану Јовановићу, који су својим стручним и искуственим саветима допринели да докторат буде квалитетно осмишљен. Нарочито се захваљујем др Милану на безрезервном дугогодишњем искреном пријатељству, кумству и исправном планирању.

Посебну захвалност дугујем стручном тиму Центра за ММ и ИМЋ, који су вештинама, умећем и практичним радом употпунили теоретска сазнања и тиме учинили да се овај рад уобличи. Истакао бих др Невену Гајовић, која је значајно помогла приликом писања рукописа и др фарм. Милену Јуришевић која својим знањем допринела стручној обради статистичких података и њиховом приказу, што је умногоме помогло да овај рад буде комплетнији.

Истакао бих такође и велику захвалност професору др Небојши Арсенијевићу који својим огромним знањем и искуством у повезивању научних чињеница помогао да се отклоне евентуални пропусти.

## САЖЕТАК:

У студији су испитиване системске концентрације имуномодулацијских протеина/интерлеукина и клиничко-патохистолошке карактеристике болести и повезане су са анемијом/тромбоцитозом код оболелих од колоректалног карцинома (CRC). Испитаници са CRC-ом, су разврстани у групу са анемијом, односно са тромбоцитозом (експерименталне групе) и групу без анемије, односно без тромбоцитозе (контролне групе). У овако детерминисаним скуповима испитаника анализирани су клиничке (комплетна крвна слика са бројем крвних ћелија, вредност хемоглобина, преоцена активности болести, комплетан радиолошки преглед, присуство компликација и појава болести ван гастроинтестиналног тракта) и патохистолошке карактеристике болести (тип тумора, нуклеарни и хистолошки градус, TNM класификација), као и концентрација цитокина и имуномодулацијских протеина (IL-1, IL-4, IL-10, IL-17, IL-33, галектина-1, галектина-3, TNF- $\alpha$  и INF- $\gamma$ ) и биохемијских белега малигне болести (AFP, CEA, CA 19-9) у серуму болесника. Болесници са CRC-ом и анемијом, односно тромбоцитозом имају тежи клиничко-патохистолошки облик болести (виши нуклеарни и хистолошки градус тумора, већи степен инвазије лимфних и крвних судова, виши TNM стадијум болести, више откривених метастаза у плућима, јетри или перитонеуму), у поређењу са болесницима са CRC-ом без анемије, односно без тромбоцитозе. Такође, утврђена је позитивна корелација анемије, односно тромбоцитозе и системских вредности интерлеукина, имуномодулацијских протеина и биохемијских белега малигне болести (AFP, CEA, CA 19-9) у серуму болесника. Постоји позитивна корелација између системских вредности имуномодулацијских протеина и тежег клиничко-патохистолошког облика болести, у односу на присуство анемије, односно тромбоцитозе код болесника са колоректалним карциномом.

**Кључне речи:** колоректални карцином, анемија, тромбоцитоза, цитокини, IL-33, Gal-1

## **ABSTRACT:**

We investigated systemic concentrations of immunomodulatory proteins/interleukins, as well as clinical and histopathological characteristics of the disease and correlated them with anemia/thrombocytosis in patients with colorectal cancer (CRC). The study included patients with colorectal cancer, divided into a group with anemia and a group with thrombocytosis (experimental groups) and a group without anemia, or without thrombocytosis (control groups). In such determined groups, clinical (complete blood count with blood cell count, hemoglobin value, disease activity, complete radiological examination, complications and occurrence of diseases outside the gastrointestinal tract) and pathohistological characteristics of the disease (tumor type, nuclear and histologic grade, TNM classification), as well as concentrations of cytokines and immunomodulatory proteins (IL-1, IL-4, IL-10, IL-17, IL-33, galectin-1, galectin-3, TNF- $\alpha$  and INF- $\gamma$ ) and biochemical indicators of malignant disease (AFP, CEA, CA 19-9) in the patients' serum were analyzed. Patients with CRC and anemia/thrombocytosis, have a more severe clinical-pathohistological form of the disease (higher nuclear and histological grade of tumor, higher lymph and blood vessels invasion, higher TNM stage of the disease, more detectable lung, liver or peritoneum metastasis) compared to CRC patients without anemia or thrombocytosis. Moreover, a positive correlation between anemia/thrombocytosis, and cytokines, AFP, CEA and CA 19-9 values in the patients' serum was determined. There is a positive correlation between the systemic values of immunomodulatory proteins and severe clinical-pathohistological form of the disease, based on the presence of anemia or thrombocytosis in CRC patients.

**Key words:** colorectal carcinoma, anemia, thrombocytosis, cytokines, IL-33, Gal-1

## САДРЖАЈ

<b>1. УВОД .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Епидемиолошки значај колоректалног карцинома.....</b>	<b>1</b>
<b>1.2. Фактори ризика за колоректални карцином.....</b>	<b>3</b>
1.2.1. Генетски фактори и фамилијарна предиспозиција .....	4
1.2.2. Старост .....	5
1.2.3. Инфламацијске_болести_црева .....	5
1.2.4. Фактори ризика животне средине .....	6
<b>1.3. Значај појединих цитокина и имуномодулацијских протеина у патогенези     колоректалног карцинома .....</b>	<b>9</b>
<b>1.4. Прогресија болести и најчешћи симптоми и знаци колоректалног карцинома.....</b>	<b>15</b>
1.4.1. Повезаност анемије и колоректалног карцинома .....	15
1.4.2. Значај тромбозе код колоректалног карцинома .....	17
<b>1.5. Преживљавање код колоректалног карцинома.....</b>	<b>18</b>
<b>2. ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА.....</b>	<b>20</b>
<b>3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ.....</b>	<b>21</b>
<b>4. РЕЗУЛТАТИ.....</b>	<b>27</b>
<b>5. ДИСКУСИЈА.....</b>	<b>63</b>
<b>6. ЗАКЉУЧЦИ .....</b>	<b>71</b>
<b>7. СКРАЋЕНИЦЕ .....</b>	<b>72</b>
<b>8. ЛИТЕРАТУРА .....</b>	<b>74</b>

## 1. УВОД

Тема ове дисертације је анализа клиничко-патохистолошких карактеристика болести и системских вредности туморских маркера, цитокина и имуномодулацијских протеина, и њихова корелација са присуством анемије, односно тромбозе, код болесника са колоректалним карциномом. У уводном делу докторске дисертације дат је преглед релевантне литературе и описани су резултати студија сличног тематског садржаја. Истакнут је епидемиолошки значај колоректалног карцинома, у погледу високе стопе обољевања, смртности, као и тренда значајног повећања броја оболелих и умрлих у будућем периоду. Такође, дат је преглед фактора ризика за колоректални карцином, са поделом на непромењиве факторе ризика и факторе ризика који потичу из животне средине или навика оболелих. Након тога написан је преглед актуелне литературе о значају појединих цитокина и имуномодулацијских протеина у патогенези колоректалног карцинома, као и њихова повезаност са развојем и прогресијом болести, са процесима ангиогенезе, апоптозе и метастазирања тумора. У последњем делу увода описани су хематолошки поремећаји који прате развој колоректалног карцинома, попут анемије и тромбозе, а који имају свој значај у многим аспектима болести и уско су повезани са исходом, прогресијом болести, преживљавањем и осталим прогностичким параметрима.

### 1.1. Епидемиолошки значај колоректалног карцинома

Колоректални карцином је један од водећих узрока морбидитета и морталитета у целом свету. Значај колоректалног карцинома (енглес. *ColoRectal Cancer* – CRC) као глобалног здравственог проблема се временом све више повећава, првенствено због пораста броја становника, демографских промена, старења популације и прихватања „западњачког начина живота“ (1-3). Процењује се да је током 2018. године укупно у свету откривено 18,1 милиона нових случајева обољевања и забележено 9,6 милиона смртних исхода од свих канцера (1). Од свих карцинома дијагностикованих код оба пола, CRC је трећи најчешћи карцином (након карцинома плућа и дојке) и други водећи узрок смрти од карцинома (након карцинома плућа). Даље, ако посматрамо према полу, код мушкараца, CRC је након карцинома плућа и простате трећи најчешће дијагностиковани карцином (10,9 % од свих карцинома мушкараца). Код жена, CRC је након карцинома дојке други најчешће дијагностиковани карцином (укупно 9,5 % од свих карцинома жена) (1, 3). Према GLOBOCAN бази података Међународне агенције за истраживања карцинома (енглес. *International Agency for Research on Cancer* – IARC) и Светске здравствене организације (енглес. *World Health Organisation* – WHO), процењује се да је у 2018. години откривено 1.849.518 нових случајева оболелих, као и да је забележено 880.792 смртних случајева од CRC-а (1). Мада се инциденца и морталитет од CRC-а вишеструко разликује широм света (глобална инциденца је 10,2%, а морталитет 9,2 % у односу на укупан број свих карцинома) (1), више од две трећине свих случајева и више од половине свих смртних исхода се дешава у земљама са високим индексом развоја (енглес. *human development index* – HDI) (4, 5). Према извештају Светског фонда за истраживање рака и Америчког института за истраживање рака употреба већих количина црвеног или прерађеног меса, алкохолних пића и



гојазност повећавају ризик, док редовна физичка активност, конзумирање интегралних житарица, хране која садржи дијетална влакна и узимања додатака калцијума делује протективно, као фактори који смањују ризик од појаве CRC-а (6, 7).

Епидемиолошке карактеристике CRC-а приказане су у Табели 1 (3). У 2018. години, у свету је укупно регистровано 4.789.635 оболелих, којима је CRC-ом дијагностикован у претходних 5 година. Број оболелих мушкараца и жена од CRC-а је скоро подједнак. Петогодишња преваленца је износила 62,8 на 100.000 становника, те је CRC други најчешћи карцином у односу на преваленцу свих карцинома (3).

**Табела 1. Епидемиолошке карактеристике колоректалног карцинома**

Популација	5-год. преваленца (број ободелних)	Нови случајеви	*ASIR	Смртни случајеви	**ASMR
Азија	2.356.976	957.896	17,7	461,422	8,3
Европа	1.403.877	499.667	30,0	242,483	12,6
Сев.Америка	534.049	179.771	26,2	64,121	8,4
Јуж.Америка	315.005	128.006	16,8	64,666	8,1
Африка	113.625	61.846	8,2	40,034	5,5
<b>Свет</b>	<b>4.789.635</b>	<b>1.849.518</b>	<b>19,7</b>	<b>880,792</b>	<b>8,9</b>

\* ASIR – Age Standardized Incidence Rate (изражено на 100.000 становника)

\*\*ASMR – Age Standardized Mortality Rate (изражено на 100.000 становника)

Широм света постоје велике разлике у епидемиолошким показатељима везаним за CRC. У Европи су забележене највећа инциденца, морталитет и 5-годишња преваленца. Иако су инциденца и преваленца у Северној Америци високе, стандардизована стопа смртности била је слична морталитету у Азији (8). Према статистичким подацима Америчког друштва за карциноме (енглес. *American Cancer Society*), процењује се да ће у току 2019. године у Сједињеним америчким државама бити дијагностиковано око 145.600 нових случајева CRC-а, док се, због напреднијег лечења и темељније примене скрининга, стопа смртности код оба пола константно смањује последњих деценија (9). На простору Афричког континента забележена је најнижа инциденца, морталитет и 5-годишња преваленца од CRC-а (Табела 1). Између инциденце и морталитета CRC-а у Европи и Африци забележене су разлике од 10 и више пута, док је разлика још израженија у случају петогодишње преваленце (3). Наведене географске разлике могу бити последица интеракције између генетских фактора, изложености специфичним условима животне средине, али су и повезане са развијеношћу здравствене службе и могућностима спровођења скрининг прегледа за рано дијагностиковање (10-12). Највећа инциденца, као што је речено забележена је у појединим Европским земљама (Словачка, Мађарска, Словачка, Холандија, Словенија, Норвешка), у којима су стандардизоване стопе инциденце (енглес. *Age Standardized Incidence Rates – ASIR*) веома високе и износе око 60 на 100.000 за мушкарце, односно око 35 на 100.000 за жене. Затим следе Аустралија и Нови Зеланд, Северна Америка и источна Азија (Јапан, Република Кореја, Сингапур), док су најниже инциденце забележене у Западној Африци, где износи 4,5 на 100.000 мушкараца, односно 3,8 на 100.000 жена (1, 3, 11).

Мада су разлике у морталитету широм света нешто мање изражене, у више замаља Централне и Источне Европе забележена су највеће стандардизоване стопе смртности (енглес. *Age Standardized Mortality Rates – ASMR*) од CRC-а (15,2 на 100.000 становника оба пола), док су најниже ASMR забележене у јужној и централној Африци, и износе 3,6 на 100.000 становника оба пола (1, 3). Арнолд и сарадници су, анализирајући кретање и трендове инциденце и морталитета код CRC-а широм света, идентификовали три глобална временска обрасца, који су уско повезани са степеном развоја неког региона. Уочено је: 1) повећање стопа инциденце и морталитета у последњих десет година, што је забележено у Русији, балтичким земљама, Кини и Бразилу; 2) повећање инциденце, али уз истовремено смањење стопе морталитета у Канади, Великој Британији, Данској и Сингапуру; и 3) смањење обе стопе, и инциденце и морталитета, што је забележено у Сједињеним Америчким Државама, Јапану и Француској (10). Према наведеним кохортним студијама, на пораст стопе инциденце највише су утицале генерацијске промене навика у исхрани, гојазност и нездрав стил живота, док је пад смртности забележен у високо развијенијим земљама првенствено последица напретка оствареног у организацији здравствене службе, ране дијагностике и нових и савременијих начина лечења CRC-а (10-12). На основу забележених годишњих просечних процентних промена (енглес. *Average Annual Percentage Change – ААРС*), које за период од 1990. до 2016. износе просечно 2,34% (13), процењује се да ће се тренд пораста броја оболелих од CRC-а наставити и у будућем периоду. У наредним годинама процењено је да ће пораст бити 60%, са процењених око 2,2 милиона оболелих и око 1,1 милион смртних случајева од CRC-а (10). Због тога тежиште будућег рада здравствених радника је управо примена свих стратегија превенције, раног откривања и ефективних програма лечења CRC-а (14). Приоритет би требало да буде широка примена скрининга код млађих одраслих особа са присутним факторима ризика (13).

## 1.2. Фактори ризика за колоректални карцином

Највећи број случајева CRC-а, око 75% јесу спорадични случајеви чији је развој највероватније подстакнут факторима животне средине. Са друге стране, око 25% случајева оболелих од CRC-а има породичну предиспозиције за настанак болести, што може да укаже на истовремени утицај наслеђене генске предиспозиције и деловања фактора животне средине. Међутим, само код 5-6% оболелих наслеђују се мутације на генима, одговорним за развој CRC-а (15).

Многобројни фактори ризика повезани су са чешћом појавом CRC-а. Укратко, у групу непромењивих се убрајају: генетски фактори и фамилијарна предиспозиција за настанак CRC-а, старост и постојање запаљенске болести црева (енглес. *Inflammatory Bowel Disease – IBD*). Поред ових, поједине студије као факторе ризика наводе и мушки пол, припадност црној раси и податаке о ранијем зрачењу у пределу стомака. Од фактора ризика животне средине најчешће се помињу: недостатак физичке активности, прекомерна употреба месних прерађевина, прекомерна употреба алкохола, гојазност, нижи социо-економски статус, пушење, као и „западњачки начин исхране“, дијабетес, постојање хроничних болести и одређени састав микробиома дебелог црева. Са друге стране, познати су протективни фактори који својим дејством смањују ризик од настанка CRC-а, попут: употребе интегралних житарица, исхране богата дијеталним влакнима, употреба млечних производа, воћа и поврћа у исхрани, физичка активност,

употреба неких лекова (витамина, калцијума, аспирина и нестероидних антиинфламаторних лекова). У наредном делу текста биће детаљније описани поједини фактори ризика за настанак CRC-а.

### 1.2.1. Генетски фактори и фамилијарна предиспозиција

Неколико специфичних генетских поремећаја, од којих се већина наслеђује аутозомно-доминантно, повезани су са врло високим ризиком за настанак CRC-а. Сви ови поремећаји се могу клинички поделити на: 1. Наследне полипозне карциноме дебелог црева (енглес. *Hereditary polyposis colorectal cancer* – HPCC) који чине од 3 до 5 % свих случајева CRC-а и 2. Наследне неполипозне карциноме дебелог црева (енглес. *Hereditary nonpolyposis colorectal cancer* – HNPCC) са инциденцом од 1,7 до 4,2% код свих болесника са CRC-ом. Породична аденоматозна полипоза (енглес. *Familial adenomatous polyposis* – FAP) и *Lynch* синдром су најчешћи наследни породични синдроми повезани са већим ризиком од развоја карцинома дебелог црева. Међутим, ова два патолошка стања заједно чине само око 5-6% свих случајева CRC-а, од којих већина припада *Lynch* синдрому (16). Са друге стране, чак више од 10% предходно неселектираних пацијената са CRC-ом имају једну или више патогених мутација, од којих већина не припада *Lynch* синдрому или FAP-у. Од мутација које не припадају *Lynch* синдрому, најчешће се наводе мутације у високим пенетрацијским генима (APC, биалелни MUTYH, BRCA1 и BRCA2, PALB2, CDKN2A и TP53), али и мутације у генима умерене пенетрације код којих тачан ризик од настанка CRC-а није јасно дефинисан (16). Чак 16-20% процената болесника, код којих је CRC дијагностикован у млађем животном добу (пре 50. године), било је повезано са неким од наследних синдрома или генетским поремећајима (17).

#### Наследни полипозни карциноми дебелог црева (HPCC)

Група наследних полипозних облика CRC-а се може поделити на FAP, која је уједно и најчешћи поремећај из ове групе, као и на ређе поремећеје, попут ослабљене породичне аденоматозна полипоза (енглес. *Attenuated Familial Adenomatous Polyposis* – AFAP), полипоза повезана са променама MUTYH гена (енглес. *MUTYH associated polyposis* – MAP), полипоза повезана са променама NTHL1 гена (енглес. *NTHL1 associated polyposis* – NAP) и полипоза повезана са изменама полимеразае (енглес. *Polymerase proofreading-associated Polyposis* – PPAP). Клиничке манифестације болести могу да варирају, тако да су могући случајеви са клиничком дијагнозом FAP, који се молекуларно генетским тестирањем сврставају у другу групу поремећаја. У типичном облику FAP-а, током детињства се појављују бројни аденоми дебелог црева. Симптоми се појављују у просечној доби од око 16 година, а CRC се јавља до 45. године код око 90% нелечених појединаца. FAP је узрокован мутацијама APC гена (енглес. *adenomatous polyposis coli* – APC) који се налази на 5.хромозому. AFAP такође носи висок ризик од развоја CRC-а. Међутим, овај поремећај карактерише се аденомима мањих димензија и каснијом појавом CRC-а. Просечна старост у тренутку дијагнозе је 54 године (18).

#### Наследни неполипозни карциноми дебелог црева (HNPCC)

У ову групу генетских поремећаја убрајају се: *Lynch* синдром, спорадични CRC са недостатком MLH1-/PMS2, *Muir-Torre* синдром и тип II *Turcot* синдрома. Најчешћи

поремећај из ове групе је *Lynch* синдром, који је повезан са патолошким варијантама или епимутацијама гена (*MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS2*), задужених за поправку неподударења на *DNA*. Постоји предиспозицију за развој тумора, који показују велику нестабилност у микросателитским деловима *DNA* (енглес. *high microsatellites instability* – *MSI-H*) и губитак експресије одговарајућих протеина за поправку неподударења *DNA*. Мада је *Lynch* синдром најчешће повезан са развојем *CRC*-а и карцинома ендометријума код носиоца мутација, у захваћеним породицама постоји повећени ризик од развоја неоплазме других ткива и органа. *CRC* код носиоца мутација *Lynch* синдрома се јавља у ранијем животном добу и развија се брже од спорадичног облика *CRC*-а. Почетна дијагноза се обично поставља око 48. године живота, док се код неких болесника *CRC* дијагностикује још раније у њиховим 20-им годинама. Скоро 70% лезија настаје у проксималном делу колона, а отприлике 10 процената ће имати синхроне (истовремено настајање два или више тумора на различитим локализацијама) или метакроне карциноме (појава нових тумора унутар најмање шест месеци након почетне дијагнозе) (19).

### 1.2.2. Старост

Старост је најзначајнији фактор ризика за развој спорадичног облика *CRC*-а, чији се значај драматично повећава нарочито код старијих од 50 година. Око 90% свих *CRC*-а дијагностиковано је у животној доби након 50 године. *CRC* се ретко јавља код особа млађих од 40 година, инциденца почиње значајно да се повећава код особа у старосној доби између 40 и 50 година, а затим прогресивно расте у свакој наредној деценији код старијих од 50 година (4, 20). Међутим, запажен је тренд пораста инциденце *CRC*-а ректалне локализације код млађе популације, између 20 и 39 година, мада је апсолутна инциденција у овој старосној групи и даље далеко нижа него код одраслих старијих од 50 година старости (21). Објашњење овог тренда није потпуно јасно. Неке студије повезују дуготрајно седење (независно од гојазности и недостатка вежбања) са повећаним ризиком од новонасталог *CRC*-а ректалне локализација (22).

### 1.2.3. Инфламацијске болести црева

Пацијенти са инфламацијским болестима црева (*IBD*) изложени су значајно већем ризику од настанка *CRC*, који је углавном последица про-неопластичних ефеката хроничне упале црева. Фактори који додатно повећавају ризик од *CRC*-а повезаног са *IBD*-ом укључују трајање, степен и озбиљност болести, присуство упалних псеудополипа, коегзистирајућег примарног склерозирајућег холангитиса и позитиву родичну анамнезу појаве *CRC*-а. Такође, *CRC* је главни узрок смрти и код улцерозног колитиса (енглес. *Ulcerative colitis* – *UC*) и код *Crohn*-ове болести (енглес. *Crohn's disease* – *CD*) дебелог црева, и чини од 10 до 15% смртности од свих узрока смрти код ових *IBD*-а. Вероватни механизам је да хроничне и понављане епизоде запаљенског оштећења цревне слузокоже током година индукују развој *CRC*-а повезаног са *IBD* (23). Eaden и сарадници у обједињеној метаанализи резултата 116 студија износе да је преваленца *CRC*-а међу болесницима са *UC* износила 3,7%. Дужим трајањем болести инциденца *CRC*-а се значајно повећава, тако кумулативни ризик за развој *CRC*-а износи 2% након 10 година, 8% након 20 и 18% након 30 година трајања *IBD* (24). Canavan и сарадници, показују да пацијенти са дугогодишњом *CD* имају сличан ризик за настанак *CRC*-а као и болесници са *UC*. У њиховој метаанализи, која је обухватила 34 студије, релативни ризик је износио 2,59. (25). Међутим, према истраживању Stidham-а и

коаутора, инциденца је у последњих 30 година опала, што се приписује успешним програмима скрининга на CRC и побољшаној терапији којом се боље контролише упала цревне слузокоже код IBD-а. Наиме, коришћењем метода високе дефиниције и хромоендоскопије побољшана је осетљивост на раније невидљиве равне диспластичне лезије, што је променило дијагностичке и прогностичке смернице те се све више напуштају насумичне нециљане биопсије слузокоже дебелог црева. По овој студији је налаз диспластичних лезија и даље веома забрињавајући за болесника, због њиховог непредвидивог темпа прогресије у малигнитет и могућег истовременог постојања синхроних неоткривених диспластичних лезија, те је најбоље терапијско решење и даље тотална проктоколектомија. Међутим, поменуте боље технике откривања омогућавају ране изоловане ендоскопске ресекције диспластичних лезија, уколико су јасно ограничене. Такође, употреба савременијих терапијских модалитета у лечењу IBD-а значајно је побољшала контролу над упалним процесима слузокоже црева и вероватно смањила ризик од настанка CRC-а код ових болесника последњих година (23).

#### **1.2.4. Фактори ризика животне средине**

##### **Физичка активност**

Смањена физичка активност је доказано повезана са повећаним ризиком од настанка CRC-а. Метаанализе више студија, указује на постојање значајано нижег ризика, од чак 20% код спортиста, док је ризик био за 16% нижи када су анализирани особе које су се рекреативно бавиле спортом у односу на физички неактивне особе. Прецизан механизам заштитног ефекта физичке активности још увек није јасан, али чини се да физичка активност смањује ризик од CRC-а смањујући индекс телесне масе (енглес. *Body Mass Index* – BMI), смањујући време проласка столице кроз дебело црево и смањујући резистенцију на инсулин и инфламацију. Такође, физичка неактивност може повећати учесталост гојазности, што је још један од фактора ризика за развој CRC-а. (6).

##### **Прекомерна употреба месних прерађевина и црвеног меса у исхрани**

Повећана употреба прерађевина од меса и црвеног меса у исхрани повезана је са повећаним ризиком од развоја CRC-а. У метаанализи, која је обухватила 13 студија, изнети су јасни докази о повезаности употребе месних прерађевина и настанка CRC-а, и ризик је био 16% већи код оних испитаника који су конзумирали више од 50 грама месних прерађевина дневно. Под прерађеним месом подразумева се конзервирање меса димљењем, сушењем, сољењем или додавањем хемијских конзерванса. У метаанализи 19 студија које су се бавиле проценом ризика од развоја CRC-а и употребе црвеног меса у исхрани, у 15 студија је приказан 12% већи ризик од развоја CRC-а, при конзумацији више од 100 грама црвеног меса дневно, независно од пола. Изгледа да припрема меса на високим температурама, попут пржења и роштиља, ствара хетероцикличне аminer, полицикличне ароматичне хидрокарбоне и друге канцерогене материје које погодују развоју тумора (6). Радна група IARC је на основу постојања довољног броја доказа, класификовала месне прерађевине (нпр. кобасице, сланина, шунка, суво месо и друго месо) у 1. групу канцерогена, док је због постојања ограниченог броја доказа о канцерогености конзумације црвеног меса (говедине, свињетине, јагњетине, телетине, овчетине и слично) ова храна класификована у 2А групу вероватних канцерогена (26).

## **Прекомерна употреба алкохола**

У многим студијама су изнети сигурни докази да постоји позитивна корелација између конзумирања алкохолних пића и чешће појаве CRC-а. Наиме, у метаанализи 27 кохортних студија изнет је закључак да у поређењу са особама које не користе алкохол постоји значајан ризик за развој CRC-а чак и при умереном дневном уносу од 30 грама алкохола (око два пића дневно), као и код већег уноса (више од 4 пића дневно), док код конзумације до једног пића дневно такав ризик није доказан. Пића која садрже етанол повећавају ризик тако што утичу на продукцију канцерогених материја и мењају састав жучних киселина. Такође, дужа конзумација и већа количина алкохолних пића су у директној корелацији са вишом инциденцом CRC-а, код мушкараца (6).

## **Прекомерна телесна тежина и гојазност**

Гојазност или већи проценат масноће у телу, изражена већим BMI, већим обимом струка или односом обима струка и кукова, су доказано повезани са већим ризиком од настанка CRC-а. Гојазност повећава ниво лептина, који помаже расту и пролиферацији туморских ћелија CRC-а. Такође, у студији Stattin-а и коаутора је доказано да мушкарци са вишим нивоима лептина у серуму имају два пута виши степен ризика за развој колоректалног карцинома у поређењу са мушкарцима, који су имали нормалне серумске нивое лептина (27). Такође, гојазност је чешће повезана са типом 2 шећерне болести, хиперинсулинемијом и резистенцијом на инсулин, који су такође фактори ризика за настанак CRC-а. Повезаност је јаче изражена код мушкараца него код жена (6). У метаанализи 57 студија, у 38 студија је доказана позитивна корелација између повећаног BMI и већег ризика од настанка CRC-а, док у 6 студија није доказана повезаност. У 8 студија је доказана узајамна веза између BMI и CRC-а код мушкараца, што није потврђено и код жена, а у преосталих 5 студија резултати нису били повезани са полом испитаника. Ризик је био значајније изражен у категорији најгојазнијих, такође, гојазност је повезана са већом вероватноћом од смртног исхода код CRC-а (6).

## **Висина одраслих**

Развојни фактори који воде већем линеарном расту, означени као висина одраслих су један од значајних фактора ризика за настанак CRC-а. У метаанализи која је обухватила 11 студија, у 8 студија је доказана значајна позитивна корелација између висине одраслих и већег ризика од настанка CRC-а, у 1 студији корелација постоји али није значајна, док је у 1 студији није потврђена повезаност. У једној од студија приказана је неконзистентност резултата у односу на пол испитаника. Међутим, висина одраслих вероватно не утиче директно на настанак CRC-а, већ је она показатељ дејства негативних генетских, хормоналних, нутритивних, као и фактора околине који могу утицати на достигнуту висину у периоду пре завршетка раста. Такође, поменуто је да више особе имају дуже дебело црево па је самим тим и могућност изложености слузокоже мутагеним и канцерогеним агенсима већа (6, 7).

## **Социоекономски статус**

Лош социоекономски статус повезан је са повећаним ризиком за настанак CRC-а. У студији спроведеној на 7.676 пацијената са дијагностикованим примарним CRC-ом,

приказана је чак 30% виша стопа инциденце међу особама нижег образовног и социоекономског статуса у поређењу са највишим статусним групама, чак иако се у обзир узму други фактори ризика (28). У истраживању Doubeni-а и коаутора истиче се да ова разлика може бити последица веће учесталости потенцијалних фактора ризика, попут физичке неактивности, нездраве исхране, пушења, гојазности, као и нижа стопа спроведеног скрининга код групе са нижим социоекономским статусом, такође значајно доприносе разликама у ризику од настанка на CRC-а (29).

## Пушење

Епидемиолошке студије показују да је пушење повезано са повећаном инциденцом и морталитетом од CRC-а код оба пола. Пушење 40 цигарета (две кутије) дневно повећава ризик од настанка за 40% и дуплира ризик од смртог исхода код CRC-а (6). У великој метаанализи, Ordóñez-Mena и коаутора, која је обухватила податке из 14 кохортних студија приказано је да постоји позитивна корелација између пушења и лошије прогнозе код CRC-а (30). У другој метаанализи, Walter-а и коаутора, која је обухватила 16 студија пушење је такође било повезано са краћим преживљавањем након дијагностикованог CRC-а (31).

## Остали фактори ризика за CRC

Епидемиолошке студије показују да конзумирање интегралних житарица и хране која садржи дијетална влакна смањују ризик од настанка CRC-а. Наиме житарице представљају добар извор дијеталних влакана, она у цревима бивају ферментисана до кратколанчаних масних киселина, попут бутирата, који у експерименталним студијама показује антипролиферативне ефекте. Унос довољних количина дијеталних влакана смањује транзитно време столице кроз дебело црево, а самим тим је скраћено време контакта потенцијалних мутагена и ћелије слузнице. Осим тога, дијетална влакна превентивно делују успоравајући или спречавајући развој резистенције на инсулин, која је такође фактор ризика за настанак CRC-а (6). У метаанализи, која је обухватила 14 студија, у 10 од њих је приказано смањење ризика од настанка CRC-а од 13%, при дневном уносу најмање 400 грама млечних производа, док је у сличној метаанализи у 9 од 14 студија приказано смањење ризика од настанка CRC-а од 6%, при дневном уносу најмање 200 грама млека (6). Постоји група фактора, код којих подаци нису конзистентни, те се веза са CRC-ом сматра вероватном. Тако, употреба суплемената калцијума, употреба хране која садржи витамин С, редовно конзумирање рибе, мултивитаминских додатака, витамина Д вероватно штити и смањује ризик од настанка CRC-а. Такође, у метаанализи више студија изнето је да унос више од 100 грама дневно воћа и лиснатог поврћа вероватно смањује ризик од настанка CRC-а (6). Према подацима из истраживања Din-а и коаутора, употреба аспирина и нестероидних антиинфламаторних лекова (енглес. *Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs – NSAID*) може играти улогу у превенцији CRC-а. Изнети подаци у овом истраживању показују смањење ризика од настанка CRC-а за 30-40% при употреби аспирина (32). Препоручује се дуготрајна употреба (дуже од пет година) малих доза аспирина (најмање 75 mg дневно), да би се постигао пуни превентивни ефекат аспирина (6).

### 1.3. Значај појединих цитокина и имуномодулацијских протеина у патогенези колоректалног карцинома

Строму тумора поред туморских чине и ћелије попут фибробласта макрофага, ендотелних и других ћелије. Све ове ћелије међусобно комуницирају подсредством цитокина, који могу значајно утицати на степен развоја и прогресију CRC-а, било директним стимулисањем неопластичних ћелија или променом функције/активности ћелија туморске микросредине. Одређени цитокини инхибирају, док други подстичу онкогенезу CRC-а, те је неопходно познавати појединачни удео специфичних цитокина у развоју, прогресији и преживљавању туморских ћелија. Са једне стране, издваја се група инфламацијских посредника са специфичним антитуморским ефектима, док са друге стране имамо групу цитокина који изазивају неспецифичну, хроничну, протуморску упалу у микросредини CRC-а. Поред тога, постоје и цитокини са двоструком или недовољно јасном улогом (33).

#### Интерлеукин-1

Интерлеукин-1 (IL-1) је један од главних проинфламацијских цитокина, чија активација углавном покреће каскадно ослобађање других цитокина и медијатора инфламације. IL-1 продукују макрофаги, али и ћелије тумора и туморске микросредине (34). IL-1 $\beta$  се активира цепањем, које је посредовано каспазом, а настаје након активирања инфламазома богатог леуцином, као одговор ћелије на стрес или инфекцију (33). Ови инфламазоми играју важну улогу у развоју карцинома повезаног с колитисом (енглес. *Colitis Associated Carcinoma* – CAC). Наиме *in vivo* блокада IL-1 $\beta$  коришћењем рекомбинантног IL-1RA значајно је смањила број тумора у анималном моделу карцинома повезаног с колитисом (енглес. *Azoxymethane/Dextran sodium sulphate mouse model* – AOM/DSS), што указује на про-туморску улогу IL-1 $\beta$  у оваквом окружењу (33). IL-1 $\beta$  делује пролиферативно на ћелије тумора, као и на ћелије епитела црева, а експримирају га макрофаги и неутрофили у околини тумора. Осим тога, IL-1 $\beta$  олакшава регрутовање мијелоидних супресорних ћелија (енглес. *Myeloid Derived Suppressor Cells* – MDSCs) у сам тумор, што олакшава даљу прогресију тумора. Такође, IL-1 $\alpha$  из ћелија CRC-а појачава ангиогенезу модулацијом стромалних ћелија у микросредини тумора (33). Интерлеукин-1 се везује или за IL-1R $\alpha$  (IL1R1), који има дуги цитоплазматски део за пренос сигнала или за IL-1R $\beta$  (IL1R2), који може деловати као лажни рецептор. Након везања IL-1, IL-1R $\alpha$  формира комплекс са протеинима помоћног рецептора за IL-1 (IL1RAP), што активира молекуле IRAK и TRAF6 и нуклеарни фактор капа Б (NF- $\kappa$ B), JNK, AP-1 и p38–MAPK пут (35). Поред тога, IL-1 $\beta$  индукује активирање WNT сигналног пута фосфорилацијом GSK3 $\beta$ . Сви наведени сигнални путеви су кључни за генезу CRC-а (34). Недавна студија Cui-а и коаутора је показала да је комплекс IL-1 $\beta$ /IL-6 високо експримиран у микросредини CRC-а, што указује да овај комплекс удружено има значајан допринос у прогресији CRC-а (36). Поред тога, у студији Maihöfner-а и сарадника приказана је повезаност експресије COX-2 са вишим нивоима IL-1 $\beta$ , IL-6 и p65 у хуманим ћелијама CRC-а. Такође, резултати ове студије потврђује улогу NF- $\kappa$ B у контроли транскрипције гена за COX-2, који има анти-апоптоличну улогу у туморским ћелијама што олакшава развој и напредовање CRC-а (37).



### Интерлеукин-4

Интерлеукин-4 (IL-4), из групе Th2 цитокина, покреће низ каскадних реакција везањем за IL-4R $\alpha$ , укључујући активацију Јанус киназа ЈАК1 и ЈАК3, које затим врше фосфоризацију активатора транскрипције STAT6. Активирани хомодимери STAT6 се транслоцирају у једро, где се везују за промоторе гена одговорних за испољавање различитих биолошких функција IL-4. Сигнална осовина IL4/IL4R снажно појачава миграцију, инвазију, преживљавање и пролиферацију ћелија карцинома (38). У студији Di Stefana и коаутора, приказани су молекуларни механизми хеморезистенције посредоване IL-4, која се постиже избегавањем апоптозе аутокриним продукцијом IL-4. Такође, истраживање је проширено и на сурвивин или BIRC-5 (енглес. *Baculoviral IAP repeat-containing protein 5*), још један инхибитор апоптозе који је експримиран у туморским ћелијама (39). Аутори су приказали да је сурвивин, протеин са значајним функцијама у апоптози и контроли митотске прогресије, у матичним ћелијама CRC-а, контролисан IL-4 сигналним путем, при чему IL-4 повећава ниво сурвивина. Примена лефлуномида, инхибитора STAT6 или неутрализација цитокина су били у корелацији са бољом прогнозом код оболелих од CRC-а (39).

### Интерлеукин 10

Интерлеукин 10 (IL-10) је цитокин са имуномодулаторним и регулаторним функцијама, који показује и анти-туморске и про-туморске карактеристике (33). У студији Abtahi-а и сарадника је приказано да улога IL-10 у патогенези и напредовању CRC-а зависи од миљеа микрооколине тумора, као и да постоји двострука корелација између серумских концентрација IL-10 у серуму и настанка и прогресије CRC-а. Нижи серумски нивои IL-10 били су повезани са већим ризиком од настанка болести, док су виши серумски нивои били су повезани са лошијом прогнозом (40). У студији Станилова и сарадника приказани резултати указују на значајно појачану експресију гена за IL-10 код оболелих од CRC-а у поређењу са контролном групом испитаника. У истој студији приказано је и да су преоперативне вредности mRNA за IL-10 код ових болесника значајно више у поређењу са њиховим вредностима након оперативног уклањања тумора или са вредностима код контролне групе испитаника. Ови налази указују на протуморску улогу IL-10 код болесника са колоректалним карциномом (41). Супротно томе, истраживања спроведена код животињама употребом анималног модела CRC-а, попут истраживања Berg-а и коаутора приказано је да су IL-10 дефицијентни мишеви много подложнији развоју интестиналних тумора у поређењу са контролном групом WT мишева (42).

### Интерлеукин-17

Породица IL-17 има шест чланова, означених као IL-17A, IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E и IL-17F, међу којима је детаљно истражена и позната само улога IL-17A и IL-17F у развоју CRC-а (33). У студији Hyun-а и сарадника, на анималном моделу је приказано да дефицит IL-17A парцијално штити од развоја CRC-а, како при артефицијалном изазивању колитиса код мишева, применом AOM/DSS модела, тако и код ArcMin/+ мишева (43). Такође, у овој студији је приказано да постоји вероватна веза између IL-17A и IL-6 експресије, тако да IL17A<sup>-/-</sup> мишеви имају истовремено значајно ниже нивое IL-6 при изазивању експерименталног САС применом AOM/ DSS модела (43). Имунске ћелије, из групе CD4<sup>+</sup> Th17 лимфоцита су главни извор IL-17A, који се по ослобађању везује за дволанчани хетеродимерни рецептор, који садржи IL-

17RA и IL-17RC ланац (44). IL-17 рецептор се експримира на различитим ћелијама у микросредини тумора, попут хематопоетских, фибробласта и епителних ћелија (44). У студији Wang-а и сарадника, приказано је да пренос сигнала са активiranог рецептора за IL-17 може директно деловати на трансформисане ћелије епитела дебелог црева, што је довољно да подстиче даљи развоја CRC-а (44). У овој студији је приказано и да стимулација IL-17RA активира ERK, p38 MAPK и NF-κB путеве преноса сигнала и олакшава пролиферацију туморски измењених ентероцита, који су недавно изгубили експресију APC тумор супресорског гена. Мада стимулисање IL-17RA утиче и на производњу IL-6, овај механизам даје само делимичан допринос туморигенези CRC-а (44). С друге стране, супротно улози IL-17A, IL-17F показује анти-туморска својства (33). У студији Tong-а и сарадника приказано је да је IL-17F изражен у нормалном ткиву епитела дебелог црева, али му је експресија значајно смањена у ткиву CRC-а. Употребом ћелијских линија карцинома дебелог црева (HCT116) и мишева са дефицитом IL-17F (-/-), аутори ове студије су доказали да IL-17F има инхибиторну улогу у развоју CRC-а *in vivo*, највероватније посредством инхибиције туморске ангиогенезе (45).

### Интерлеукин 33

Интерлеукин 33 (IL-33), члан велике IL-1 породице цитокина, ослобађа се након оштећења ендотелних или епителних ћелија (46). IL-33 игра значајну улогу у регулацији имуног одговора, као и у патогенези CRC-а. Подаци из многобројних студија показују да IL-33 инхибира имунски антитуморски одговор, узрокује промене у туморској строми и олакшава ангиогенезу, што укупним ефектима олакшава развој CRC-а, у чему посебну улогу има IL-33/ST2 сигнални пут (46). Тако, у студији Maywald-а и сарадника, на анималном моделу коришћењем ArcMin/+ мишева са дефицитом IL-33, доказан је мањи степен развоја тумора у односу на контролну групу, док је употреба ST2 блокирајућих антитела доводила до заустављања развоја ћелија CRC-а (47). У истраживању Fang-а и коаутора је приказано да се IL-33 испољава на туморским ћелијама, као и на другим ћелијама туморске микросредине, попут ћелија васкуларног ендотела. Такође, приказано је да примена IL-33 и његова прекомерна експресија убрзавају раст ћелија CRC-а. Повећана концентрација IL-33 утицала је на стварање заштитног ћелијског омотача, што је онемогућавало апоптозу ћелија CRC-а индуковану хемотерапијом. IL-33 активира NANOG, NOTCH3 и OCT3/4 гене активацијом преко ST2 сигналног пута, тако што је индуковао фосфоризацију терминалних киназа (енглес. *c-Jun N terminal kinase* – JNK) и појачаног везивања за промоторне регионе наведених гена (48). Поред тога, веће концентрације IL-33 су узроковале накупљање макрофага у туморској микрооколини, њихову стимулацију ка продукцији простагландина E2, који је олакшавао раст туморских ћелија. У овој студији, такође је приказана и позитивна корелација између појачане експресије IL-33 и лошијег преживљавања пацијената са CRC-ом. Према ауторима, IL-33 олакшава канцерогенезу на два горе описана начина (48). Према Li-ју и сарадницима IL-33 олакшава пролиферацију ћелија CRC-а зависну од COX2/PGE2, тако што преко ST2 рецептора појачава експресију COX2 посредством NF-κB молекула (49). У студији Choi-а и сарадника први пут су изнети докази да IL-33 појачава запаљенске реакције ендотелних ћелија делујући као регулатор транскрипције p65 субјединице NF-κB комплекса (50). Резултати истраживања Zhang-а и сарадника су показали да већа експресија IL-33 у туморским ћелијама, преко активације ендотелних ћелија, узрокује појачану продукцију цитокина, мобилизацију леукоцита, промене у туморској микросредини и ангиогенезу, што потенцијално олакшава раст ћелија CRC-а и њихово

метастазирање (51). Поменути протуморски ефекти IL-33 углавном су посредовани везивањем за ST2 рецептор (познатог и као IL-1RL1), који постоји у два облика: солубилни облик (sST2), који делује као лажни рецептор и који се не активира везивањем за IL-33 (52); и мембрански облик (ST2), који активира MiD88/NF- $\kappa$ B сигнални пут и доводи до испољавања ефеката првенствено на мастоцитима, Th2 и Treg ћелијама (53). У студији Akimoto-а и коаутора приказано је да је експресија sST2, солубилне форме рецептора за IL-33, у обрнутој корелацији са растом и метастазирањем малигних ћелија CRC-а (52). У овој студији је такође приказано да sST2 инхибира IL-33 узроковану ангиогенезу, Th1- и Th2-одговор, инфилтрацију макрофага и њихову M2 поларизацију (52).

### Фактор некрозе тумора

Многобројне студије показују да фактор некрозе тумора (енглес. *Tumor Necrosis Factor* – TNF), као проинфламацијски цитокин игра значајну улогу у запаљенским процесима колона и канцерогенези CRC-а. У студији Popivanova и сарадника, на анималном моделу, испитивањем WT мишева након администрације AOM/DSS приказан је развој многобројних тумора, који је праћен појачаном експресијом TNF- $\alpha$  и његовог главног рецептора p55 (TNF-Rp55) (54). Са друге стране, мишеви који су били дефицијентни у TNF-Rp55 након третирања са AOM/DSS имали су мањи степен оштећења мукозе колона, инфилтрације макрофага и неутрофила и стварања тумора. Такође у истој студији, постигнути су слични протективни ефекти применом специфичних блокатора TNF- $\alpha$  код WT мишева након третмана са AOM/DSS (54). У студији Zins-а и коаутора приказано је да TNF- $\alpha$  који потиче из ћелија CRC-а стимулише продукцију TNF- $\alpha$ , CSF-1 (енглес. *Colony-Stimulating Factor* – 1) у макрофагима, а да затим CSF-1 у макрофагима индукује стварање фактора раста ендотела крвних судова – VEGF-A (енглес. *Vascular Endothelial Growth Factor A*) и ензима матриксне металопроотеиназе тип 2 (енглес. *Matrix Metalloproteinase 2* – MMP2) на аутокрини начин (55). У студији Buhrmann-а и коаутора доказано је да експресија TNF- $\beta$  и TNF- $\beta$ -рецептора, попут TNF- $\alpha$ , може активирати проинфламацијски транскрипциони фактор NF- $\kappa$ B и гене регулисане подсредством NF- $\kappa$ B, који су укључени у процесе пролиферације, инвазивности, метастазирања и преживљавања туморских ћелија. Ресвератрол може да блокира ову активацију NF- $\kappa$ B остварену преко TNF- $\beta$ /TNF- $\beta$ -рецептора (56).

### Интерферон гама

Улога интерферона гама (IFN- $\gamma$ ) у антитуморском имунском одговору добро је позната (57). У многим студијама истакнута је веза између IFN- $\gamma$  и CRC-а. Тако, у студији Wang L и коаутора, испитан је значај дефицита ендеогеног IFN- $\gamma$  на анималном моделу, коришћењем варијанте Арс (Min/+) мишева, хетерозиготне за IFN- $\gamma$  (+/-). Ови мишеви су развили велики број аденома, док је код 41% развило аденокарцином колона. Молекуларним анализама утврђено је да делеција IFN- $\gamma$  олакшава активацију EGFR/Erk1/2 и WNT/ $\beta$ -catenin сигналних путева (58). У истој студији је приказано да недостатак рецептора IFN $\gamma$ R1 на HT-29 ћелијама CRC-а индукује њихову пролиферацију, док примена егзогеног IFN- $\gamma$  инхибира раст малигних ћелија (58). IFN- $\gamma$  делује на ћелије CRC-а тако што индукује STAT1 фосфорилацију и инхибира EGFR/Erk1/2 и WNT/ $\beta$ -catenin сигналне путеве, на тај начин ограничавајући пролиферацију малигних ћелија (58). У истраживању Katlinski и коаутора, приказано је да нисходна регулација рецептора интерферона гама типа 1 – IFNAR1 омогућава

успостављање за раст тумора повољнијег микроокружења, што је уочено и код хуманих туморских ћелија и на мишјем моделу CRC-а. Губитак IFNAR1 у строми тумора имао је кључну улогу у формирању имуно-привилегованог окружења, што је подстакло бржи раст и развој малигнућ ћелија CRC-а и било је повезано са лошијом прогнозом код оболелих од CRC-а (59). Генетска стабилизација IFNAR1 побољшала је преживљавање цитотоксичких Т лимфоцита (енглес. *cytotoxic T lymphocytes* – CTLs), повећала ефикасност имунотерапије и инхибицију PD-1 (енглес. *programmed death* – 1) рецептора. Слично, фармаколошка стабилизација IFNAR1 инхибирала је даљи раст тумора (59). У недавној студији Wang QS и коаутора, изнето је да IFN- $\gamma$  утиче на производњу слободних кисеоничних радикала (енглес. *reactive oxygen species* – ROS) у митохондријама ћелија CRC-а, што води аутофагији и апоптози. Продукција ROS је зависила од активирања цитосолне фосфолипазе A2 (енглес. *cytosolic phospholipase A2* – cPLA2), док је примена антиоксиданса SS31 и/или cPLA2 инхибитора AACOCF3 доводила до прекидања продукције ROS индукованих IFN- $\gamma$  и заустављала процес аутофагије и апоптозе (60).

### Галектин– 1 (Gal–1)

Галектини су молекули из породице лектина, који имају различите биолошке активности. Своје функције могу остваривату екстрацелуларно интеракцијама са гликопротеинима и гликолипидима на ћелијској површини или у екстрацелуларном матриксу, као и интрацелуларно интеракцијама са цитоплазматским или нуклеарним протеинима утичући на тај начин на различите сигналне путеве у ћелији (61). Галектини су широко распрострањени у различитим ткивима. Галектин 1, 3, 4 и 8 се експримирају у ткивима дебелог црева и ректума, и њихова експресија је значајно измењена код CRC-а и позитивно корелира са степеном његовог развоја и метастазирањем (62). Такође, галектини играју значајну улогу у неопластичној трансформацији и преживљавању туморских ћелија, процесу метастазирања тумора, процесима апоптозе и ангиогенезе. Као имуномодулацијски протеини, они међају инфламаторни и имунски одговор домаћина, што може помоћи туморским ћелијама да избегну имунски надзор (61, 62). У студији Zhu-а и сарадника приказана је различит образац експресије галектина-1 (Gal-1), и она је у ћелијама неизмењене мукозе дебелог црева била 0%, у аденому дебелог црева 8%, у CRC-у 66%, док је код метастатског облика CRC-а износила 86%. Такође, експресија галектина-1 била је већа код хистолошки лошије диферентованих тумора у поређењу са умерено или добро диферентованим туморима, као и код инвазивних форми CRC-а у поређењу са неинвазивним формама тумора. У студији је доказана позитивна корелација између експресије галектина-1 и присутности метастаза CRC-а у лимфним чворовима (63). У студији Wu KL и коаутора потврђена је позитивна корелација између серумских нивоа циркулишућег галектина-1 и његових везујућих протеина, попут 90K/Mac-2BP, са тежином болести и присутвом метастаза CRC-а (64). Са друге стране, у студији Ito-а и коаутора је доказано, коришћењем анималног модела карцинома колоне (CT26) са плућним метастазама, да инхибиција галектина-1 смањује број метастаза у плућима (65). Галектин-1 је промотор апоптозе и изгледа да је индуковањем апоптозе активираних Т лимфоцита олакшана даља прогресија и раст туморских ћелија CRC-а. Наиме, у студији Kovacs-а и коаутора је приказано да галектин-1 када је експримиран на површини туморских ћелија индукује апоптозу Т лимфоцита, што није био случај када су коришћене туморске ћелије без експримираног галектина-1 на својој површини. Поред тога, уклањање галектина-1 или смањење његове експресије на површини туморских ћелија узроковало је смањење апоптозе Т лимфоцита. Налази ове студије

указују да галектин-1 продукован у туморским ћелијама доприноси развоју процеса „самоодбране тумора“ (66). У студији Satelli-а и коаутора је приказано да је експресија галектина-1 у ћелијама CRC-а негативно регулисана на генском нивоу подсредством хиперметилације промотора. Поред тога приказано је да интрацелуларни галектин-1 може зауставити ћелијски циклус и индуковати апоптозу у ћелијама CRC-а уз истовремену негативну регулацију WNT и NF- $\kappa$ B сигналних путева. Резултати из ове студије указују да смањено присуство галектина-1 у ћелијама CRC-а омогућава њихову пролиферацију и избегавање апоптозе (67). Стварање нових крвних судова, односно ангиогенеза у туморском ткиву је један од кључних процеса у прогресији карцинома. У истраживању Thijssen-а и сарадника приказано је да туморске ћелије могу подстаћи ангиогенезу у туморском ткиву путем појачане секреције галектина-1. Примећено је да је раст тумора и ангиогенеза у туморском ткиву значајно успорена или потпуно ометена у различитим анималним моделима тумора са коришћењем мишева без експресије галектина-1 (енглес. *galectin-1-null*; *gal-1(-/-) mice*). Међутим, ангиогенеза у туморском ткиву је мање ометена ако туморске ћелије експримирају и секретују веће количине галектина-1. Поред тога, у истој студији приказано је да, додавање галектина-1 у културу ендотелних ћелија специфично активира H-Ras сигнални пут и преко Raf/Mek/Erk (енглес. *Raf/mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase*) каскаде стимулише миграцију ендотелних ћелија и њихову пролиферацију. Такође, поменута активација може бити блокирана применом ангинекса, инхибитора галектина-1, при чему је отежана H-Ras мембранска транслокација и ослабљена Raf/Mek/Erk каскадна фосфорилација. Објављени резултати потврђују улогу галектина-1 као важног фактора у туморској ангиогенези (68).

### Галектин– 3 (Gal–3)

Галектин-3 (Gal-3) је присутан у различитим епителним и имунокомпетентним ћелијама, где игра улогу у многим биолошким процесима, укључујући раст ћелија, њихову диференцијацију, као и процесе ангиогенезе и апоптозе (62). Резултати многих студија указују да је експресија Gal-3 је у позитивној корелацији са агресивнијим обликом болести и присутним метастазама тумора. Тако је, у недавној метаанализи Wang-а и коаутора, која је обухватила 15 истраживања са више од 1.661 случајева, приказано да су у туморском ткиву CRC-а присутне више вредности Gal-3 у поређењу са нивоима у нормалном ткиву дебелог црева. Такође, је приказано да је експресија Gal-3 у корелацији са прогресивнијим обликом болести (III и IV стадијум по TNM класификацији), са присутном инвазијом крвних судова, са вишим нивоима ембрионалних антигена карцинома (енглес. *Carcinoembryonic antigen – CEA*) и са лошијим општим преживљавањем (енглес. *overall survival – OS*) оболелих од CRC-а (69). У студији Јовановића и коаутора приказано је да виша концентрација галектина-3 у фецесу болесника оболелих од колоректалног карцинома позитивно корелира са прогресивнијим обликом болести. Такође, код ових болесника је забележен виши нуклеарни градус тумора, слабија диференцијација туморског ткива и чешће присуство метастаза. Поред тога, у овој студији је приказано да однос галектин-3/фактор некрозе тумора- $\alpha$  у серуму и фецесу, има више вредности код оболелих од колоректалног карцинома са тежим и напреднијим обликом болести, што у закључку указује на улогу галектина-3 у ограничавању покренутих проинфламацијских процеса (70). Као што је већ наглашено, стварање нових крвних судова, односно ангиогенеза у туморском ткиву је један од кључних процеса у прогресији карцинома. Као и галектин-1, и галектин-3 олакшава процес ангиогенезе у ткиву тумора (62). У студији Yang-а и коаутора наглашено је да се утицај галектина-3 на ангиогенезу зависи од његове интеракције

са аминоксиптидазом N/CD13 (енглес. *aminopeptidase N/CD13* – APN), ензимом са површине ендотелних ћелија, који је укључен у једном од првих корака у процесу ангиогенезе (71). Слично овој студији, у истраживању Markowska и сарадника, је приказано да је ангиогенеза посредована галектином-3 последица његовог утицаја на активност фактора раста васкуларног ендотела – VEGF и основног фактора раста фибробласта (енглес. *basic fibroblast growth factor* – bFGF). Наиме, галектин-3 се везује за avb3 интегрин на површини ендотелних ћелија и подсредством VEGF и bFGF покреће миграцију ендотелних ћелија и формирање нових крвних судова. Са друге стране, у истој студији приказано је смањивање *in vitro* ангиогенезе посредоване VEGF-ом и bFGF-ом када је примењен инхибитор галектин-3 или је тестирање извршено на Gal-3(-/-) дефицијентним животињама (72). Код пацијената са различитим врстама карцинома, укључујући и колоректални карцином, често је повећана концентрација слободног галектина-3 у циркулацији. У студији Yu-а приказано је да наведене промене концентрације галектина-3 у циркулацији код пацијента са карциномом могу значајно допринети метастатском ширењу и дисеминацији малигних ћелија, тако што је побољшана њихова способност адхезије за ендотел крвних судова и олакшано избегавање имунолошког надзора домаћина (73). Промене у експресији галектина су честе код карцинома у гастроинтестиналном тракту. Резултати многих истраживања, потврђују важну улогу ових мултифункционалних молекула у регулацији развоја, прогресији и метастазирању CRC-а (62).

#### **1.4. Прогресија болести и најчешћи симптоми и знаци колоректалног карцинома**

У почетним фазама CRC- је често без симптома, што повећава значај скрининга код особа из ризичних група. Прогресијом болести, и растом туморске масе може настати опструкција црева или крварење. Такође се због губитка крви могу јавити знаци и симптоми анемије попут слабости, губитка даха, необјашњивог умора. Поред овога, могу се јавити и додатни знаци који укључују: видљиво крварење из ректума, појаву крви у столицу након пражњења црева, појаву тамне или црне столице, промене у пражњењу црева или облика столице, грчеви или нелагодност у доњем делу трбуха, осећај недовољне испражњености црева, затвор или проливи који трају по неколико дана, смањење апетита или необјашњиви губитак телесне тежине. Правовремена процена симптома и знакова повезаних са CRC-ом је од суштинског значаја. То важи чак и за одрасле особе млађе од 50 година, међу којима је учесталост CRC-а ретка, али је у сталном порасту чак и код оних са просечним ризиком (74). У наредним пасусима ће појединачно бити описани хематолошки поремећајима, попут анемије и тромбозе који могу пратити прогресију CRC-а.

##### **1.4.1. Повезаност анемије и колоректалног карцинома**

Према критеријумима Светске здравствене организације (WHO) анемија је клиничко стање које се код мушкараца дефинише вредностима хемоглобина испод 130 g/L, док је код жена за дијагностиковање анемије потребно да вредности Hb буду ниже од 120 g/L (75). Анемија је честа код пацијената са CRC-ом и може бити један од најчешћих екстраинтестиналних знакова болести, присутним код 30%–75% од свих пацијената (76). У студији Edna и сарадника приказано је да се преваленца анемије разликује у

зависности од локализације тумора и у корелацији је са удаљеношћу тумора од ректума, тако је анемија пронађена код 74,7% болесника са CRC-ом локализованим у цекуму и асцедентном колону, код 57,1% у трансферзалном делу колона, 40,0% у сигмоидном делу и 30,5% код болесника са тумором у ректуму (77). У истој студији приказано је у мултиваријабилној анализи да су године старости, локализација тумора и Т-стадијум болести повезани са настанком анемије, док хистолошка диференцијација тумора, N и M-стадијуми болести, период пријема, дужина трајања симптома и присуство ректалног крварења нису повезани са настанком анемије (77). У студију Но-а и сарадника се потврђује да се анемија чешће јавља код пацијената са CRC локализованим у проксималном (десном) делу колона, док се као додатни фактори ризика за настанак анемије наводе припадност женском полу и тумори дијаметра већег од 3 центиметара (78). Анемија се може класификовати према средњем волумену еритроцита (енглес. *mean corpuscular volume* – MCV) на микроцитну анемију са MCV < 80 f/L, нормоцитну анемију MCV 80–100 f/L и макроцитну анемију са MCV > 100 f/L (79). У више недавних студија су приказани резултати о повезаности анемије, било да се ради о микроцитној (80) или нормоцитној анемији (81), са лошијим исходом болести, краћим општим или тумор специфичним преживљавањем (енглес. *cancer specific survival* – CSS), како због постојања системске инфламације тако и због лошије исхрањености ткива (80, 81). Тако је, у студији Tokunaga и коаутора приказано да је преоперативно дијагностикована анемија била значајно повезана са лошијим општим преживљавањем и краћим преживљавањем без релапса болести (енглес. *relapse-free survival* – RFS). Посебно је микроцитни тип анемија био повезан са трендом значајно краћег RFS ( $p = 0,0648$ ) у поређењу са осталим типовима анемије. У закључку ове студије се истиче да се преоперативна анемија, као и подтип анемије могу користити као прогностички фактори за исход CRC-а (80). Слични резултати приказани су и у истраживању McSorley-а и сарадника, где је извршена процена преоперативне системске инфламације преко модификованог Glasgow прогностичког скорa (енглес. *modified Glasgow prognostic score* – mGPS) и повезаност типа анемије са CSS. Од свих пацијената са дијагностикованим CRC-ом, код око 10% је дијагностикована микроцитна, док је 23% имало нормоцитни тип анемије, при чему је нормоцитна анемија била у значајној корелацији са краћим CSS (81).

Анемија код пацијената са CRC је најчешће узрокована хроничним крварењем из тумора; било да се ради о окултном крварењу из тумора проксималног колона или о видљививом крварењу у столици из тумора дисталног колона или ректума (77). Међутим поред крварења, у више студија је описано да анемија такође може настати као последица системског инфламацијског одговора на тумор, праћеним ослобађањем ингламацијских цитокина, попут фактора некрозе тумора алфа (TNF- $\alpha$ ), гама интерферона (IFN- $\gamma$ ), и интерлеукина (IL-1, -6, -8 и -10), који помажу развоју анемије (76, 82, 83). Ови медијатори инфламације узрокују настанак анемије преко различитих патофизиолошких механизма, од којих се најчешће наводе: 1. смањење полуживота еритроцита услед већег степена њиховог оштећења и повећане фагоцитозе еритроцита настале након јаче активације макрофага у јетри и слезини (под дејством TNF- $\alpha$ ); 2. снижена синтезе еритропоетина у бубрезима као неадекватан одговор на тежину анемије; 3. ослабљени одговора ћелија црвене крвне лозе на секретовани еритропоетин (под дејством IFN- $\gamma$ , IL-1 и TNF- $\alpha$ ); 4. директне инхибиције пролиферације и диференцијације прогениторских ћелија еритроцитне лозе (под утицајем IFN- $\gamma$ , IL-1, TNF- $\alpha$ ,  $\alpha$ -1-антитрипсин); 5. настанка патолошке хомеостазе гвожђа, услед повећане експресије двовалентног металног транспортера типа 1 (под дејством IFN- $\gamma$ ) и трансферинских рецептора (под дејством IL-10) у макрофазима, смањене експресије

феропортина 1 у ентероцитима и макрофазима под дејством IFN- $\gamma$  и хепцидина (секретованог у јетри под утицајем IL-6) и појачане синтезе феритина (под дејством TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-10) (76, 82).

Као што је већ изнето анемија може бити последица системског инфламацијског одговора на тумор, међутим са друге стране анемија може имати утицај на саму малигну болест, као и на продукцију цитокина. У студији Koukourakis-a и коаутора приказано је да ниже вредности хемоглобина узрокују смањену оксигенацију крви, што може индуковати хипоксију туморског ткива. Хипоксија преко усходне регулације фактора-1 алфа индукованог хипоксијом (енглес. *hypoxia-inducible factor-1 alpha* – HIF-1 $\alpha$ ) заузврат може активирати даљу прогресију тумора. Тако, активација молекуларне каскаде везане за HIF, било да је узрокована хипоксијом код анемије или не- везано за анемију, повећава агресивност тумора покретањем анаеробног метаболизма (енглес. *lactate dehydrogenase 5* – LDH5; *glucose transporter 1* – GLUT1) и интратуморалне ацидозе или активирањем гена повезаних са некрозом (енглес. *bcl-2 19 kDa interacting protein 3* – BNIP3) и ангиогенезом (VEGF) (84).

Поред добро познате улоге горе наведених цитокина у патогенези анемије и њиховог утицаја на хематопоезу у литератури постоје, додуше малобројни, подаци из истраживања о директном или индиректном утицају других цитокина и имунорегулаторних протеина на хематопоезу (85-88).

#### 1.4.2. Значај тромбозе код колоректалног карцинома

По дефиницији, реактивна тромбоза представља повишени број тромбоцита ( $\geq 450 \times 10^9/L$ ) који настаје као секундарни поремећај и према подацима из литературе може бити узрокована недостатком гвожђа, акутном инфекцијом, малигним болестима или хроничним инфламацијским поремећајима (89). У новије време, карциноми се све чешће повезују са настанком паранеопластичне реактивне тромбозе (90). Тромбоза, као паранеопластични синдром, често прати развој и метастатску дисеминацију тумора, и забележена је код чак 10–57% оболелих од карцинома (91). У више недавних метаанализа изнети су подаци о повезаности тромбозе са лошијом прогнозом и краћим преживљавањем оболелих од CRC-а (92-94). У метаанализи Wang-a и сарадника, која је обухватила 30 студија и укупно 9.129 пацијената, приказано је да је тромбоза у блиској корелацији са лошијом OS оболелих од CRC-а у поређењу са оболелима од CRC-а и нормалним бројем тромбоцита. Аутори ове метаанализе у закључку износе да тромбоза може бити јефтин и неинвазиван показатељ лошије прогнозе код оболелих од CRC-а, посебно у погледу краћег OS (92). У сличној метаанализи Long-a и сарадника приказано је да у поређењу са нормалним бројем тромбоцита, повећани број тромбоцита пре почетка лечења био је повезан са краћим OS, као и краћим преживљавањем без рецидива болести (енглес. *disease-free survival* – DFS) код оболелих од CRC-а. Слични резултати OS и DFS добијени су код већине анализираних подгрупа оболелих од CRC-а (93). У метаанализи Gu-a и сарадника, која је обухватила 16 студија и укупно 5.619 пацијената, приказано је да је тромбоза била повезана са краћим општим и карцином специфичним преживљавањем, као и са краћим периодом без рецидива болести. Опште преживљавање код оболелих од CRC-а са тромбозом било је скраћено без обзира на њихов клинички стадијум болести или етничку припадност. Поред тога, тромбоза је била сигнификантно повезана са припадношћу женском полу, са локализацијом тумора у колону, са стадијумом T3 и T4, са присутношћу удаљених метастаза или метастаза у лимфним чворовима, са лошијом



хистолошком диференцијацијом тумора и са захваћеношћу лимфних судова. У закључку ове метаанализе аутори истичу да се присуство тромбозе сматра негативним прогностичким фактором код оболелих од CRC-а, који се може користити као користан клинички маркер за лакшу процену ризика и управљање постоперативним лечењем (94). Поред горе наведеног, у студији Sasakia и коаутора анализиран је утицај тромбозе на прогнозу болести код оболелих од CRC-а у поређењу са другим клиничко-патолошким карактеристикама болести. Приказани резултати указују да је CSS код оболелих од CRC-а са тромбозом било значајно краће у поређењу са оболелима од CRC-а без тромбозе, што се нарочито односило за групу болесника у III стадијуму CRC-а. Мултиваријантна анализа показује да је преоперативна тромбоза независан прогностички фактор лошијег CSS оболелих од CRC-а (95). У ретроспективној студији Josa и сарадника евалуиране су вредности преоперативне тромбозе као потенцијалног прогностичког маркера код метастатског облика колоректалног карцинома у јетри (енглес. *liver metastasis of colorectal cancer – mCRC*). Опште преживљавање оболелих од mCRC-а са тромбозом било је значајно краће и у униваријатној и у мултиваријатној анализи, те аутори ове студије закључују да број тромбоцита вредан прогностички показатељ OS и код пацијената са mCRC-ом (96).

У раду Lin-а и коаутора, приказана је могућа повратна петља у интеракцији између тромбоцита и туморских ћелија, уз постојање међусобне везе између раста/метастазирања тумора и тромбозе/активације тромбоцита. Наиме, описани су специфични молекулски механизми којима туморске ћелије директно или индиректно активирају тромбоците, док истовремено преко појачаног ослобађања специфичних цитокина узрокују настанак тромбозе. Са друге стране, повећани број активираних тромбоцита промовише даљи раст тумора, стимулише ангиогенезу у туморском ткиву и метастазирање (90). Метастазирање је олакшано заштитом туморских ћелија од утицаја NK ћелија током интраваскуларне фазе и помагањем процеса екстравазације циркулишућих туморских ћелија (97). Такође, изгледа да многобројни солубилни фактора ослобађени у туморском ткиву из активираних тромбоцита значајно повећавају способност миграцију и пролиферације туморских и ендотелних ћелија, олакшавајући на тај начин раст тумора, метастазирање и ангиогенезу (97).

Различити хуморални фактори, медијатори и цитокини повезани са малигном болешћу утичу на прекомерно стварање тромбоцита код болесника са тумором и на тај начин доприносе настанку појачане тумором стимулисане тромбоцитопоезе. Међу њима су стимулишући фактор гранулоцитних колонија (енглес. *granulocyte colony-stimulating factor – G-CSF*), стимулишући фактор гранулоцитно-макрофагних колонија (енглес. *granulocyte macrophage colony-stimulating factor – GM-CSF*), тромбопоетин (енглес. *thrombopoietin – TPO*) (91), као и IL-1, IL-3, IL-6, IL-11, *leukemia inhibitory factor*, KitL, и *oncostatin M* (97). Поред добро познате улоге TPO, многе раније студије су се бавиле истраживањем директног или индиректног утицаја других цитокина на процес мегакариоцитопоезе (98-100).

## 1.5. Преживљавање код колоректалног карцинома

Стопе преживљавања оболелих од колоректалног карцинома се такође веома разликују широм света, што је највероватније последица постојања значајних

глобалних и регионалних разлика у доступности здравствених услуга, дијагностици и лечењу (10-12). Према подацима Америчког друштва за карциноме, релативна стопа једногодишњег преживљавања износи 83,4%, стопа 5-годишњег преживљавања износи 64,9%, док у периоду од 10 година након постављања дијагнозе преживљавање износи 58,3% (101). Преживљавање зависи и од стадијума када је CRC дијагностикован (2). Када се CRC дијагностикује у раној фази, стопа 5-годишњег преживљавања износи чак 90,3%. Међутим, само 39% тумора се дијагностикује у овој фази болести, углавном због недовољне стопе примене превентивног скрининга ризичних група. Код карцинома са захваћеношћу регионалних лимфних чворова или околних органа стопа 5-годишњег преживљавања пада на 70,4%, док је у случају постојања метастаза и ширења болести на удаљене органе стопа преживљавања само 12,5% (101). У недавном истраживању Allemanni-а и сарадника, извршена је анализа података о стопама преживљавања од CRC-а, који су регистровани у 67 земаља. Подаци су се односили на 25,7 милиона одраслих (старости 15–99 година) и 75.000 деце (узраста 0–14 година) којима је дијагностикован CRC-ом у периоду 1995–2009 (102). Стопа 5-годишњег преживљавања била је већа од 60% у северној Америци, Океанији, у 12 европских земаља и неколико земаља централне и јужне Америке и у Азији. Стопе су биле 40–49% у Аргентини, Бугарској, Чилеу, Колумбији, Летонији и Русији, а мање од 40% у Индији, Индонезији и Монголији. У већини земаља, стопа 5-годишњег преживљавања од CRC-а је порасла, упоређујући периоде 1995–1999. и 2005–2009, осим у Аргентини и на Кипру (102).

## 2. ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА

### А. ЦИЉ СТУДИЈЕ

**Основни циљ** студије: анализирати системске концентрације цитокина и имуномодулацијских протеина (IL-1, IL-4, IL-10, IL-17, IL-33, галектина-1, галектина-3, TNF- $\alpha$  и INF- $\gamma$ ) и клиничко-патохистолошке карактеристике болести, и проценити њихову повезаност са анемијом, односно тромбозом, код болесника CRC-ом.

Узимајући у обзир задати циљ изведени су студијски задаци:

У експерименталним и контролним групама корелирати:

- 1) клиничко-патохистолошке карактеристике (нуклеарни и хистолошки градус, степен инвазије лимфних и крвних судова, TNM стадијум болести, број детектованих метастаза у плућима, јетри или перитонеуму),
- 2) концентрације биохемијских белега малигне болести (AFP, CEA, CA 19-9) и
- 3) системске концентрације цитокина и имуномодулацијских протеина (IL-1, IL-4, IL-10, IL-17, IL-33, галектина-1, галектина-3, TNF- $\alpha$  и INF- $\gamma$ )

са присуством или одсуством анемије и тромбозе.

### Б. ХИПОТЕЗЕ СТУДИЈЕ

1. Клиничко - патохистолошке карактеристике прогресивног CRC-а су у позитивној корелацији са присуством анемије и тромбозе.
2. Вредности концентрације биохемијских белега малигне болести (AFP, CEA, CA 19-9) у серуму позитивно корелирају са присуством анемије и тромбозе код оболелих од CRC-а.
3. Системске вредности антиинфламацијских и имуномодулацијских протеина у серуму оболелих од CRC-а су у позитивној корелацији са присуством анемије и тромбозе.

### **3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ**

#### **А. ВРСТА СТУДИЈЕ**

Рађена је компаративна-експериментална студија, током које су анализирани системске вредности цитокина, серумске вредности туморских маркера и клиничко-патохистолошке карактеристике болести код оболелих од CRC-а са присуством анемије, односно тромбозе (експерименталне групе), док су контролне групе били болесници са колоректалним карциномом без присутне анемије, односно без присутне тромбозе. Клинички део истраживања је спроведен у Центру за гастроентерологију, Клиничког центра у Крагујевцу, док је експериментално-истраживачки део студије спроведен у Центру за ММ и ИМЋ, Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу.

#### **Б. ПОПУЛАЦИЈА КОЈА СЕ ИСТРАЖУЈЕ**

Ова студија је подељена у два дела. У првом делу истраживања је укључено 55 болесника са CRC-ом, који су након потврђене дијагнозе ендоскопским и патохистолошким прегледом, потписали писану сагласност о учествовању у студији. Укључени су само пацијенти који су испуњавали улазне услове, а нису имали ни један од искључујућих критеријума. Затим су болесници подељени на основу концентрације хемоглобина на експерименталну групу оболелих од CRC са дијагностикованом анемијом (n=28) и контролну групу оболелих од CRC без дијагностиковане анемије (n=27). За потврду присуства анемије коришћени су критеријуми WHO (75). У другом делу истраживања оболели од CRC-а (n=59), такође су, након потврђене дијагнозе ендоскопским и патохистолошким прегледом, потписали писану сагласност о учествовању у студији. Болесници из овог дела истраживања су затим на основу броја тромбоцита подељени на експерименталну групу оболелих од CRC-а са присутном тромбозом (n=24) и контролну групу оболелих од CRC-а без присутне тромбозе (n=35). Тромбоза је дефинисана као број тромбоцита већи или једнак од  $450 \times 10^9/L$ , а према критеријумима из студија сличног дизајна (89, 103). Код дефинисаних група су прикупљени и анализирани подаци о: старости, полу, локализацији и величини, нуклеарном и хистолошком градусу тумора, присуству метастаза, инвазији крвних и лимфних судова, TNM стадијуму болести, системским вредностима цитокина, имуномодулацијских протеина и концентрацији туморских маркера. Истраживање је спроведено у периоду од три године, током 2017., 2018. и 2019. године.

## **В. УЗОРКОВАЊЕ**

У студију су укључени испитаници са колоректалним карциномом који имају:

1. дијагностикован колоректални карцином верификован колоноскопским прегледом и потврђен патохистолошки;
2. потписан добровољни пристанак за учешће у студији;
3. старосне доби изнад 18 година.

Из студије су искључени испитаници са:

1. рецидивантним туморима дебелог црева;
2. колоректалним карциномом код којих је спроведена зрачна и хемиотерапија;
3. на терапији антибиотицима, кортикостероидима, имуносупресивима;
4. оболели од других малигних болести или нејасном дијагнозом болести;
5. неодговарајућом медицинском документацијом;
6. оболели од акутних инфекција;
7. оперисани у протекла четири месеца;
8. пацијенти којима су трансплантирани органи;
9. болесници са знацима активног крварења, видљиво крварење или утврђено тестом на окултно крварење (енглес. *fecal occult blood test* – FOBT).

Испитивани болесници су укључени у студију само ако су испуњавали све наведене улазне критеријуме, као и под условом да нису имали било који од критеријума са листе искључујућих. Од Етичких комитета Клиничког центра у Крагујевцу (01/1627 од 08.03.2010.) и Факултета медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу (01-311/6 од 20.01.2010.) добијена је сагласност за спровођење истраживања. Истраживање је дозвољено као клиничка студија непрофитног карактера, и спроведена је само у циљу научног истраживања.

## **Г. ВАРИЈАБЛЕ МЕРЕНЕ У ИСТРАЖИВАЊУ**

**Независне промењиве:** колоректални карцином, анемија, тромбоцитоза

**Зависне варијабле:** лабораторијске анализе, активност болести, клиничко-патолошке карактеристике болести, патохистолошки налаз, хистолошки и нуклеарни градус тумора, TNM класификација тумора, вредност биохемијских белега малигне

болести (AFP, CEA и СА 19-9) у серуму болесника, концентрације цитокина и имуномодулацијских протеина (IL-1, IL-4, IL-10, IL-17, IL-33, галектина-1, галектина-3, TNF- $\alpha$  и INF- $\gamma$ ) у серуму болесника.

**Збуњујуће варијабле:** старост и клиничке карактеристике испитаника, коморбидитети (попут, шећерне болести, високог крвног притиска и слично), терапија коју користе, навике пацијената (пушач, конзумирање алкохола, кафе и слично)

### ***Одређивање клиничко-патохистолошке тежине болести***

Сви испитаници оболели од CRC-а прегледани су ултразвучно и радиолошки. Поред тога, где је било индиковано извршена је и компјутеризована томографија стомака и мале карлице. Прегледи стомака коришћењем ултразвука рађени су у Центру за гастроентерохепатологију, док је комплетно радиографско испитивање (снимак грудног коша и компјутеризовано томографско снимање абдомена и карлице) урађено, коришћењем стандардних дијагностичких протокола Службе за радиолошку дијагностику. На основу ових прегледа, болесницима је дијагностикована метастатска проширеност болести, након чега су подељени у две групе, односно на испитанике са или испитанике без присуства метастатске болести колоректалног карцинома у јетри и плућима.

Код оних болесника код којих је доказано присуство слободне течности, извршено је пунктирање трбуха. Узорак је послат у Службу за патологију за потврду присуства малигну хелија у пунктату односно карциноматозе. Потом су сви испитаници, на основу добијеног резултата, разврстани у две групе: са или без дијагностиковане карциноматозе трбушне марамице (перитонеум).

TNM класификација тумора учињена је коришћењем критеријума UICC-а (енглес. *The Union for International Cancer Control*). Поред тога, коришћењем класификације Светске здравствене организације извршена је градирација тумора.

### ***Патохистолошка анализа исечака ткива***

Патохистолошка анализа вршена је у Служби за патологију. Током колоноскопског прегледа, са суспектних и патолошки измењених места, узимани су узорци ткива слузнице колона. Од сваког појединачног испитаника узето је по најмање 5 ткивних исечака за даљу анализу. Ткивни исечци, величине од 4 до 5 милиметара су прво фиксирани у 4% формалину, током 18 до 24h, а затим су након алкохолне дехидратације направљени блокови у парафину, који су сечени на пресеке дебеле од 5 до 7  $\mu\text{m}$ . Затим су добијени пресеци ткива обојени хематоксилин-еозином по Heidenhain-у (104) и у сагласности са препорукама Gurr-а (105). Након извршеног бојења, исечци ткива су потопани у раствор алкохола различитих концентрација због дехидратације исечака. Коришћен је 85% алкохол у трајању од једног минута, затим 96% алкохол у трајању од 50 секунди и тај поступак је поновљен два пута, док је у завршној фази дехидратације коришћен 100% алкохол у трајању од 50 секунди и тај поступак је такође поновљен два пута. Затим је извршено просветљавање исечака употребом ксилола, у мешавини са алкохолом и чистог. На крају поступка, овако припремљени исечци ткива прекривени су балзамом и покровним стакалцима ради сушења. Сушење је трајало најмање 24h, а затим су ткивни исечци анализирани уз помоћ светлосног микроскопа коришћењем различитих увеличања.

Патохистолошким прегледом прво је одређен хистолошки градус (HG) тумора, а на основу степена диференцијације туморских ћелија и броја митоза у њима. Познато је да је хистолошки градус у корелацији туморском агресивношћу и важан је прогностички параметар код CRC-а. На основу датих препорука светске здравствене организације (WHO), у овом истраживању сви испитаници са CRC-ом су узимајући у обзир хистолошки градус тумора разврстани у две групе. У прву групу су сврстани испитаници са добро диферентованим тумором (грабус I), док су у другу групу сврстани болесници са умерено и лоше диферентованим тумором (грабус II и градус III). Патохистолошким прегледом одређен је и нуклеарни градус (NG) тумора, а на основу морфолошких промена једра туморских ћелија у поређењу са здравим, малигно неизмењеним ћелијама колона. С обзиром да се нуклеарни градус дефинише се као низак (NGI), средњи (NGII) и висок (NGIII), сви испитаници у студији су узимајући у обзир вредност добијеног нуклеарног градуса разврстани на: ниски, средњи и високи NG. Туморске патохистолошке особине (нуклеарни градус и степен хистолошке диференцијације) анализирани су у складу са класификацијом Америчког удружења за канцере (енглес. American Joint Committee on Cancer – AJCC, 2010) (106). Осим тога, извршена је и додатна подела свих испитаника узимајући у обзир да ли је детектована инвазија крних, односно лимфних судова од стране туморских ћелија (присуство или одсуство малигне захваћености).

#### ***Одређивање биохемијских белега малигне болести – AFP, CEA и CA 19-9***

Одређивање вредности CRP-а (енглес. C – *Reactive Protein*) и биохемијских белега малигне болести – AFP, CEA и CA 19-9 у серуму сваког од испитаника вршено је у централној лабораторији Клиничког центра у Крагујевци. У ту сврху од сваког учесника студије је пункцијом кубиталне вене узета једна епрувета крви у запремини од 5 милилитара. У циљу издвајања серума, епрувета је центрифугирана на 3 хиљаде обртаја у трајању од 30 минута. Затим је коришћењем стандардне турбидиметријске методе одређена концентрација CRP-а у серуму, док су коришћењем методе хемилуминисценције одређиване вредности биохемијских белега малигне болести: AFP (енглес. *Alpha fetoprotein*), CEA (енглес. *Carcinoembryonic antigen*) и CA 19-9 (енглес. *Carbohydrate antigen*) у серуму сваког испитаника.

#### ***Мерење вредности цитокина и галектина у серуму***

За одређивање концентрације цитокина је сваком од испитаника, пре било какве терапије, венепункцијом узиман један узорак у запремини од 10 ml крви. Затим је центрифугирањем издвојен серум од крвног коагулума. Сви узорци серума чувани су на -80°C до тестирања. Концентрације цитокина у серуму (IL-1, IL-4, IL-10, IL-17, IL-33, галектина-1, галектина-3, TNF- $\alpha$  и INF- $\gamma$ ) су одређене коришћењем сензитивних серолошких тестова (ELISA, R & D Systems, USA), специфичних за цитокине човека.

Метода је спроведена према упутствима произвођача, а као што је већ описано у предходним истраживању Јовановића и коаутора (70). Укратко описано, на почетку рада су направљене тражене концентрације стандарда растварањем са PBS-ом. Затим су у појединачне базенчиће плоча за микротитрацију додата везујућа антитела (енглес. *Capture Antibody*). Следећег дана, након аутоматског испирања, у базенчиће плоча за микротитрацију је додато по 300 $\mu$ l блокирајућег пуфера (енглес. *Block Buffer*). Узорци су према упутству произвођача пре додавања у базенчиће плоча за микротитрацију разблажени десетосруко. После тога, додато је 100 $\mu$ l радне

концентрације детекционог антитела у сваки базенчић, а плоче за микротитрацију су поново прекривене адхезивном фолијом. После инкубирања у базенчиће је сипана стрептавидинска пероксидаза у радној концентрацији. Плоче за микротитрацију остављене су на собној температури и на месту заштићеним од директног утицаја светлости током 20 минута. Након завршене инкубације и испирања додато је 100 $\mu$ l супстрата. Реакција је прекинута након 20 минута додавањем 50 $\mu$ l стоп раствора (енглес. *Stop Solution*: 2 NH<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Одмах након тога, у сваком базенчићу је извршено мерење апсорбанце. Коришћен је аутоматски читач при подешавању од 450nm. Концентрације цитокина је одређена за сваки појединачан узорак упоређивањем са стандардном кривом направљеном од серије предходно познатих концентрација цитокина, и уз рекалкулацију разблажења према упутству произвођача. Вредност мерених цитокина је приказана као pg/ml серума. Сви узорци су мерени у дупликату.

### ***Одређивање комплетне крвне слике и биохемијских анализа***

Анализе комплетане крвне слике (ККС) и одређивање биохемијских параметара од значаја урађени су у централној лабораторији КЦ Крагујевац. Број крвних ћелија одређен је пропуштањем ћелија кроз мали отвор апарата Beckman Coulter AcT diff Analyzer. При чему су појединачне ћелије као независне партикуле у проводној течности стварале одређене промене у отпору слабог електричног кола. Број ћелија изражаван је у броју  $\times 10^9/l$ ,  $\times 10^{12}/l$ , док је хемоглобин одређен стандардном колориметријском методом и изражен као количина хемоглобина у g/L.

На основу вредности хемоглобина болесници са CRC су подељени у групу са присутном анемијом (према критеријумима WHO за мушкарце: вредности хемоглобина, Hgb < 130 g/L, односно за жене: вредности хемоглобина, Hgb < 120 g/L) и у групу без анемије (према критеријумима WHO за мушкарце: вредности хемоглобина, Hgb  $\geq$  130 g/L, односно за жене: вредности хемоглобина, Hgb  $\geq$  120 g/L) (75). На основу броја тромбоцита болесници са CRC су подељени у експерименталну групу оболелих од CRC са присутном тромбоцитозом и групу оболелих од CRC без тромбоцитозе. Тромбоцитоза је дефинисана као број тромбоцита већи од  $450 \times 10^9/L$  (89, 103). Све процедуре током студије су урађене у складу са Принципима добре клиничке праксе и Декларације из Хелсинкија.

### **Д. СНАГА СТУДИЈЕ И ВЕЛИЧИНА УЗОРКА**

За одређивање величине узорка коришћене су вредности TNF- $\alpha$ , односно серумских концентрација овог про-инфламацијског цитокина, идентично подацима који су раније објављени у студијским истраживањима дизајнираним на подударан начин (107). Вредности овог цитокина су коришћене, јер су њихове разлике биле најмање између група оболелих различитих хистолошких стадијума болести. Употребљен је програм G Power верзија 3.1, уз вероватноћу грешке првог степена  $\alpha$  од 0,05 и снагу студије  $\beta$  од 0,8 (80%) за независни Т тест са двосмерним мерењем. Разлика вредности TNF- $\alpha$  измерена између две испитиване групе била је 35,07 pg/ml, уз стандардну девијацију од 20,14. Тако је одређено да број узорака у свакој од група буде по 15. Међутим, у истраживању је коришћено по 25 узорака у свакој групи.



## Љ. СТАТИСТИЧКА ОБРАДА ПОДАТАКА

Сви подаци добијени током извођења студије су статистички обрађени коришћењем програма SPSS верзија 20.0. Резултати студије изражени су као средња вредност уз стандардну грешку (SE). У зависности од правилности дистрибуције вредности резултата, примењени су одговарајући тестови (Student's t тест, MannWhitney или KruskalWallis тестови) за аналитичку обраду података. Повезаност анемије, односно тромбозе, са карактеристикама тумора и процена статистичке значајности је тестирана коришћењем Chi-Square тестом. У циљу процене могуће корелације између маркера од интереса и присуства анемије, односно тромбозе код болесника са колоректалним карциномом, где је то прикладно, коришћена је Pearson's и Spearman's корелација. Изражајност корелације је дефинисана као слаба (0,1 до 0,3), умерена (0,3 до 0,5) или јака (0,5 до 1,0), позитивна или негативна. Према уобичајеном начину приказа, разлике у вредностима су сматране као статистичка значајност при  $p$  мањем од 0,05. Док су при  $p$  мањем од 0,01 разлике у вредностима приказане као веома статистички значајне.

#### 4. РЕЗУЛТАТИ

У првом делу истраживања укључено је 55 одраслих испитаника са дијагностикованим колоректалним карциномом (28 са анемијом – експериментална група и 27 без анемије – контролна група). Анализом групних карактеристика, не налази се статистичка значајност у међугрупним разликама према полу и старости. Клиничке и пато-хистолошке карактеристике ових испитаника приказане су у Табели 2.

**Табела 2.** Клиничке и патохистолошке карактеристике испитаника, односно оболелих од CRC-а са и без анемије

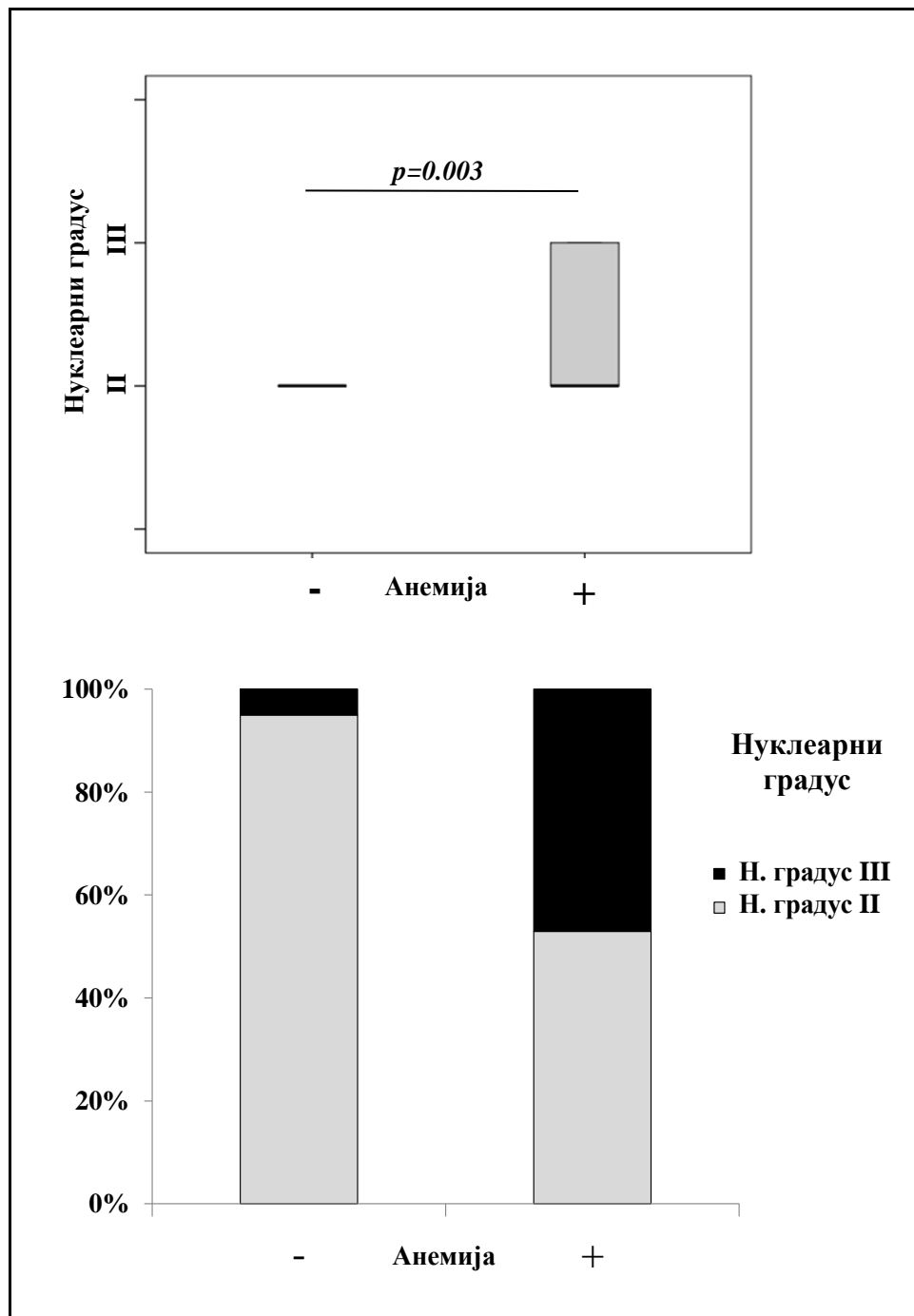
Карактеристике	Оболели од колоректалног карцинома (CRC)	
	Без анемије	Са анемијом
Пол (мушки/женски)	17/10	16/12
Старост, средња вредност (ранг)	63,4 (50-75)	66,5 (53-82)
Хемоглобин	138,04±11,33	96,77±14,34
MCV	89,36±11,09	70,77±6,63
Тромбоцити (x 10 <sup>9</sup> /L)	314,23±12,46	408,63±29,55
Степен хистолошке диференцијације (добар/умерен)	6/21	7/21
AFP	3,26±1,64	238,84±128,30
CEA	33,79±22,25	223,14±109,11
CA 19-9	81,57±70,51	931,07±190,05

#### Оболели од CRC-а са анемијом имају тежу и локално унапредовалу болест

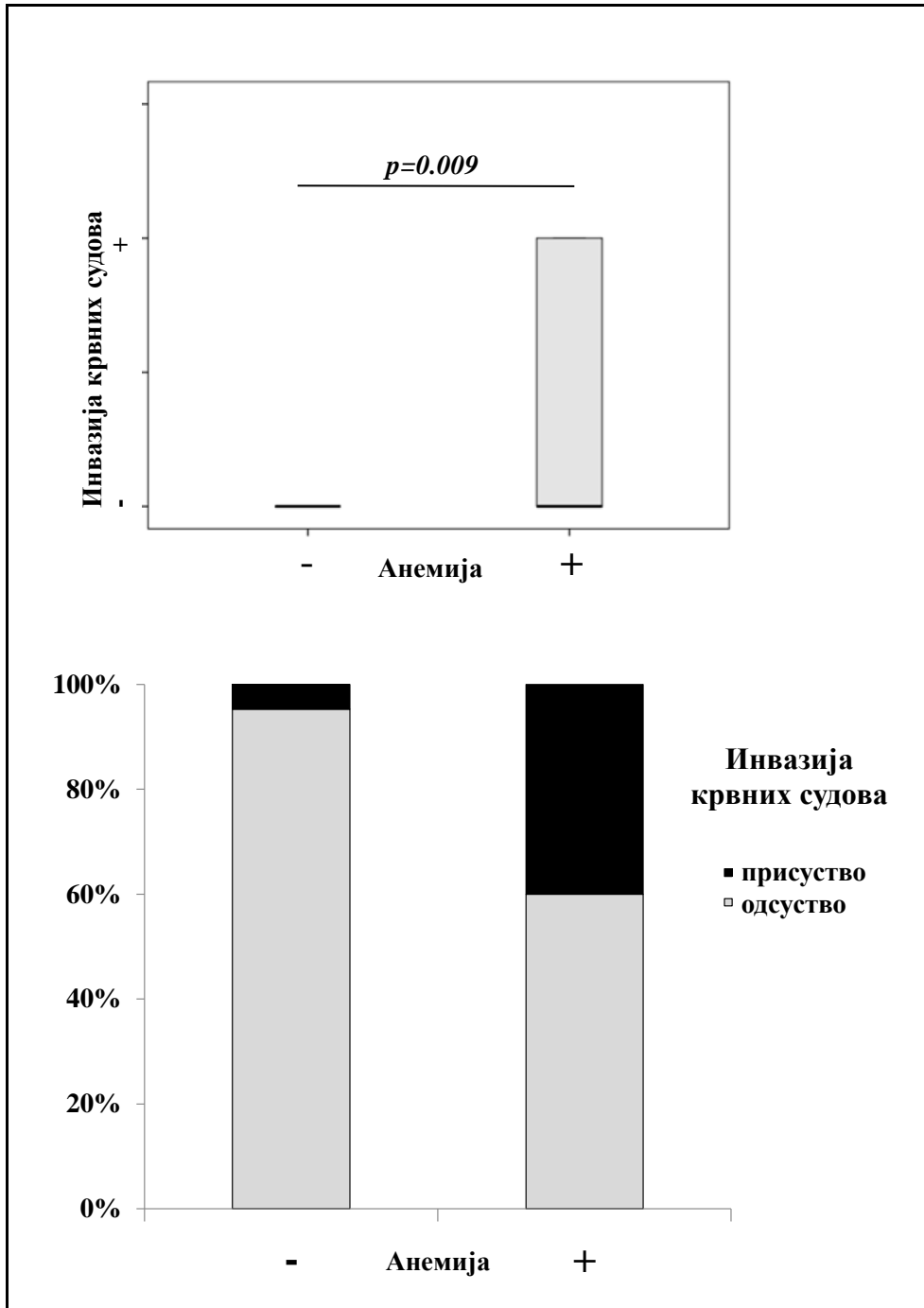
Основно разврставање испитаника извршено је узимајући у обзир концентрацију хемоглобина (експериментална група са анемијом и контролна група без анемије). Подела је заснована на основу дијагностиковане анемије, односно у случајевима када је концентрација хемоглобина била мања од 130 g/l код пацијената мушког пола, односно мања од 120 g/l код пацијената женског пола (75).

Анализиран је нуклеарни градус ћелија колоректалног карцинома код свих пацијента, а затим су резултати упоређени између дефинисаних група, у зависности од присуства или одсуства анемије. Одређивање нуклеарног градуса је засновано на процени величине и облика једара туморских ћелија и на основу процента туморских ћелија које су у фази ћелијске деобе или раста (106). Добијени резултати показују, да пацијенти оболели од CRC-а са анемијом имају значајно већи нуклеарни градус туморских ћелија у поређењу са оболелима од CRC-а без анемије ( $p = 0,003$ ; Фигур. 1). Унутар ове групе болесника (CRC + анемија), нуклеарни градус III забележен је код 47,06 % пацијената, док је унутар контролне групе (CRC без анемије) нуклеарни градус III забележен код 5,00 % пацијената (Фигур. 1).

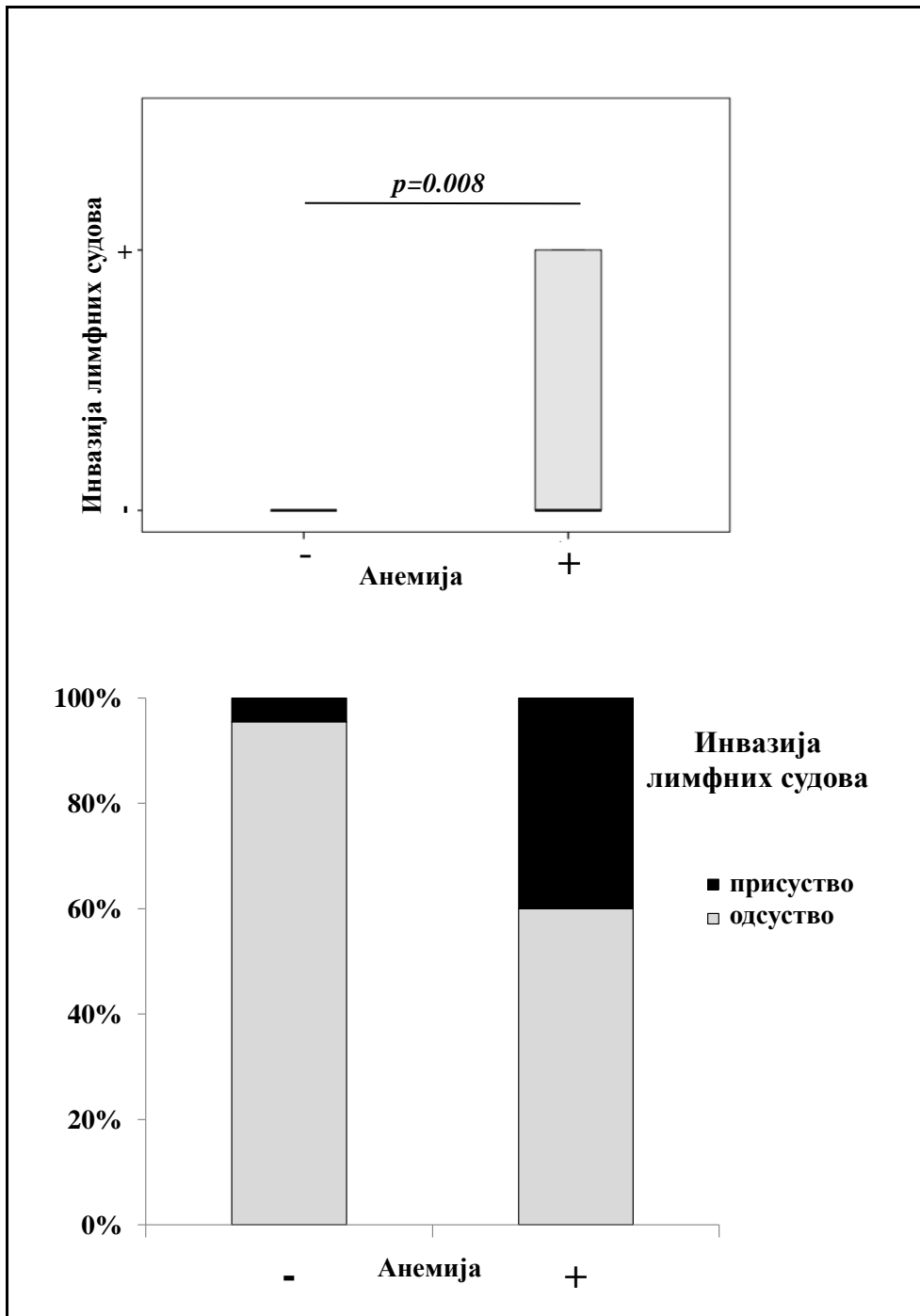
Такође, значајно већи проценат оболелих од CRC-а са анемијом имао је детектабилну инвазију крвних ( $p = 0,009$ ; Фигур. 2) и лимфних судова ( $p = 0,008$ ; Фигур. 3), у поређењу са групом оболелих од CRC-а без анемије. Унутар ове групе болесника (CRC + анемија), инвазија крвних судова забележена је код 40,00 % пацијената (Фигур. 2), док је инвазија лимфних судова забележена код 40,00 % пацијената (Фигур. 3).



**Фигура 1.** Већи нуклеарни градус колоректалног карцинома код оболелих од CRC-а са анемијом у поређењу са оболелима од CRC-а без анемије. Основно разврставање испитаника извршено је узимајући у обзир концентрацију хемоглобина (експериментална група са анемијом и контролна група без анемије, означено + или -). Поред тога, извршена је и додатна подела узимајући у обзир нуклеарни градус тумора (I, II и III). Статистичка значајност је тестирана Chi-Square-овим тестом.



**Фигура 2.** Оболели од CRC-ом са анемијом су имали доказану инвазију крвних судова у већем проценату у односу на оболеле од CRC-а без анемије. Основно разврставање испитаника извршено је узимајући у обзир концентрацију хемоглобина (експериментална група са анемијом и контролна група без анемије, означено + или -). Поред тога, извршена је и додатна подела узимајући у обзир малигну захваћеност крвних судова (присуство/одсуство). Статистичка значајност је тестирана Chi-Square-овим тестом.



**Фигура 3.** *Оболели од CRC-ом са анемијом су имали доказану инвазију лимфних судова у већем проценату у односу на оболеле од CRC-а без анемије. Основно разврставање испитаника извршено је узимајући у обзир концентрацију хемоглобина (експериментална група са анемијом и контролна група без анемије, означено + или -). Поред тога, извршена је и додатна подела узимајући у обзир малигну захваћеност лимфних судова (присуство/одсуство). Статистичка значајност је тестирана Chi-Square-овим тестом.*

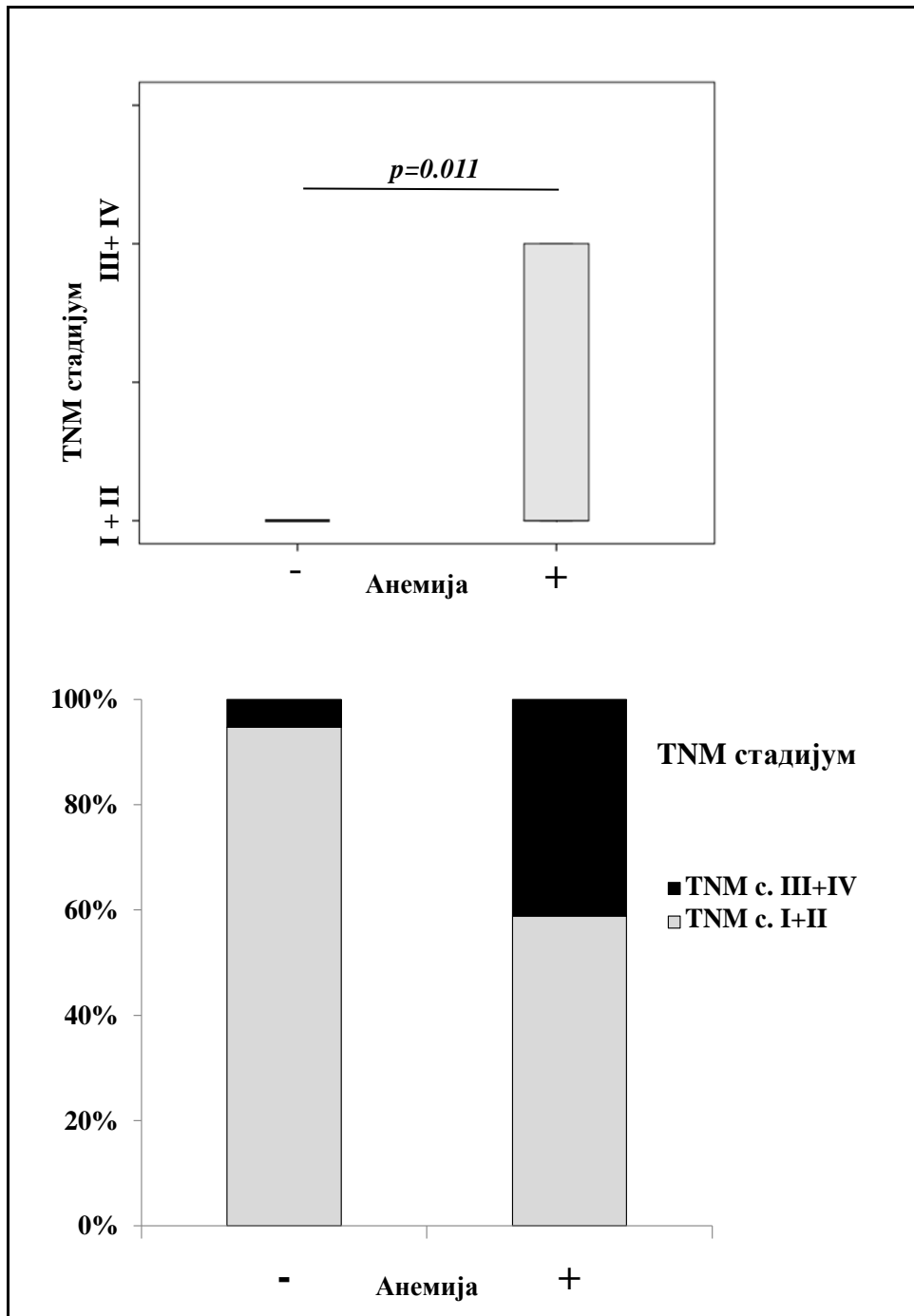
У складу са овим резултатима, доказана је и позитивна корелација анемије код оболелих од CRC-а са вишим нуклеарним градусом, већим степеном инвазије лимфних и крвних судова (подаци нису приказани).

### **Анемија позитивно корелира са прогресивним обликом CRC-а**

Оболели од CRC-а са анемијом имали су значајно већи TNM стадијум болести (претежно III или IV стадијум), док су пацијенти оболели од CRC-а без анемије, односно са нормалним нивоом хемоглобина, претежно имали TNM стадијум I или II ( $p = 0,011$ ; Фигур. 4). Унутар ове групе болесника (CRC + анемија), TNM стадијум III или IV забележен је код 41,18 % пацијената, док је унутар контролне групе (CRC без анемије) TNM стадијум III или IV забележен код 5,26 % пацијената (Фигур. 4).

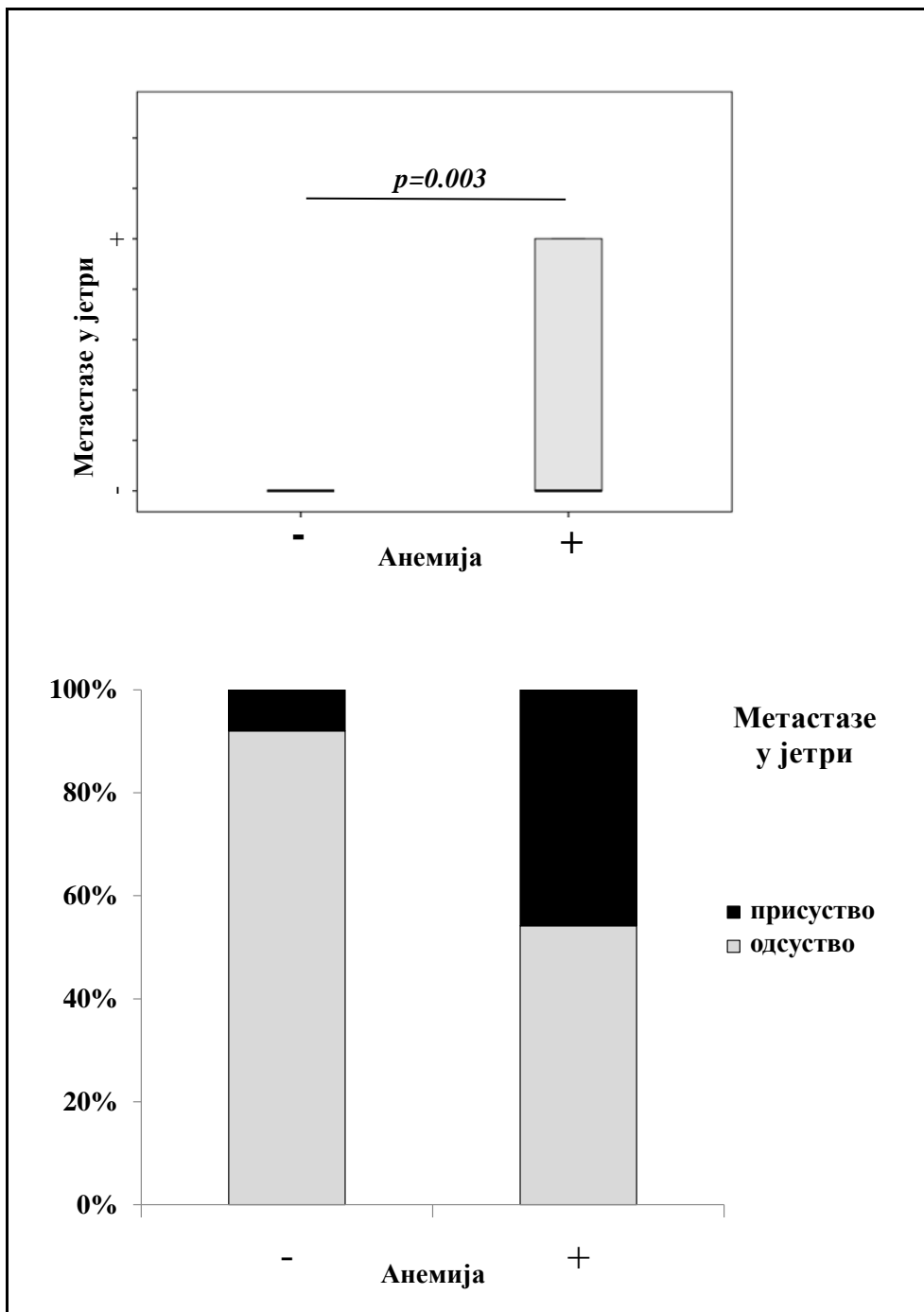
У поређењу са оболелима од CRC без анемије, већи проценат оболелих од CRC-а са анемијом је имало детектабилне метастатске промене у јетри ( $p = 0,003$ , Фигур. 5) и плућима ( $p = 0,031$ , Фигур. 6), као и детектабилну карциноматозу перитонеума ( $p = 0,004$ , Фигур. 7). Унутар ове групе болесника (CRC + анемија), метастатске промене у јетри забележене су код 45,83 % пацијената (Фигур. 5), метастатске промене у плућима забележене су код 36,36 % пацијената (Фигур. 6), а детектабилна карциноматоза перитонеума забележена је код 29,17 % пацијената (Фигур. 7).

Анализом корелација показано је, да анемија позитивно корелира са већим TNM стадијумом, детектабилним метастатским лезијама у плућима и јетри, као и карциноматозом перитонеума (резултати нису приказани). Такође, системске вредности биохемијских белега малигне болести – AFP, СЕА и СА 19-9 значајно су веће код оболелих од CRC-а са анемијом, у поређењу са оболелима од CRC-а без анемије (Табела 2). Анализа корелација, показано је да су вредности хемоглобина у негативној корелацији са концентрацијама биохемијских белега малигне болести: AFP ( $r = -0,383$ ;  $p = 0,007$ ), СЕА ( $r = -0,475$ ;  $p = 0,001$ ) и СА 19-9 ( $r = -0,610$ ;  $p = 0,001$ ). Негативна корелација присутна је и између вредности MCV-а и концентрације биохемијских белега малигне болести: AFP ( $r = -0,277$ ;  $p = 0,049$ ), СЕА ( $r = -0,343$ ;  $p = 0,020$ ) и СА 19-9 ( $r = -0,369$ ;  $p = 0,014$ ).

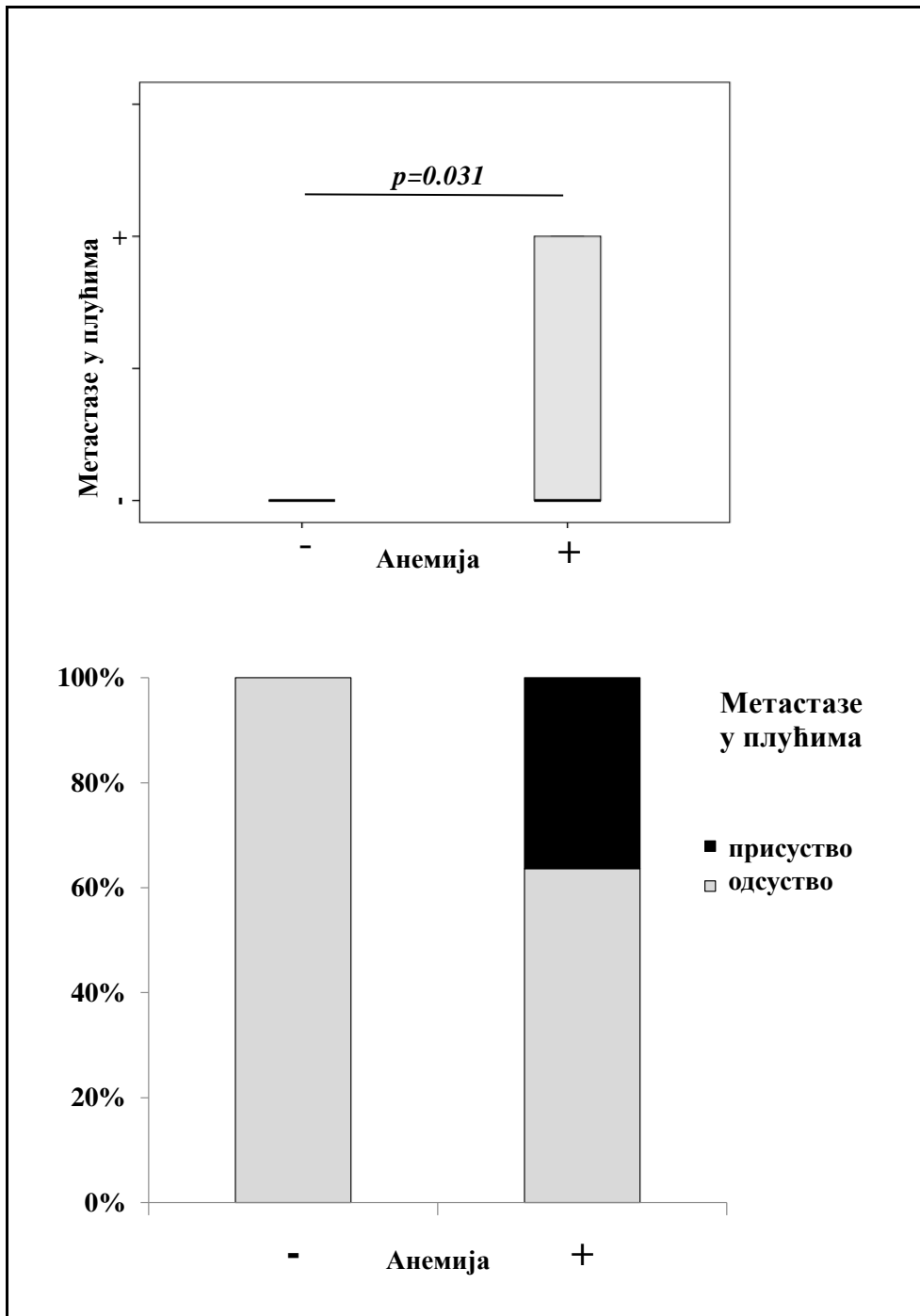


**Фигура 4.** Оболели од CRC-а са анемијом су у поређењу са контролном групом оболелих од CRC без анемије имали значајно већи TNM стадијум болести. Основно разврставање испитаника извршено је узимајући у обзир концентрацију хемоглобина (експериментална група са анемијом и контролна група без анемије, означено + или -). Поред тога, извршена је и додатна подела узимајући у обзир стадијум болести (TNM I+II и TNM III+IV). Статистичка значајност је тестирана Chi-Square-овим тестом.

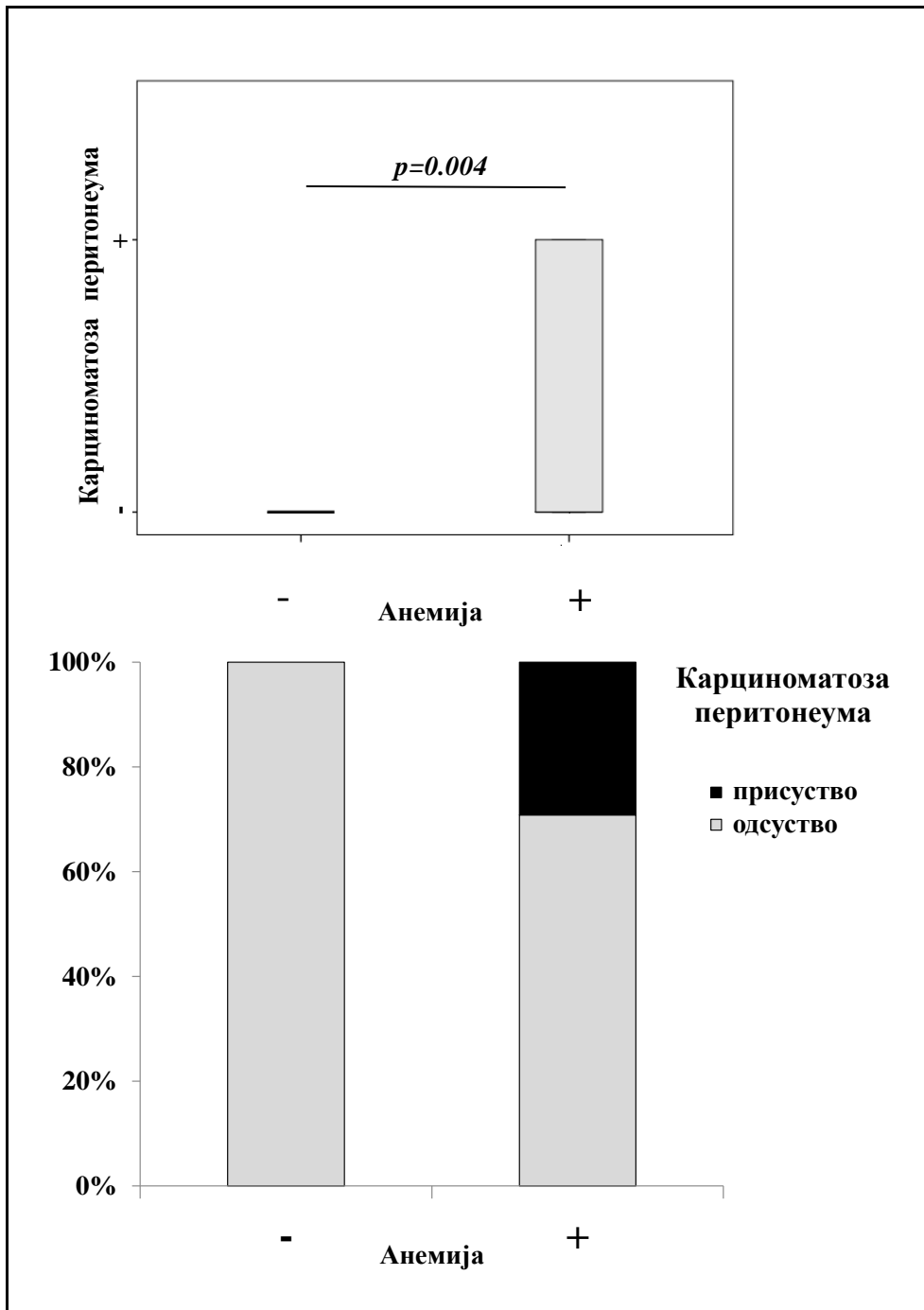




**Фигура 5.** Оболели од CRC-а са анемијом су имали детектабилне метастатске промене у јетри у већем проценту, у односу на контролну групу оболелих од CRC без анемије. Основно разврставање испитаника извршено је узимајући у обзир концентрацију хемоглобина (експериментална група са анемијом и контролна група без анемије, означено са + или -). Поред тога, извршена је и додатна подела узимајући у обзир метастатску захваћеност јетре (присуство/одсуство). Статистичка значајност је тестирана Chi-Square-овим тестом.



**Фигура 6.** *Оболели од CRC-а са анемијом су имали детектабилне метастатске промена у плућима у већем проценту, у односу на контролну групу оболелих од CRC без анемије. Основно разврставање испитаника извршено је узимајући у обзир концентрацију хемоглобина (експериментална група са анемијом и контролна група без анемије, означено + или -). Поред тога, извршена је и додатна подела узимајући у обзир метастатску захваћеност плућа (присуство/одсуство). Статистичка значајност је тестирана Chi-Square-овим тестом.*



**Фигура 7.** Већи проценат оболелих од CRC-а са анемијом имало је детектабилну карциноматозу перитонеума, у односу на контролну групу оболелих од CRC без анемије. Основно разврставање испитаника извршено је узимајући у обзир концентрацију хемоглобина (експериментална група са анемијом и контролна група без анемије, означено + или -). Поред тога, извршена је и додатна подела узимајући у обзир метастатску захваћеност трбушне марамице (присуство/одсуство малигних ћелија у пунктату). Статистичка значајност је тестирана Chi-Square-овим тестом.

### Веће серумске концентрације IL-33, Gal-1 и IL-1 $\beta$ код оболелих од CRC-а са анемијом

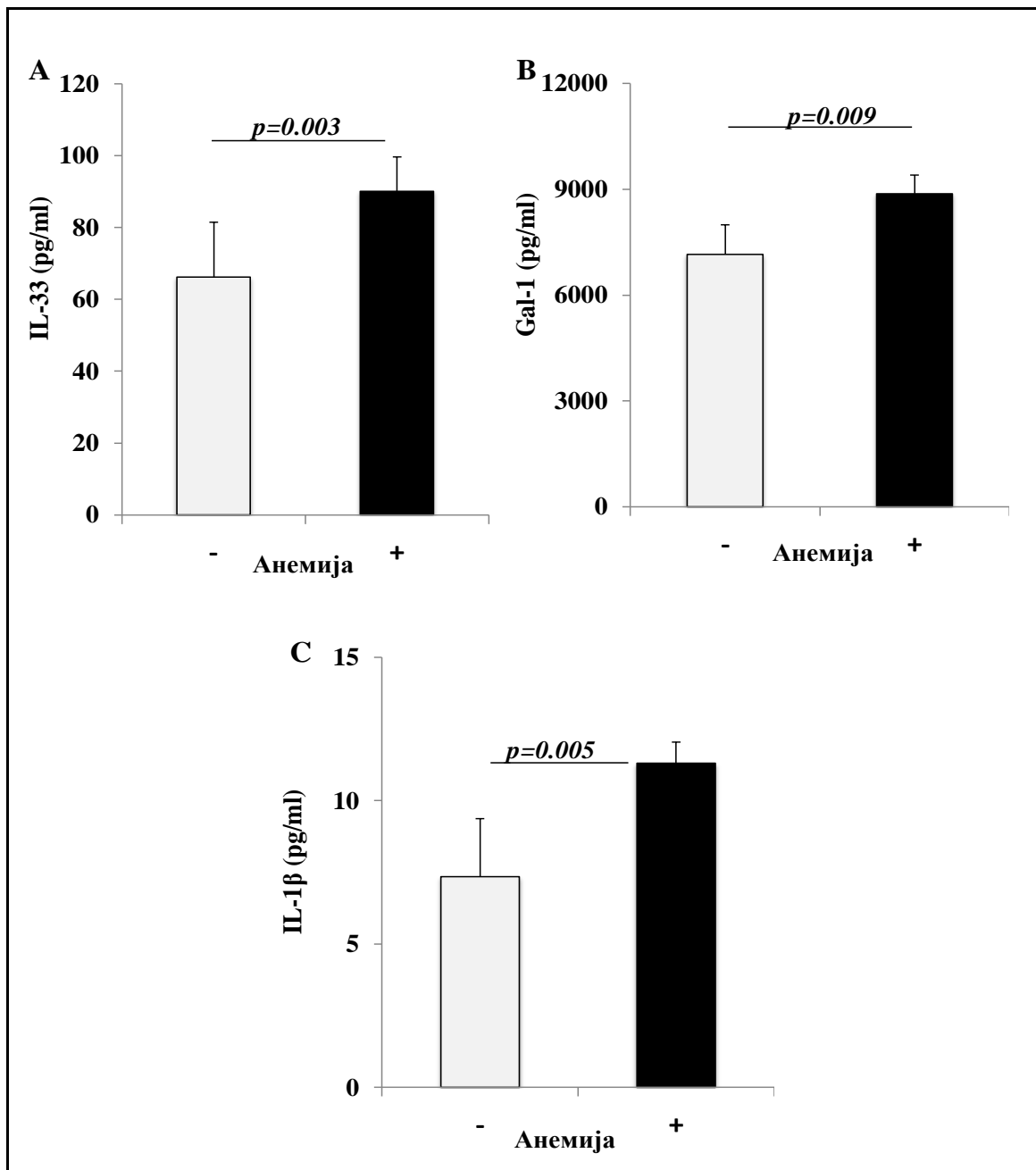
Даљи истраживачки поступак подразумевао је детерминацију серумских вредности параметара од интереса. Одређене су вредности: Gal-3, IL-17, sST2, IL-4, IL-6, TGF- $\beta$ , IFN- $\gamma$ , IL-10, IL-12, IL-13, IL-1, IL-33 и Gal-1 (Табела 3).

**Табела 3.** Приказ серумских вредности анализираних параметара код испитаника узимајући у обзир анемију

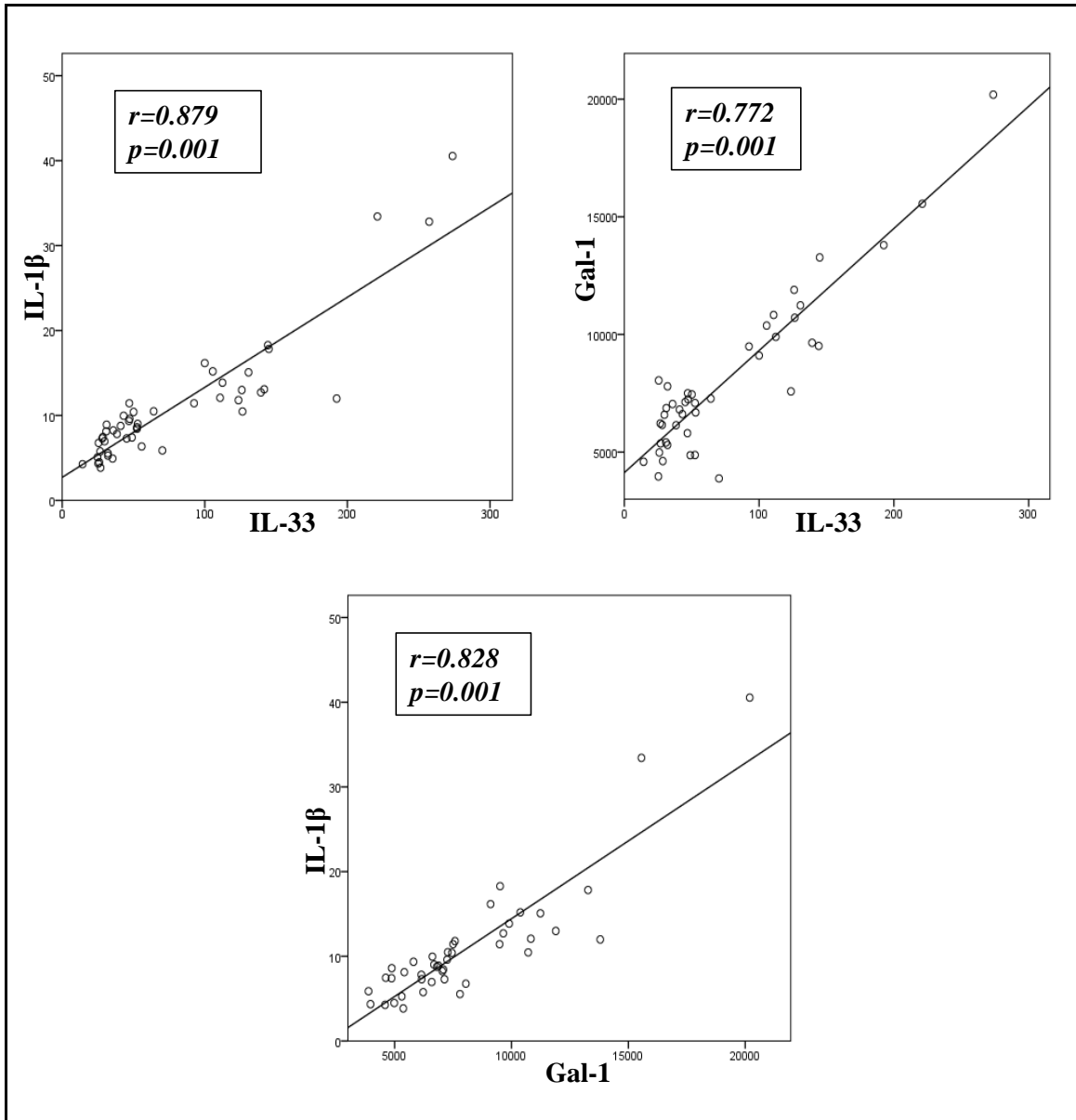
Серумске вредности (pg/ml)	Болесници са CRC-ом		p
	са анемијом (mean $\pm$ SD)	без анемије (mean $\pm$ SD)	
Gal-3	1.079,37 $\pm$ 375,53	1.170,44 $\pm$ 449,99	>0,05
IL-17	73,47 $\pm$ 17,08	73,30 $\pm$ 6,15	>0,05
sST2	770,93 $\pm$ 620,81	1054,36 $\pm$ 571,39	>0,05
IL-4	708,68 $\pm$ 123,80	648,20 $\pm$ 110,41	>0,05
IL-6	9,03 $\pm$ 7,88	9,66 $\pm$ 10,26	>0,05
TGF- $\beta$	1.076,26 $\pm$ 595,73	1.240,91 $\pm$ 405,34	>0,05
IFN- $\gamma$	199,03 $\pm$ 138,95	158,27 $\pm$ 76,60	>0,05
IL-10	4,38 $\pm$ 2,51	4,34 $\pm$ 0,91	>0,05
IL-12	125,47 $\pm$ 40,62	135,28 $\pm$ 22,89	0,049
IL-13	411,58 $\pm$ 116,57	399,88 $\pm$ 87,16	>0,05

Основно разврставање испитаника са дијагностикованим колоректалним карциномом извршено је узимајући у обзир концентрацију хемоглобина (експериментална група са анемијом и контролна група без анемије). Серумске вредности наведених параметара детерминисане су серолошким тестирањем. За аналитичку обраду коришћен MannWhitney RankSum тест.

Статистички значајно већа концентрација IL-33 ( $p = 0,003$ ; Фигур. 8А), Gal-1 ( $p = 0,009$ ; Фигур. 8Б) и IL-1 $\beta$  ( $p = 0,005$ ; Фигур. 8Ц) нађена је у серуму оболелих од CRC-а са дијагностикованом анемијом. Позитивна корелација је нађена између серумских концентрација СА 19-9 и IL-1 $\beta$  ( $r = 0,321$ ;  $p = 0,029$ ), као и СА 19-9 и IL-33 ( $r = 0,438$ ;  $p = 0,002$ ) (подаци нису приказани). Поред тога, доказана је позитивна корелација између серумских вредности галектина-1 и IL-33 (Spearman-ов коефицијент корелације  $r = 0,772$ ;  $p = 0,001$ ); галектина-1 и IL-1 $\beta$  (Spearman-ов коефицијент корелације  $r = 0,828$ ;  $p = 0,001$ ) и IL-33 and IL-1 $\beta$  (Spearman-ов коефицијент корелације  $r = 0,879$ ;  $p = 0,001$ ) код пацијената оболелих од CRC-а (Фигур. 9).



**Фигура 8. А, Б, Ц.** Већа концентрација IL-33, Gal-1 и IL-1 $\beta$  у серуму оболелих од CRC-а са анемијом, у односу на оболеле од CRC-а без анемије. Основно разврставање испитаника извршено је узимајући у обзир концентрацију хемоглобина (са или без дијагностиковане анемије, означено + или -). За аналитичку обраду коришћен MannWhitney RankSum тест.



**Фигура 9.** Позитивна корелација између серумских вредности галектина-1 и IL-33, галектина-1 и IL-1 $\beta$ , и IL-33 и IL-1 $\beta$  код пацијената са CRC-ом и анемијом. Основно разврставање испитаника извршено је узимајући у обзир концентрацију хемоглобина (експериментална група са анемијом и контролна група без анемије). Јачина корелације одређена је коришћењем Spearman-овог теста.

Као што је већ описано у уводном делу студије, системска вредност појединих цитокина/имунорегулаторних протеина важан је показатељ активности малигне болести. Поред тога, због њихове различите улоге у антитуморској или протуморској активности, као и различите улоге у регулисању многих процеса у патогенези болести, такође су веома значајани и њихови међусобни односи.

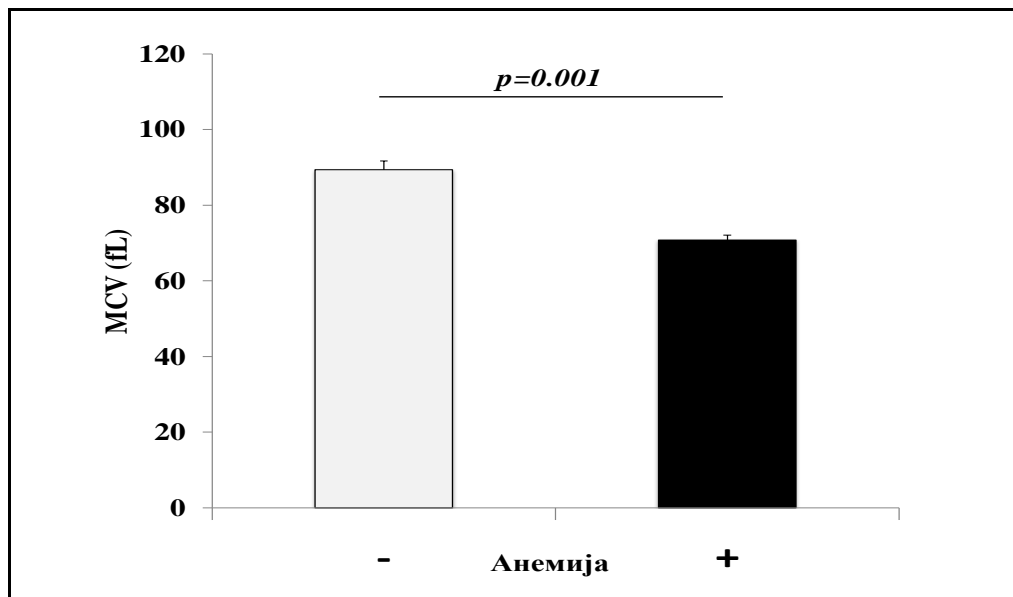
**Табела 4.** Приказ међусобних односа серумских вредности анализираних параметара код испитаника узимајући у обзир анемију

Серумске вредности	Болесници са CRC-ом		<i>p</i>
	са анемијом (mean±SD)	без анемије (mean±SD)	
TGF-β/IL-1	144,62±95,23	120,65±59,95	>0,05
TGF-β/IL-6	151,40±90,54	172,60±78,69	>0,05
TGF-β/IFN-γ	8,78±7,78	10,67±7,69	>0,05
IL-10/IL-1	0,49±0,17	0,42±0,16	>0,05
IL-10/IL-12	0,04±0,02	0,03±0,01	>0,05
IL-17/IL-10	19,35±5,63	17,65±4,09	>0,05
sST2/IL-33	19,18±15,97	16,33±13,69	>0,05
Gal-3/IL-33	30,98±18,32	19,43±14,62	0,041
Gal-3/TNF-α	50,77±201,21	28,91±28,58	0,007
Gal-3/IL-1	155,54±88,23	117,81±62,20	>0,05
Gal-3/IL-10	303,47±142,41	268,79±79,56	>0,05
Gal-1/IL-1	831,05±257,69	796,05±161,16	>0,05
Gal-1/TGF-β	21,33±57,58	9,45±10,12	>0,05

Зато је извршена анализа односа серумских вредности параметара од интереса, као и њихова међугрупна компарација. Серумске вредности наведених параметара детерминисане серолошким тестирањем. За аналитичку обраду коришћен MannWhitney тест.

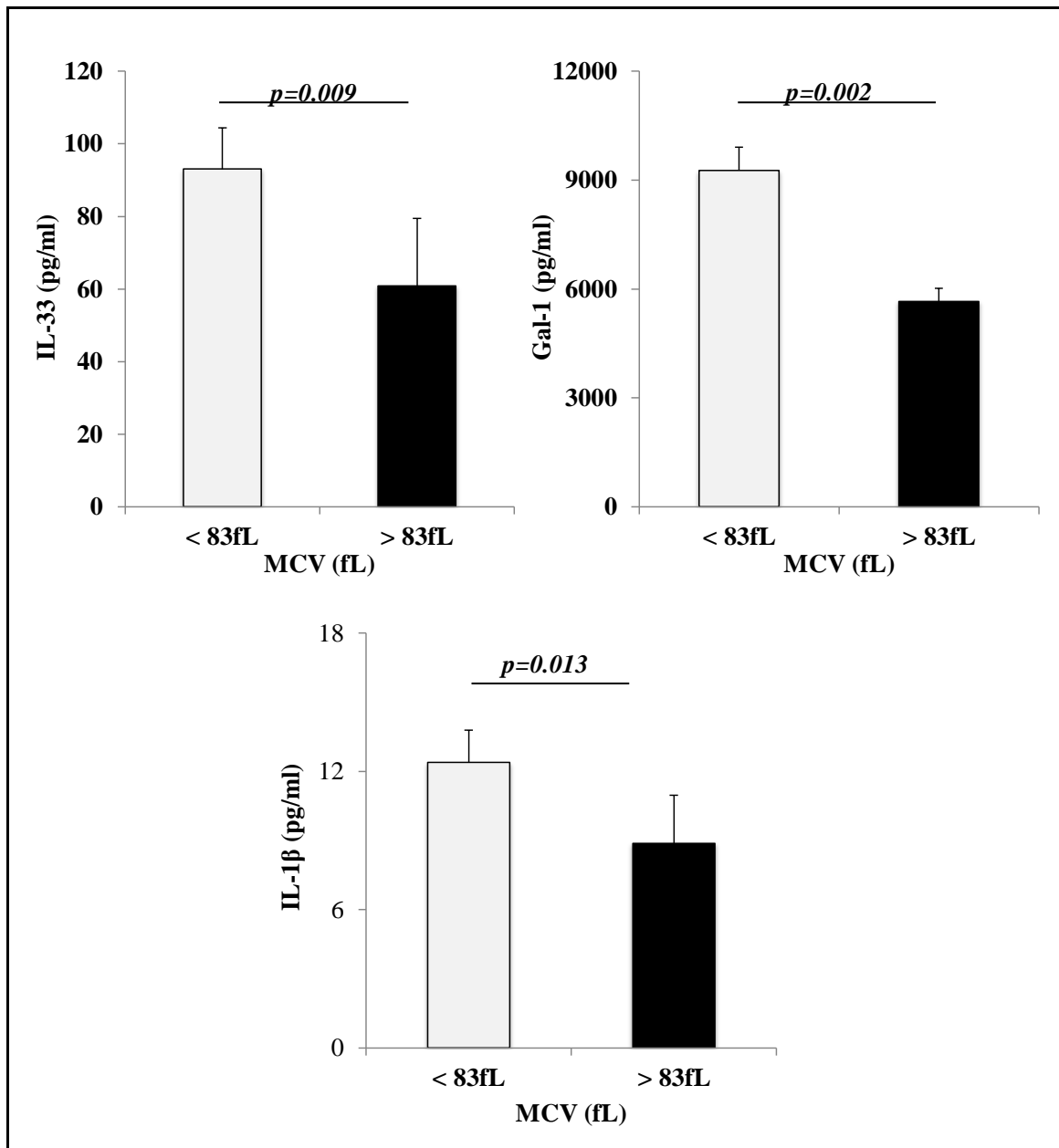
### Пацијенти са CRC-ом претежно су имали микроцитну анемију

У даљем истраживању, код оболелих са CRC-ом обе групе (група са анемијом и без дијагностиковане анемије) анализирани су вредности средњег волумена еритроцита (MCV). Код оболелих од CRC-а са анемијом MCV је значајно мањи у односу на оболеле од CRC-а без анемије, односно са нормалним нивоом хемоглобина ( $p = 0,001$ ; Фигур. 10). Како бисмо потврдили претходне резултате, оболели од CRC-а су додатно разврстани узимајући у обзир вредности MCV-а и код њих су анализирани серумске вредности IL-33, Gal-1 и IL-1 $\beta$ . Оболели од CRC-а са микроцитном анемијом (MCV < 83 fL) имали су значајно веће серумске концентрације IL-33 ( $p = 0,009$ ), Gal-1 ( $p = 0,002$ ) и IL-1 $\beta$  ( $p = 0,013$ ), у поређењу са оболелима од CRC-а са нормоцитном анемијом или без анемије (Фигур. 11). Поред тога, доказана је јака позитивна корелација између серумских вредности галектина-1 и IL-33 ( $r = 0,870$ ;  $p = 0,001$ ), галектина-1 и IL-1 $\beta$  ( $r = 0,795$ ;  $p = 0,001$ ) и IL-33 и IL-1 $\beta$  ( $r = 0,826$ ;  $p = 0,001$ ) код оболелих од CRC са дијагностикованом микроцитном анемијом (Фигур. 12). Мерене су и вредности феритина код свих болесника. Вредности феритина су биле у нормалним границама и није постојала значајна разлика у концентрацији феритина између оболелих од CRC са анемијом и без анемије (подаци нису приказани).

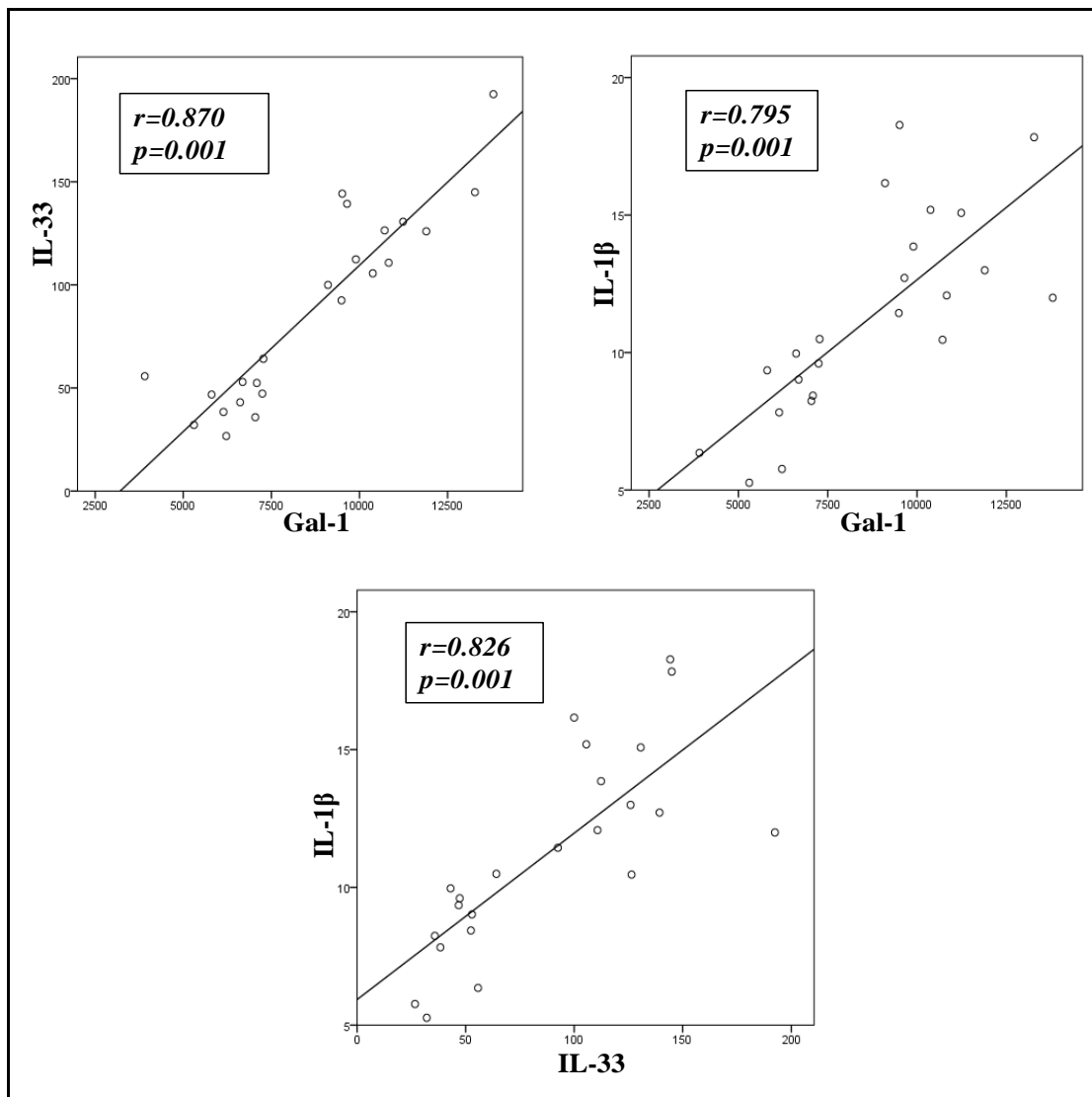


**Фигура 10.** *Значајно мање вредности средњег волумена еритроцита (MCV) код оболелих од CRC-а са анемијом у поређењу са групом оболелих од CRC-а без анемије. Основно разврставање испитаника извршено је узимајући у обзир концентрацију хемоглобина (експериментална група са анемијом и контролна група без анемије, означено + или -). За аналитичку обраду коришћен MannWhitney RankSum тест.*





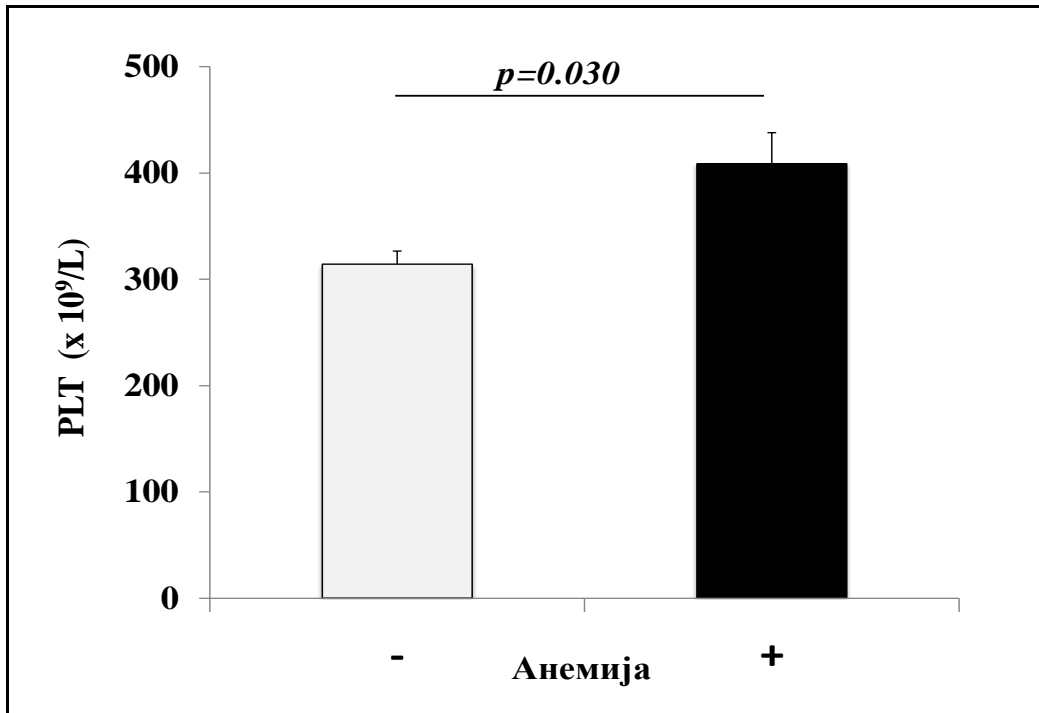
**Фигура 11.** Значајно веће серумске концентрације IL-1 $\beta$ , Gal-1 и IL-33 код оболелих од CRC-а са микроцитном анемијом у поређењу са оболелима од CRC-а са нормоцитном анемијом или без анемије. Извршено је разврставање испитаника узимајући у обзир вредности MCV-а (мање/више од 83 fL). За аналитичку обраду коришћен MannWhitney RankSum тест.



**Фигура 12.** Постоји јака позитивна корелација између серумских вредности галектина-1 и IL-33 ( $r = 0,870$ ;  $p = 0,001$ ), галектина-1 и IL-1 $\beta$  ( $r = 0,795$ ;  $p = 0,001$ ) и IL-33 и IL-1 $\beta$  ( $r = 0,826$ ;  $p = 0,001$ ) код оболелих од CRC-а са дијагностикованом микроцитном анемијом. Јачина корелације одређена је коришћењем Spearman-овог теста.

### Тромбоза код оболелих од CRC-а је у позитивној корелацији са анемијом

Даљом анализом лабораторијских налаза крвне слике откривен је значајно већи просечни број тромбоцита код групе оболелих од CRC-а са дијагностикованом анемијом у поређењу са групом оболелих од CRC без анемије ( $p = 0,03$ ; Фигур. 13А). Такође, тромбоза је у позитивној корелацији са серумским вредностима IL-33 ( $r = 0,404$ ;  $p = 0,004$ ), Gal-1 ( $r = 0,333$ ;  $p = 0,024$ ) и IL-1 $\beta$  ( $r = 0,335$ ;  $p = 0,020$ ) (Фигур. 13Б).



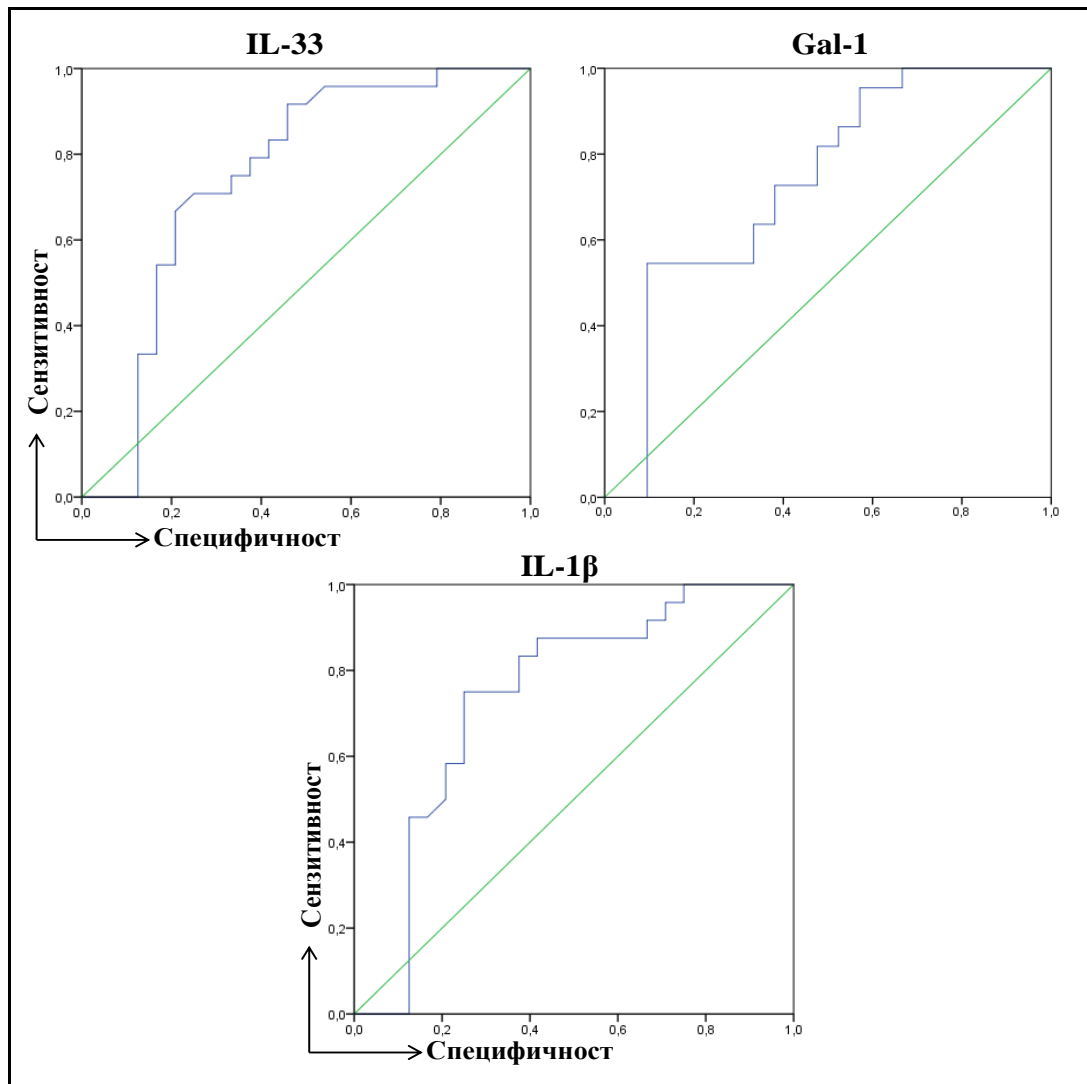
Променљиве	Број тромбоцита	
	Spearman rho	p
IL-33	0,404	0,004
Gal-1	0,333	0,024
IL-1 $\beta$	0,335	0,020

**Фигура 13. А.** Значајно већи број тромбоцита у крви оболелих од CRC-а са анемијом у поређењу са оболелима од CRC-а без анемије. Основно разврставање испитаника извршено је узимајући у обзир концентрацију хемоглобина (експериментална група са анемијом и контролна група без анемије, означено + или -). За аналитичку обраду коришћен MannWhitney RankSum тест. **Б.** Постоји позитивна корелација између броја тромбоцита и концентрације цитокина: IL-33, Gal-1 и IL-1 $\beta$ . Серумске вредности цитокина су одређене ELISA тестом. Јачина корелације одређена је коришћењем Spearman-овог теста.

**Концентрације IL-33, Gal-1 и IL-1 су у негативној корелацији са концентрацијом хемоглобина**

На послетку је анализирана корелација серумских вредности хемоглобина и цитокина IL-33, Gal-1 и IL-1 $\beta$ . Резултати показују умерено негативну корелацију између хемоглобина и серумских вредности IL-33 ( $r = -0,595$ ;  $p = 0,001$ ), Gal-1 ( $r = -0,629$ ;  $p = 0,001$ ) и IL-1 $\beta$  ( $r = -0,572$ ;  $p = 0,001$ ) (Фигур. 14А).

Променљиве	Хемоглобин	
	Spearman rho	p
IL-33	-0,595	0,001
Gal-1	-0,629	0,001
IL-1 $\beta$	-0,572	0,001



**Фигура 14. А.** Умерена негативна корелација између серумских нивоа хемоглобина и серумских вредности IL-33, Gal-1 и IL-1 $\beta$ . Серумске вредности наведених параметара детерминисане серолошким тестирањем. Јачина корелације одређена је коришћењем Spearman-овог теста. **Б.** Специфичност и сензитивност серумских вредности IL-33, Gal-1 and IL-1 $\beta$ . Јачина корелације одређена је коришћењем Spearman-овог теста.

Анализом ROC (Receiver Operating Characteristic) кривуља серумских вредности IL-33, Gal-1 и IL-1 $\beta$  показано је да ови цитокини могу бити предиктивни маркери анемије код оболелих од CRC-а (Фигур. 14Б). Додијени резултати су показали да IL-33 (сензитивност 95,8%, специфичност 45,8%), Gal-1 сензитивност 59,1%, специфичност 66,7%) и IL-1 $\beta$  (сензитивност 75%, специфичност 75%) могу бити значајни маркери за потврду анемије код оболелих од CRC-а. Оптималне граничне вредности (cut off) које омогућавају детекцију анемије код пацијената са CRC-ом су 31,58 pg/ml за IL-33, 7.257,07 pg/ml за Gal-1 и 8,96 pg/ml за IL-1 $\beta$ .

У другом делу истраживања укључено је 59 испитаника са дијагностикованим колоректалним карциномом. Основно разврставање испитаника извршено је узимајући у обзир број тромбоцита у крви, а према дефинисаним критеријумима за тромбозу (103, 89). Прва група је обухватала 24 пацијента са CRC-ом са бројем тромбоцита  $\geq 450 \times 10^9/L$  (експериментална група са тромбозом), док је друга група обухватала 35 пацијената са CRC-ом са бројем тромбоцита  $< 450 \times 10^9/L$  (контролна група без тромбозе). Клиничке и патохистолошке карактеристике ових пацијената приказане су у Табели 5.

**Табела 5.** Клиничке и патохистолошке карактеристике оболелих од CRC-а са и без тромбозе

Карактеристике	Колоректални карцином (CRC) пацијената		
	Без тромбозе	Са тромбозом	<i>p</i> вредност
Пол (мушки/женски)	23/12 [65,71%/34,29%]	12/12 [50%/50%]	0,487
Старост, средња вредност (ранг)	64,82 (50-82)	65,14 (56-80)	0,938
Тромбоцити ( $\times 10^9/L$ )	307,14 $\pm$ 12,36	555,28 $\pm$ 27,13	<b>0,001</b>
Степен хистолошке диференцијације (добар/умерен) [%]	10/25 [28,57%/71,43%]	8/16 [33,34%/66,67%]	0,568
AFP	4,97 $\pm$ 5,56	402,83 $\pm$ 212,03	<b>0,047</b>
CEA	16,89 $\pm$ 5,19	402,18 $\pm$ 178,54	<b>0,002</b>
CA 19-9	12,71 $\pm$ 2,27	814,26 $\pm$ 306,96	<b>0,001</b>

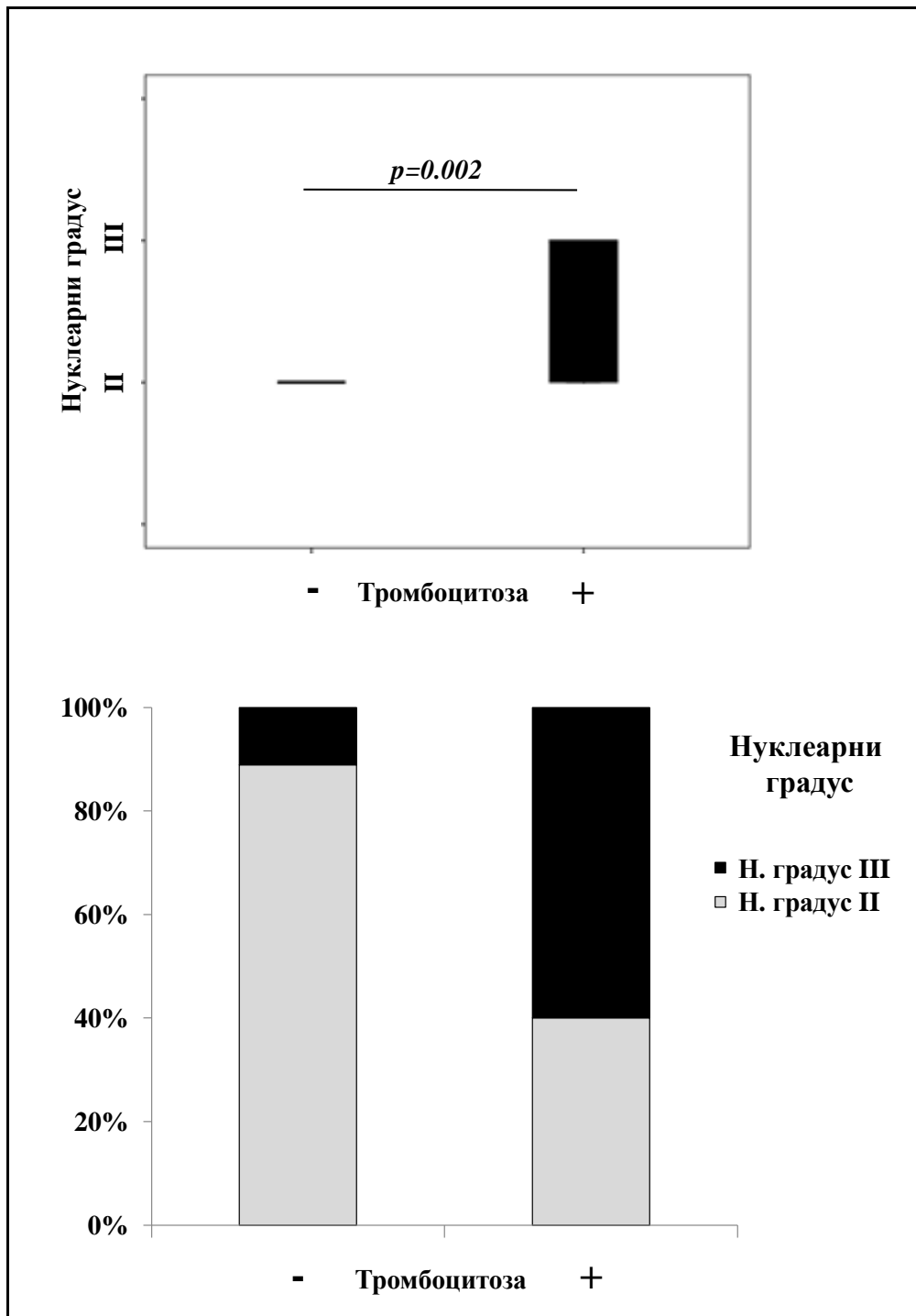
Анализом групних карактеристика, не налази се статистичка значајност у међугрупним разликама према полу и старости. Међутим, вредности биохемијских белега малигне болести AFP, CEA и CA 19-9 у серуму биле су значајније веће код испитаника са CRC-ом и тромбозом у поређењу са контролном групом оболелих од CRC-а без тромбозе (Табела 5).

### **Оболели од CRC-а са тромбозом имају тежи и напреднији облик болести**

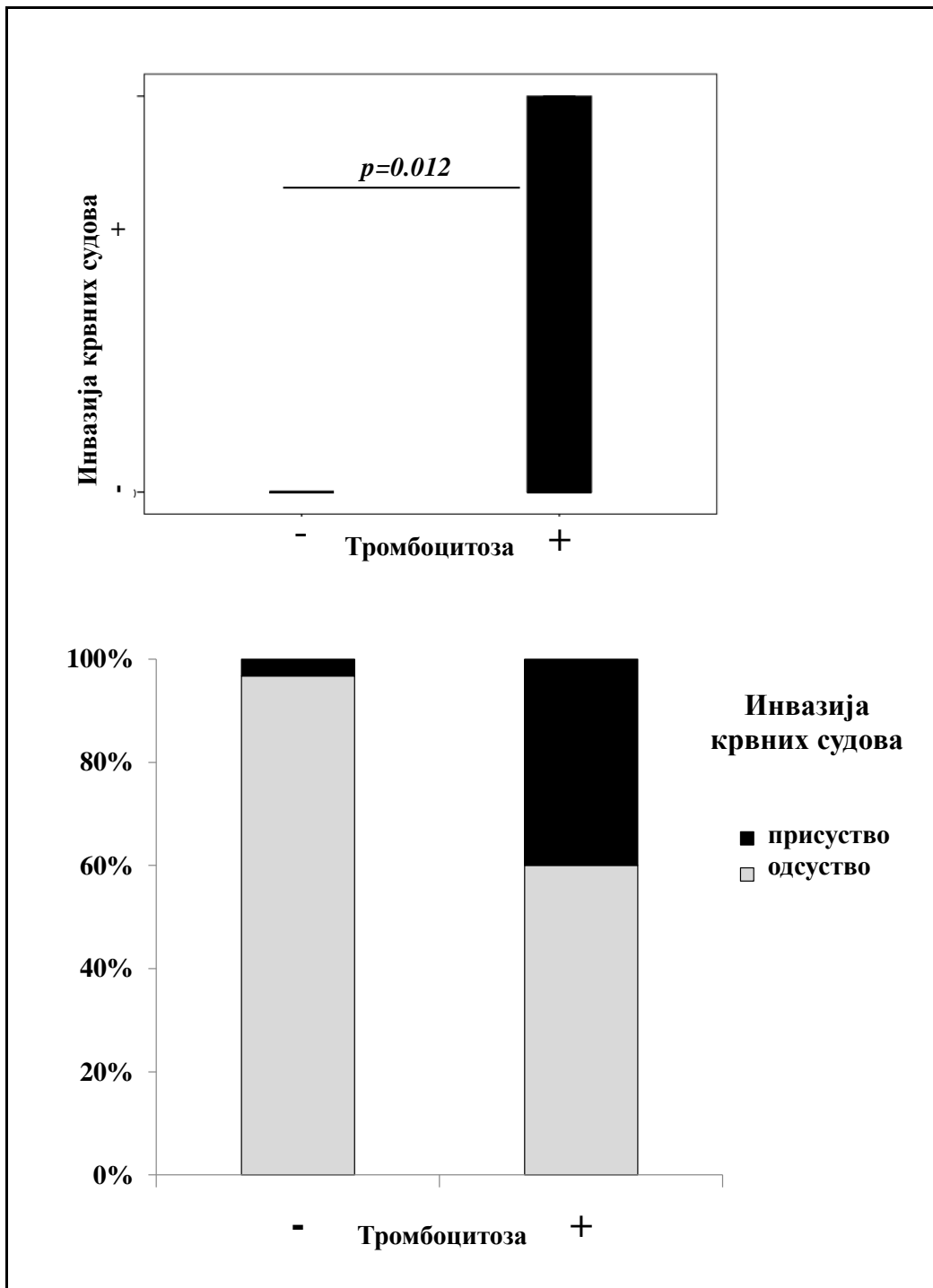
Анализиран је нуклеарни градус ћелија колоректалног карцинома код свих пацијента, а затим су резултати упоређени између дефинисаних група у зависности од присуства или одсуства тромбозе. Одређивање нуклеарног градуса је засновано на основу процене величине и облика једара туморских ћелија и на основу процента туморских ћелија које су у фази ћелијске деобе или раста (106). Добијени резултати показују, да пацијенти оболели од CRC-а са тромбозом имају значајно већи нуклеарни градус туморских ћелија колоректалног карцинома у поређењу са оболелима од CRC-а без тромбозе ( $p = 0,002$ ; Фигур. 15). Унутар ове групе болесника (CRC + тромбоза), нуклеарни градус III забележен је код 60,00 % пацијената, док је унутар контролне групе (CRC без тромбозе) нуклеарни градус III забележен забележен код 11,11 % пацијената (Фигур. 15).

У даљем истраживању код оболелих од колоректалног карцинома обе групе, са и без тромбозе, анализирано је присуство или одсуство инвазије лимфних и крвних судова код обе групе, односно код оболелих од CRC-а са и без тромбозе. Знатно већи проценат оболелих од CRC-а са дијагностикованом тромбозом имао је присутну инвазију крвних ( $p = 0,012$ ; Фигур. 16) и лимфних судова ( $p = 0,010$ ; Фигур. 17), у поређењу са контролном групом оболелих од CRC-а без тромбозе. Унутар ове групе болесника (CRC + тромбоза), инвазија крвних судова забележена је код 40,00 % пацијената (Фигур. 16), док је инвазија лимфних судова забележена код 40,00 % пацијената (Фигур. 17).

Пацијенти оболели од CRC-а са тромбозом имали су већи TNM стадијум (доминантно III или IV), док су оболели од CRC-а без тромбозе углавном имали TNM стадијум I или II, међутим уочене разлике током анализирања података нису дале статистичку значајност (подаци нису приказани). Поред тога, испитивано је присуство метастатских лезија у јетри и плућима и карциноматоза перитонеума. Знатно већи проценат оболелих од CRC-а са тромбозом имао је детектабилне метастатске лезије у јетри ( $p = 0,002$ ; Фигур. 18) и плућима ( $p = 0,001$ ; Фигур. 19), као и карциноматозу перитонеума ( $p = 0,001$ ; Фигур. 20), у поређењу са контролном групом оболелих од CRC-а без тромбозе. Унутар ове групе болесника (CRC + тромбоза), метастатске промене у јетри забележене су код 57,15 % пацијената (Фигур. 18), метастатске промене у плућима забележене су код 33,33 % пацијената (Фигур. 19), а детектабилна карциноматоза перитонеума забележена је код 42,86 % пацијената (Фигур. 20).

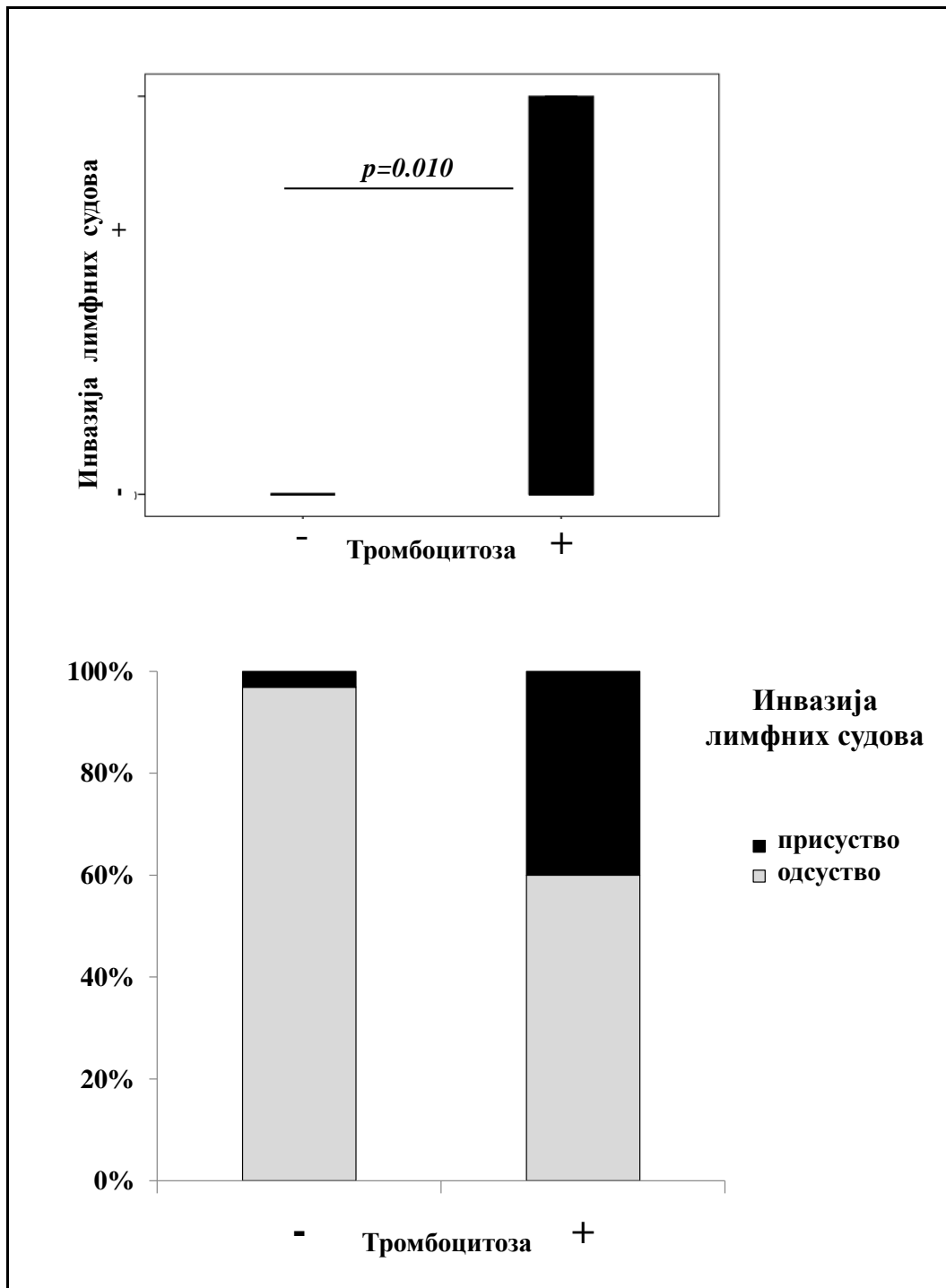


**Фигура 15.** Већи нуклеарни градус колоректалног карцинома код групе оболелих од CRC-а са тромбозом у поређењу са контролном групом оболелих од CRC-а без тромбозе ( $p = 0,002$ ). Основно разврставање испитаника извршено је узимајући у обзир број тромбоцита у крви (без или са тромбозом, означено - или +). Поред тога, извршена је и додатна подела узимајући у обзир нуклеарни градус тумора (I, II и III). Статистичка значајност је тестирана Chi-Square-овим тестом.

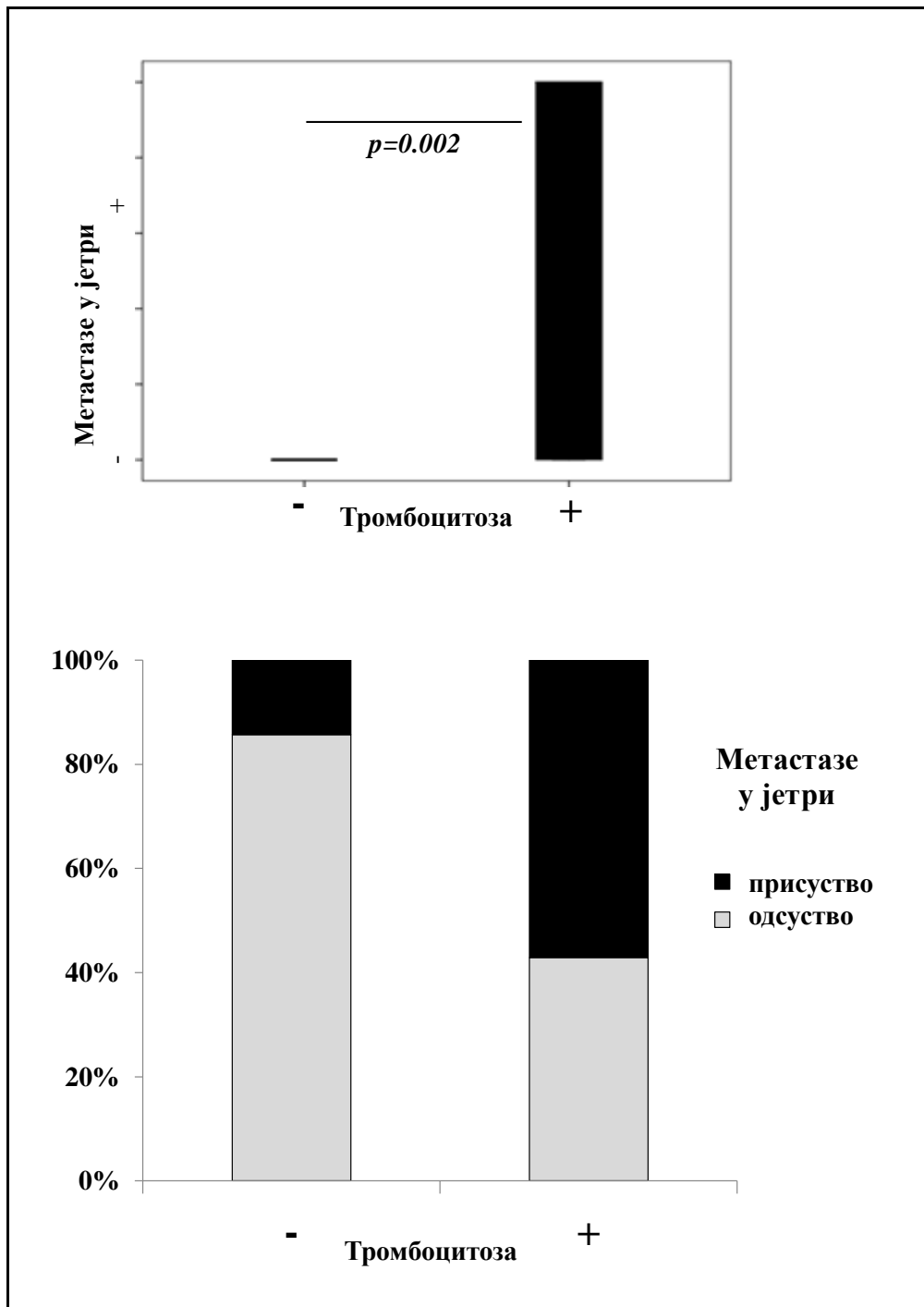


**Фигура 16.** Знатно већи проценат оболелих од CRC-а са дијагностикованом тромбозом је имало присутну инфазују крвних ( $p = 0,012$ ) у поређењу са контролном групом оболелих од CRC-а без тромбозе. Основно разврставање испитаника извршено је узимајући у обзир број тромбоцита у крви (без или са тромбозом, означено - или +). Поред тога, извршена је и додатна подела узимајући у обзир малигну захваћеност крвних судова (присуство/одсуство). Статистичка значајност је тестирана Chi-Square-овим тестом.

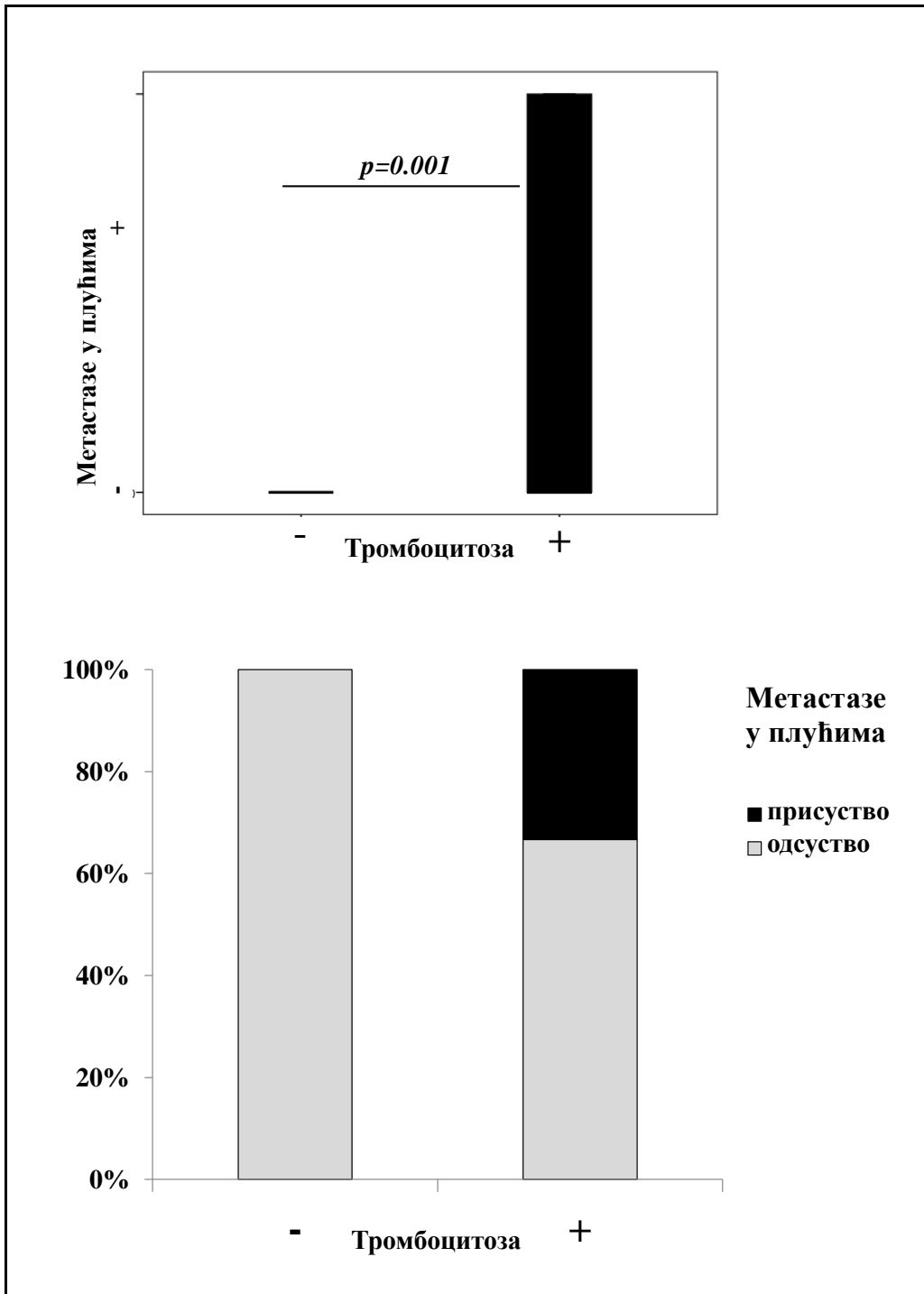




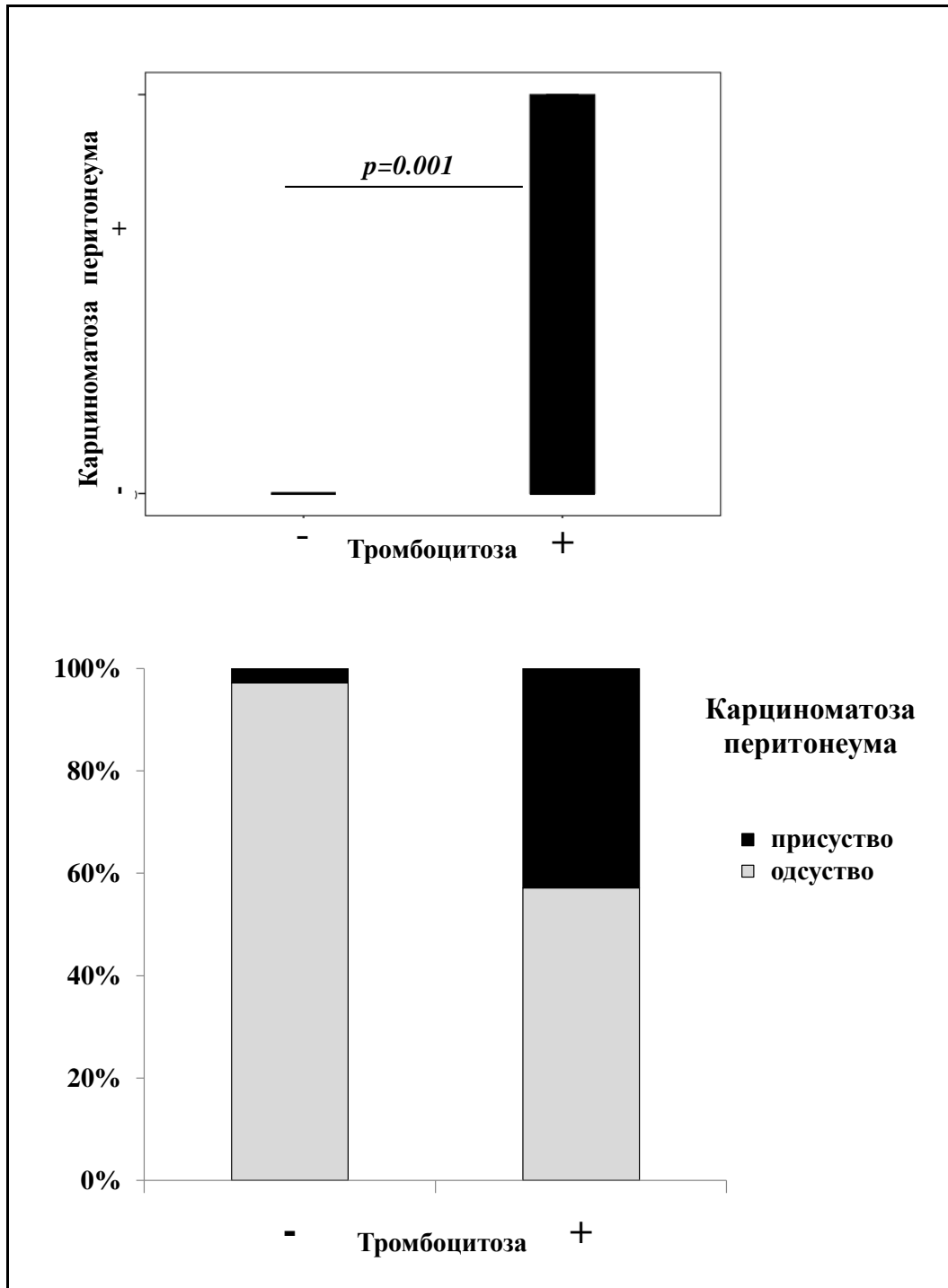
**Фигура 17.** Знатно већи проценат оболелих од CRC-а са дијагностикованом тромбоцитозом је имало присутну инвазију лимфних ( $p = 0,010$ ) у поређењу са контролном групом оболелих од CRC-а без тромбоцитозе. Основно разврставање испитаника извршено је узимајући у обзир број тромбоцита у крви (без или са тромбоцитозом, означено - или +). Поред тога, извршена је и додатна подела узимајући у обзир малигну захваћеност лимфних судова (присуство/одсуство). Статистичка значајност је тестирана Chi-Square-овим тестом.



**Фигура 18.** Већи проценат оболелих од CRC-а са тромбоцитозом имао је детектибилне метастатске лезије у јетри ( $p = 0,002$ ) у поређењу са контролном групом оболелих од CRC-а без тромбоцитозе. Основно разврставање испитаника извршено је узимајући у обзир број тромбоцита у крви (без или са тромбоцитозом, означено - или +). Поред тога, извршена је и додатна подела узимајући у обзир метастатску захваћеност јетре (присуство/одсуство). Статистичка значајност је тестирана Chi-Square-овим тестом.



**Фигура 19.** Већи проценат оболелих од CRC-а са тромбозом имао је детектибилне метастатске лезије у плућима ( $p = 0,001$ ) у поређењу са контролном групом оболелих од CRC-а без тромбозе. Основно разврставање испитаника извршено је узимајући у обзир број тромбоцита у крви (без или са тромбозом, означено - или +). Поред тога, извршена је и додатна подела узимајући у обзир метастатску захваћеност плућа (присуство/одсуство). Статистичка значајност је тестирана Chi-Square-овим тестом.



**Фигура 20.** Већи проценат оболелих од CRC-а са тромбозом имао је присутну карциноматозу перитонеума ( $p = 0,001$ ) у поређењу са контролном групом оболелих од CRC-а без тромбозе. Основно разврставање испитаника извршено је узимајући у обзир број тромбоцита у крви (без или са тромбозом, означено - или +). Поред тога, извршена је и додатна подела узимајући у обзир метастатску захваћеност трбушне марамице (присуство/одсуство малигнух ћелија у пунктату). Статистичка значајност је тестирана Chi-Square-овим тестом.

### **Повећане серумске вредности IL-33 и IL-1 код оболелих од CRC-а са тромбоцитозом**

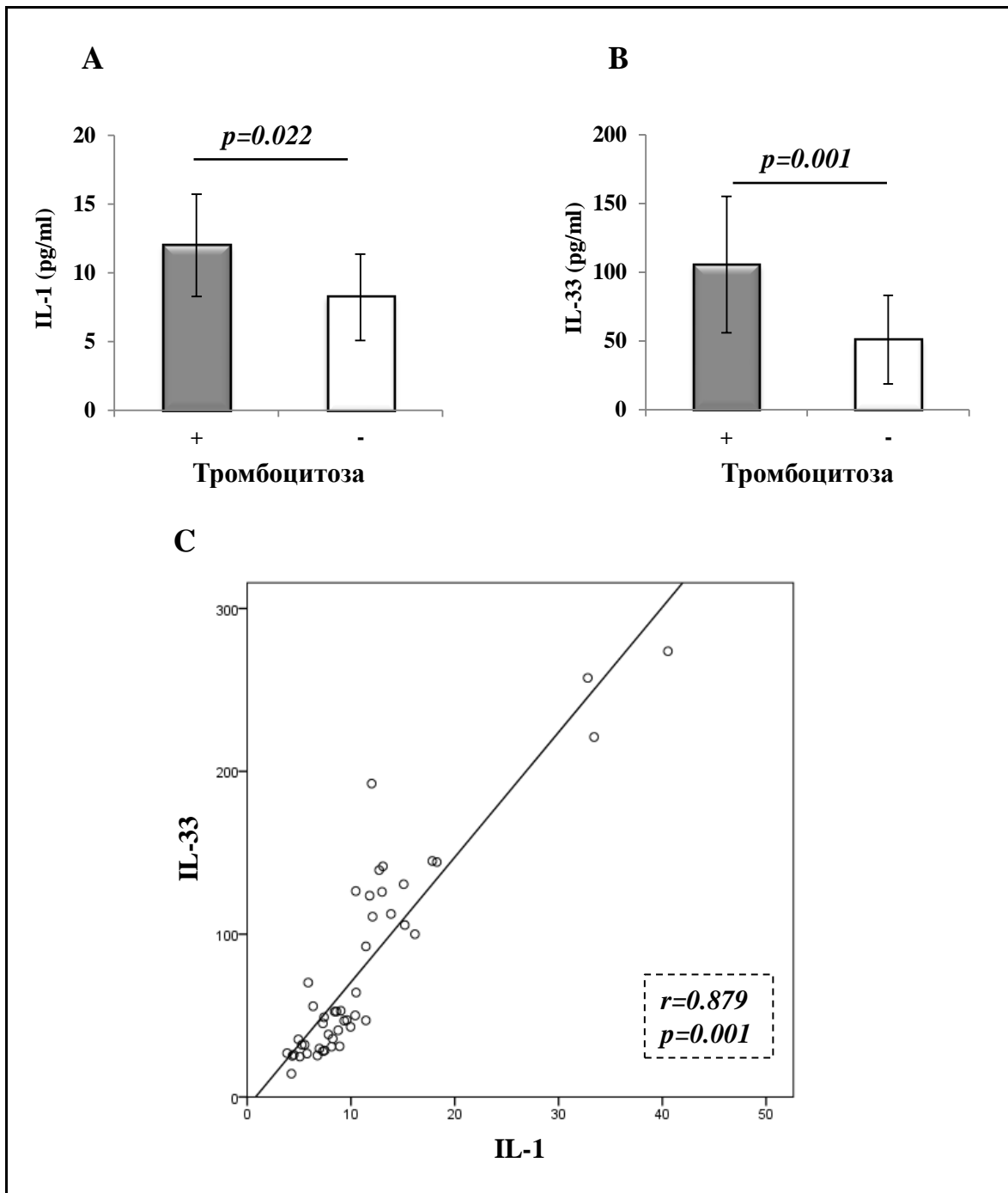
Даљи истраживачки поступак подразумевао је детерминацију серумских вредности параметара од интереса. Одређене су вредности: Gal-3, IL-17, sST2, IL-4, IL-6, TGF- $\beta$ , IFN- $\gamma$ , IL-10, IL-12, IL-13, IL-1, IL-33 и Gal-1 (Табела 6). Серумске концентрације цитокина од интереса измерене су код обе групе пацијената, односно код оболелих од CRC-а са и без тромбоцитозе.

Резултати су показали да су оболели од CRC-а са дијагностикованом тромбоцитозом имали значајно већу концентрацију IL-1 у серуму, у поређењу са оболелима од CRC-а са нормалним бројем тромбоцита ( $p = 0,022$ ; Фигур. 21А). Такође, серумски ниво IL-33 значајно је повећан код оболелих од CRC-а са дијагностикованом тромбоцитозом у поређењу са контролном групом оболелих од CRC-а без тромбоцитозе ( $p = 0,001$ ; Фигур. 21Б). Поред тога, доказана је снажна позитивна корелација између серумских вредности IL -1 и IL-33 ( $r = 0,879$ ;  $p = 0,001$ ; Фигур. 21Ц).

**Табела 6.** Приказ серумских вредности анализираних параметара код испитаника узимајући у обзир тромбоцитозу

Серумске вредности (pg/ml)	Болесници са CRC-ом		p
	са тромбоцитозом (mean±SD)	без тромбоцитозе (mean±SD)	
Gal-3	1.152,27±407,92	1.051,22±432,64	>0,05
IL-17	72,45±14,30	75,91±6,49	>0,05
sST2	933,39±636,81	856,78±539,607	>0,05
IL-4	695,67±126,74	632,08±87,73	>0,05
IL-6	8,96±6,53	10,38±14,11	>0,05
TGF-β	1.112,49±541,44	1.282,69±410,76	>0,05
IFN-γ	193,98±124,59	137,30±58,28	>0,05
IL-10	4,44±2,15	4,16±0,68	>0,05
IL-12	128,03±35,50	136,68±25,15	>0,05
IL-13	410,52±100,71	392,83±108,44	>0,05

Основно разврставање испитаника са дијагностикованим колоректалним карциномом извршено је узимајући у обзир број тромбоцита у крви (експериментална група са тромбоцитозом и контролна група без тромбоцитозе). Серумске вредности наведених параметара детерминисане серолошким тестирањем. За аналитичку обраду коришћен MannWhitney RankSum тест.



**Фигура 21.** А. Оболели од CRC-а са дијагностикованом тромбозом имали су значајно вишу концентрацију IL-1 у серуму у поређењу са контролном групом, односно оболелима од CRC-а и са нормалним бројем тромбоцита ( $p = 0,022$ ). Б. Серумски нивои IL-33 такође су значајније виши код експерименталне групе оболелих од CRC-а са дијагностикованом тромбозом у поређењу са оболелима од CRC-а без тромбозе ( $p = 0,001$ ). Ц. Присутна је снажна позитивне корелације између вредности IL-1 и IL-33 у серуму ( $r = 0,879$ ;  $p = 0,001$ ).

### Преминација у IL-1 и IL33 односу на IL-12, IFN- $\gamma$ и IL-17 у серуму оболелих од CRC-а са тромбоцитозом

Као што је већ описано, системска вредност појединих цитокина/имунорегулаторних протеина важан је показатељ активности малигне болести. Поред тога, због њихове различите улоге у антитуморској или протуморској активности, као и различите улоге у регулисању многих процеса у патогенези болести, такође су веома значајани и њихови међусобни односи.

**Табела 7.** Приказ међусобних односа серумских вредности анализираних параметара код испитаника узимајући у обзир тромбоцитозу

Серумске вредности	Болесници са CRC-ом		<i>p</i>
	са тромбоцитозом (mean $\pm$ SD)	без тромбоцитозе (mean $\pm$ SD)	
TGF- $\beta$ /IL-1	140,31 $\pm$ 88,71	111,98 $\pm$ 43,74	>0,05
TGF- $\beta$ /IL-6	147,45 $\pm$ 80,63	201,17 $\pm$ 85,62	>0,05
TGF- $\beta$ /IL-12	9,52 $\pm$ 5,56	9,57 $\pm$ 3,44	>0,05
TGF- $\beta$ /IL-13	2,93 $\pm$ 1,62	3,50 $\pm$ 1,51	>0,05
TGF- $\beta$ /IL-17	15,65 $\pm$ 7,90	17,11 $\pm$ 5,71	>0,05
TGF- $\beta$ /IFN- $\gamma$	9,10 $\pm$ 8,11	11,41 $\pm$ 6,50	>0,05
IL-10/IL-6	0,54 $\pm$ 0,22	0,63 $\pm$ 0,22	0,045
IL-10/IL-12	0,04 $\pm$ 0,016	0,03 $\pm$ 0,008	>0,05
IL-13/IL-10	105,78 $\pm$ 41,70	95,40 $\pm$ 26,56	>0,05
IFN- $\gamma$ /IL-10	43,80 $\pm$ 18,11	34,09 $\pm$ 15,97	>0,05
IL-17/IL-10	18,42 $\pm$ 5,42	18,70 $\pm$ 3,52	>0,05
sST2/IL-33	20,16 $\pm$ 14,99	11,30 $\pm$ 12,54	0,028

Зато је извршена анализа односа серумских вредности параметара од интереса, као и њихова међугрупна компарација. Серумске вредности наведених параметара детерминисане серолошким тестирањем. За аналитичку обраду коришћен MannWhitney тест.

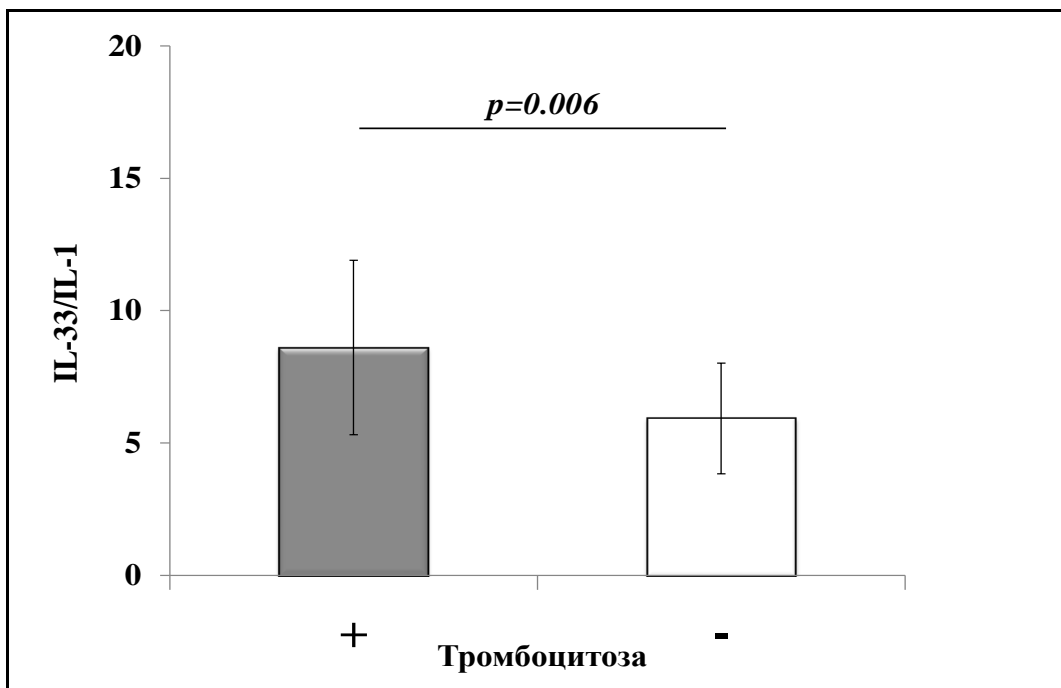


**Табела 8.** Приказ међусобних односа серумских вредности анализираних параметара код испитаника узимајући у обзир тромбоцитозу

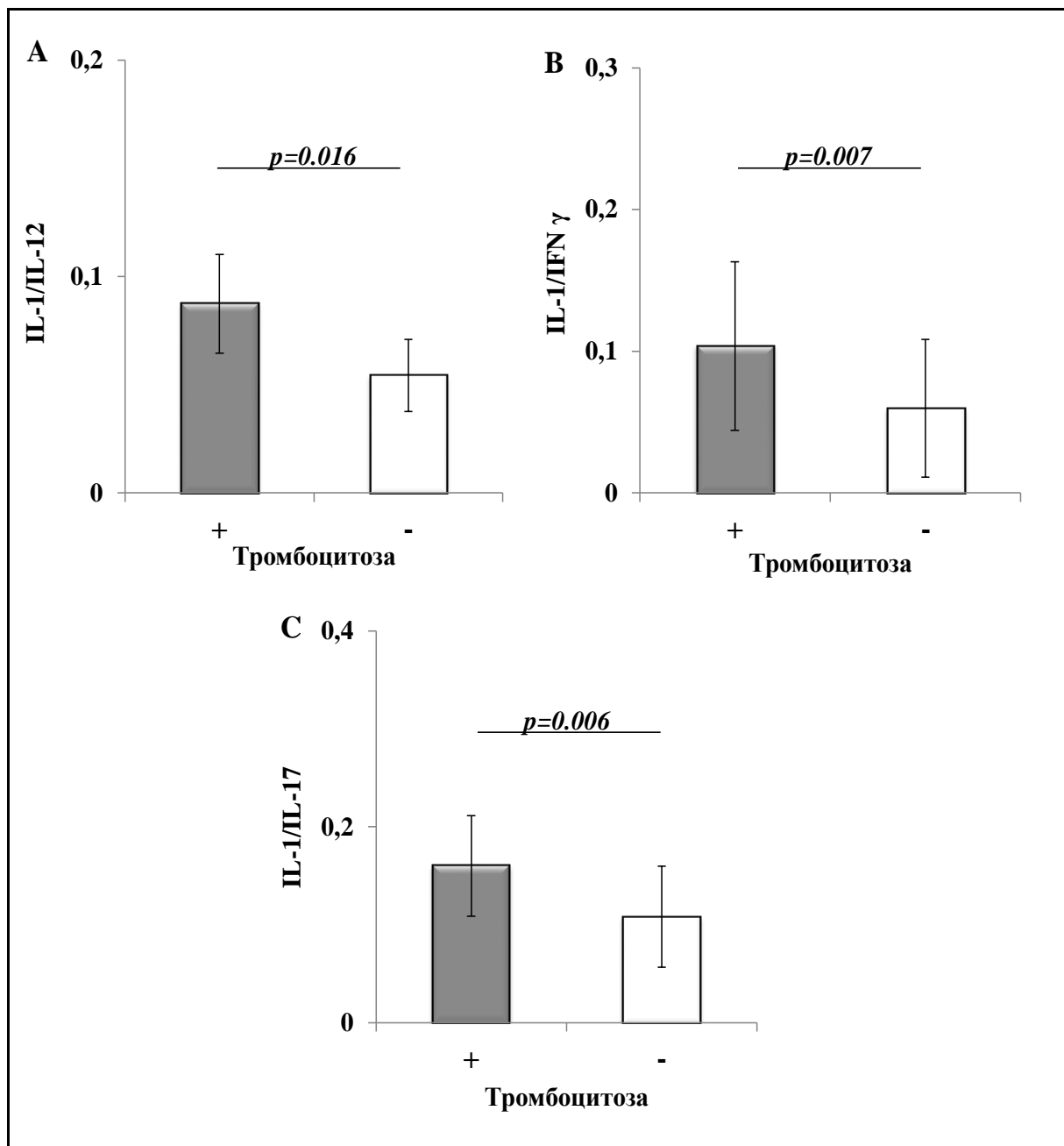
Серумске вредности	Болесници са CRC-ом		p
	са тромбоцитозом (mean±SD)	без тромбоцитозе (mean±SD)	
Gal-3/IL-33	28,79±17,01	15,56±15,12	0,027
Gal-3/TNF- $\alpha$	43,05±166,44	31,19±32,20	>0,05
Gal-3/IL-1	150,39±80,06	99,75±59,80	0,038
Gal-3/IL-6	146,84±53,60	159,02±85,22	>0,05
Gal-3/IL-12	9,61±4,09	8,05±4,06	>0,05
Gal-3/IL-17	16,44±6,31	14,10±6,30	>0,05
Gal-3/IL-4	1,75±0,80	1,67±0,62	>0,05
Gal-3/IL-10	299,35±123,54	250,54±84,17	>0,05
Gal-3/TGF- $\beta$	2,18±3,29	0,95±0,52	>0,05
Gal-1/IL-1	825,46±227,74	781,58±172,65	>0,05
Gal-1/IL-13	18,89±8,05	24,87±9,26	>0,05
Gal-1/IL-10	1.812,57±556,32	2.274,05±784,02	>0,05
Gal-1/TGF- $\beta$	18,11±48,23	8,08±4,67	>0,05

Извршена је анализа односа серумских вредности параметара од интереса, као и њихова међугрупна компарација. Серумске вредности наведених параметара детерминисане серолошким тестирањем. За аналитичку обраду коришћен MannWhitney тест.

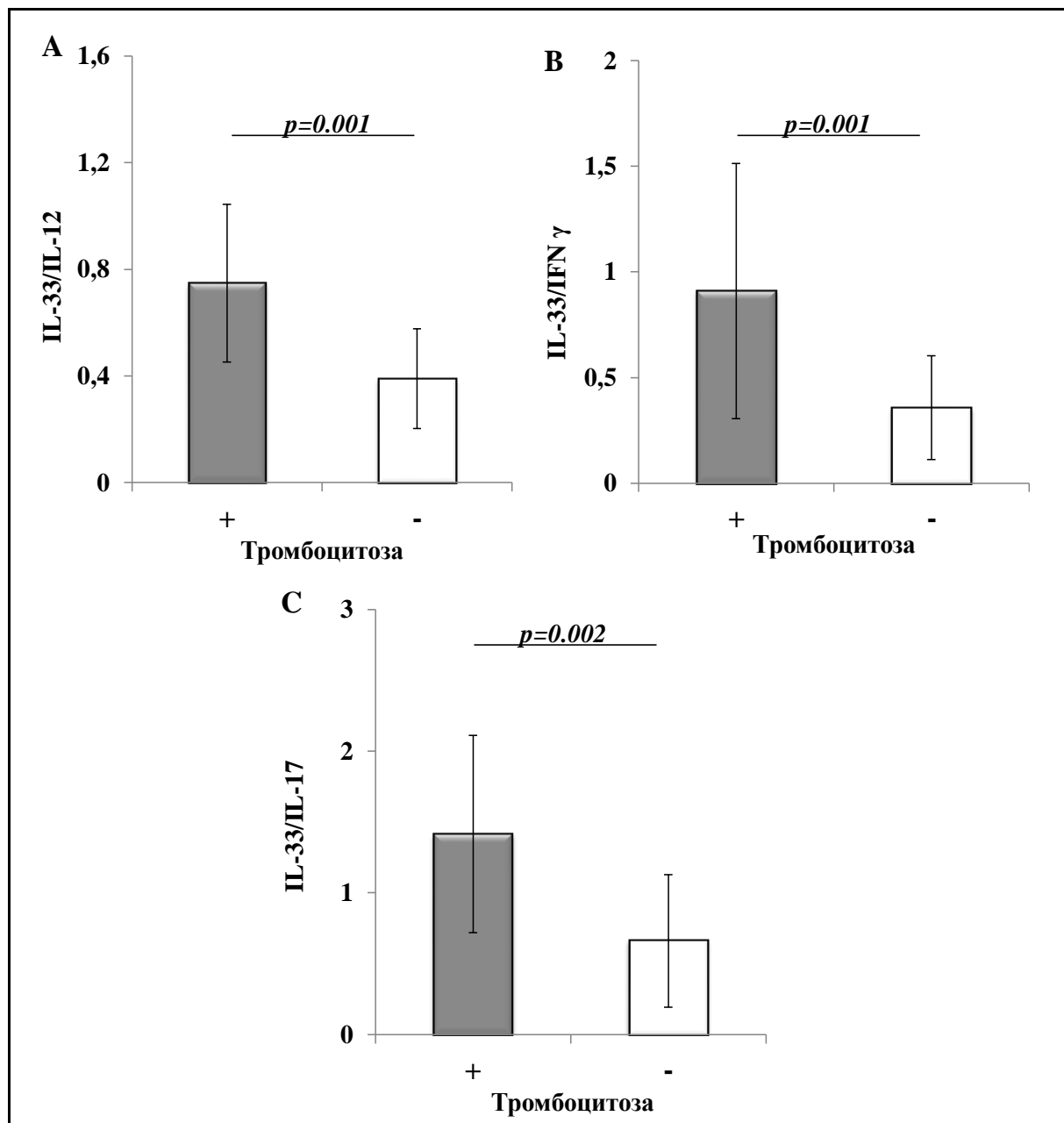
Однос IL-33/IL-1 значајно је повећан код оболелих од CRC-а са тромбоцитозом у односу на оболеле од CRC-а без тромбоцитозе ( $p = 0,006$ ; Фигур. 22). Поред тога, односи IL-1/IL-12 ( $p = 0,016$ ; Фигур. 23А), IL-1/IFN- $\gamma$  ( $p = 0,007$ ; Фигур. 23Б) и IL-1/IL-17 ( $p = 0,006$ ; Фигур. 23Ц) су били значајно већи код оболелих од CRC-а са тромбоцитозом у поређењу са контролном групом оболелих од CRC-а са нормалним бројем тромбоцита. Слично овом резултату, оболели од CRC-а са тромбоцитозом, такође су имали значајно веће односе IL-33/IL-12 ( $p = 0,001$ ; Фигур. 24А), IL-33/IFN- $\gamma$  ( $p = 0,001$ ; Фигур. 24Б) и IL-33/IL-17 ( $p = 0,002$ ; Фигур. 24Ц) у поређењу са групом оболелих од CRC-а са нормалним бројем тромбоцита.



**Фигура 22.** Однос IL-33/IL-1 значајно је повећан код оболелих од CRC-а са тромбоцитозом у поређењу са оболелима од CRC-а без тромбоцитозе ( $p = 0,006$ ).

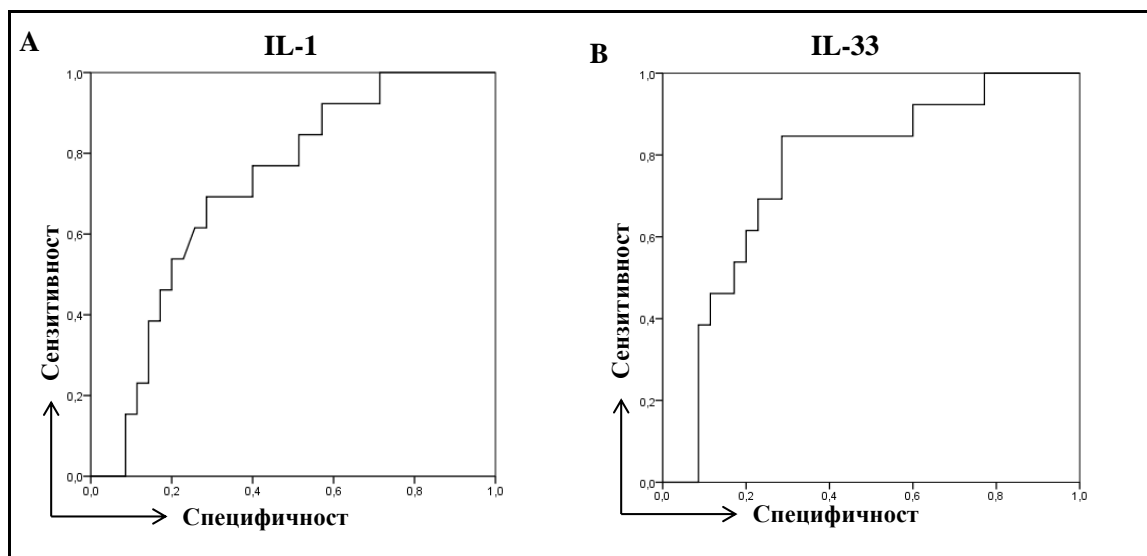


**Фигура 23.** Оболели од CRC-а са тромбозом, у поређењу са контролном групом оболелих од CRC-а без тромбозе имају значајно веће односе: **А.** IL-1/IL-12 ( $p = 0,016$ ); **Б.** IL-1/IFN- $\gamma$  ( $p = 0,007$ ) и **Ц.** IL-1/IL-17 ( $p = 0,006$ ).



**Фигура 24.** Оболели од CRC-а са тромбоцитозом, у поређењу са контролном групом оболелих од CRC-а без тромбоцитозе, имају такође значајно веће односе: **А.** IL-33/IL-12 ( $p = 0,001$ ); **Б.** IL-33/IFN- $\gamma$  ( $p = 0,001$ ) и **Ц.** IL-33/IL-17 ( $p = 0,002$ ).

На крају овог дела истраживања, извршена је анализа сензитивности и специфичности IL-1 и IL-33, у циљу потврде да ли ови цитокини могу бити коришћени за потврду паранеопластичне природе тромбозе код пацијената са CRC-ом. Анализа ROC (Receiver Operating Characteristic) кривуље показује да IL-1 (AUC = 0,718; 95% CI: 0,567–0,868; сензитивности 69,2%, специфичности 62,9%) и IL-33 (AUC = 0,763; 95% CI: 0,614–0,911; сензитивности 84,6%, специфичности 65,7%) могу послужити као потенцијални маркери за потврду паранеопластичне тромбозе код пацијената са CRC-ом (Фигуре 25А, 25Б). Оптималне граничне вредности (cut off) које омогућавају детекцију паранеопластичне тромбозе код пацијената са CRC-ом су 9,47 pg/ml за IL-1 и 49,5 pg/ml за IL-33.



**Фигура 25.** Специфичност и сензитивност серумских вредности IL-1 и IL-33 код оболелих од CRC-а са тромбозом. Анализа ROC (Receiver Operating Characteristic) кривуље показује сензитивност и специфичност за: **А.** IL-1 (AUC = 0,718; 95% CI: 0,567–0,868; сензитивности 69,2%, специфичности 62,9%); и **Б.** IL-33 (AUC = 0,763; 95% CI: 0,614–0,911; сензитивности 84,6%, специфичности 65,7%). Серумске вредности наведених параметара детерминисане серолошким ELISA тестирањем.

## 5. ДИСКУСИЈА

У студији су испитиване системске концентрације цитокина/имуномодулацијских протеина и клиничко-патохистолошке карактеристике болести код оболелих од колоректалног карцинома. Анализирана је њихова корелација са присуством анемије, односно тромбоцитозе. Истраживање је подељено на два дела.

У првом делу истраживања показали смо да оболели од CRC-а са анемијом имају значајно већи нуклеарни градус у поређењу са контролном групом, односно оболелима од CRC-а који нису анемични. Осим тога, оболели од CRC-а са дијагностикованом анемијом имали су значајно израженију инвазију крвних и лимфних судова, већи TNM стадијум болести, већи број детектабилних метастатских лезија у јетри и плућима, као и чешће присутну карциноматозу перитонеума. Такође, оболели од CRC-а са присутном анемијом имали су значајно веће серумске концентрације биохемијских белега малигне болести AFP, CEA, CA 19-9 у поређењу са контролном групом. У серуму оболелих од CRC-а са анемијом измерене су статистички значајно веће вредности IL-33, галектина-1 и IL-1 $\beta$ . Откривена је позитивна корелација између вредности CA 19-9 и IL-1 $\beta$ , као и CA 19-9 и IL-33. Поред тога, у експерименталној групи је доказана позитивна корелација између серумских вредности галектина-1 и IL-33; галектина-1 и IL-1 $\beta$  и IL-33 и IL-1 $\beta$ . Код оболелих од CRC-а са анемијом MCV је значајно нижи у односу на оболеле од CRC-а без анемије. Оболели од CRC-ом са микроцитном анемијом имали су значајно веће серумске концентрације IL-33, Gal-1 и IL-1 $\beta$  у поређењу са оболелима од CRC-а са нормоцитном анемијом или без анемије. У даљем истраживању, доказана је јака позитивна корелација између серумских вредности галектина-1 и IL-33, галектина-1 и IL-1 $\beta$  и IL-33 и IL-1 $\beta$  код оболелих од CRC са микроцитном анемијом као и позитивна корелација броја тромбоцита са анемијом и са серумским вредностима IL-33, Gal-1 и IL-1 $\beta$ . Резултати показују умерено негативну корелацију између хемоглобина и серумских вредности IL-33, Gal-1 и IL-1 $\beta$ , а позитивну корелацију између CA 19-9 и IL-1 $\beta$ , као и CA 19-9 и IL-33. Туморски маркери су били у негативној корелацији са вредностима хемоглобина и MCV-а.

Добијени резултати указују на тежу и прогресивнију форму CRC-а код оболелих са анемијом у поређењу са оболелима без анемије. Како и раније студије потврђују позитивну корелацију између серумских концентрација туморских маркера и прогресије CRC-а, наши резултати указују на постојање знатно тежег облика болести код оболелих од CRC-а са анемијом (108). Потврда теже и прогресивније болести код оболелих од CRC-а са анемијом је у складу са резултатима бројних студија (109).

С обзиром да је анемија учестала код болесника са CRC-ом и може бити један од најчешћих екстраинтестиналних знакова колоректалног карцинома (76), измерили смо вредности MCV-а код ових пацијената како бисмо утврдили тип анемије. Анализе су показале значајно ниже вредности MCV-а код оболелих од CRC-а са дијагностикованом анемијом у поређењу са оболелима од CRC-а без дијагностиковане анемије. Према овим резултатима, могуће је да преминација микроцитне анемије код болесника са CRC-ом указује на гастроинтестинално крварење. Међутим, нормалан распон вредности феритина код пацијената са CRC-ом који имају анемију указује на друге узроке откривене анемије, осим крварења. Према Морену и сарадницима смањене вредности MCV-а са нормалним вредностима феритина, који указују на

анемију хроничних болести (79). Анемија такође може бити проузрокована системским инфламацијским одговором на присуство тумора (76). Анемија повезана са тумором настаје без крварења и резултат је хроничне инфламације и синтезе проинфламацијских цитокина у ћелијама имунског система и тумора, истовремено (83). Ови инфламацијски медијатори изазивају анемију различитим патофизиолошким механизмима (82, 83). Један од њих је стимулација повећане продукције хепцидина у јетри са следственом инхибицијом апсорпције гвожђа у дванаестопалачном цреву. Такође, ови цитокини омогућавају лакше складиштење и задржавање гвожђа унутар макрофага и других ћелија моноцит- макрофагног система, а самим тим ограничавају доступност гвожђа ћелијама црвене крвне лозе. Осим тога, претходна истраживања су показала да проинфламацијски цитокини могу директно да инхибирају пролиферацију и диференцијацију еритроидних прогениторних ћелија у костној сржи, или да могу стимулирати и активирати макрофаге, повећавајући на тај начин процес фагоцитозе еритроцита у јетри и слезини (76, 82, 83).

Како су претходне студије јасно потврдиле улогу проинфламацијских цитокина у развоју и прогресији колоректалног карцинома (76, 82, 83), наше истраживање је надаље засновано на истраживању системских концентрација проинфламацијских цитокина. IL-1 је плеотропни цитокин, укључен у неколико процеса туморогенезе као што су раст тумора, метастазирање и ангиогенеза (34). Осим директног дејства, IL-1 може деловати индиректно, стимулацијом производње матриксних металопроотеиназа и цитокина попут VEGF, IL-8, IL-6, TNF $\alpha$  и TGF $\beta$  (110). У нашој студији, значајно виша системска концентрација IL-1 детектована је код оболелих од CRC-а са анемијом, у поређењу са оболелим без анемије. Детектована је и позитивна корелација између IL-1 и СА 19-9 и негативна корелација између IL-1 и хемоглобина (Фигур. 8Ц, Фигур. 14А). Резултати ранијих студије су у складу с нашим резултатима и указују на важну улогу IL-1 у патогенези анемије. IL-1 утиче на метаболизам гвожђа онемогућавајући коришћење гвожђа у процесима синтезе хемоглобина (111). Поред тога, у *in vitro* условима, IL-1 смањује ниво еритропоетина, индукује структурне промене на еритропоетинским рецепторима, а такође испољава инхибиторно дејство на стварање прогениторских ћелија црвене крвне лозе (111).

Интерлеукин (IL)-33, цитокин из породице IL-1 цитокина, игра важну улогу у регулацији имунског одговора након ћелијског стреса или оштећења ћелија, као и у патогенези CRC-а (46). Доказано је да IL-33 инхибира анти-туморски одговор домаћина, учествује у ремоделирању туморске строме и подспешује ангиогенезу тумора. Такође, IL-33 може да преко активације NF- $\kappa$ B транскрипционог фактора, стимулише продукцију проинфламацијских цитокина чиме поспешује даљу инфламацију (50). Наши резултати су показали значајно већу системску концентрацију IL-33 код оболелих од CRC-а са дијагностикованом анемијом у поређењу са оболелима од CRC-а без дијагностиковане анемије, као и позитивну корелацију између IL-33 и СА 19-9 и негативну корелацију између IL-33 и хемоглобина (Фигур. 8А, Фигур. 14А), што сугерише могућу улогу овог проинфламацијског цитокина у патогенези анемије код болесника са CRC-ом. Резултати других студија указују на прекомерну експресију IL-33 у ендотелним ћелијама што стимулише раст различитих врста хематопоетских прекурсорских ћелија и регулише мијелопоезу и у *in vitro* и у *in vivo* условима, што указује на улогу IL-33 у хематопоези (86, 87). Станковић и коаутори, истичу у свом истраживању да у току акутне инфламације, IL-33/ST2 сигнални пут игра важну улогу у метаболизму Fe, доминантно кроз повећање концентрације гвожђа на месту инфламације са последичним смањењем концентрације хемоглобина у црвеним крвним зрнцима (85). У студији Kenswil-а и коаутора се истиче да је IL-33 експримиран у

ендотелним ћелијама костне сржи и да подстиче развој различитих прекурсорских ћелија хематопоезе. Овај утицај IL-33 се првенствено односио на експанзију мијелоидних прогениторских ћелија, што је у студији потврђено порастом од 2,27 пута ( $p < 0,05$ ) ћелија које формирају гранулоцитно-макрофагне колоније (енглес. *Granulocyte-Macrophage colony-forming units* – CFU-GMs) (86). У студији Talabot-a, на анималном моделу уз коришћење CMV/IL33 мишева са прекомерном експресијом IL-33, приказан је утицај IL-33 на хематопоезу. Ове мишева карактерише повећање локалних и системских нивоа проинфламаторних медијатора, као што су IL-1b, Cxcl-1, G-CSF и IL-6, као и присуство анемије, тромбоцитозе и дисрегулације мијелопоезе. У закључку ове студије аутори истичу значај IL-33 у регулацији мијелопоезе у *in vivo* и у *in vitro* условима (87). Како је недостатак гвожђа најчешћи узрок микроцитне анемије, секвестрација гвожђа потпомогнута високим системским вредностима IL-1 и IL-33, може бити један од алтернативних узрока или потпомажућих фактора за настанак анемије код пацијената са CRC-ом.

Галектин-1 код оболелих од CRC-а игра низ протуморигених активности, тако што утиче на различите аспекте прогресије тумора (61), попут адхезије туморских ћелија, раста тумора, процеса трансформације, пролиферације, ангиогенезе, метастазирања, миграције и апоптозе туморских ћелија (61-63, 66, 112). Концентрација галектин-1 се значајно мења током развоја CRC-а и прекомерна експресија галектина-1 детектована је код слабије диферентованих и инвазивних облика CRC-а, код CRC-а са метастазама у лимфним чворовима (63) и увек је повезана са краћим преживљавањем пацијента (113). Наше претходно истраживање је потврдило значај галектина-1 у патологији CRC-а. Значајно повећане вредности галектина-1 у фецесу детектоване су код болесника са тежим стадијумом CRC-а (114). Штавише, утврђено је постојање позитивне корелације галектина-1 према степену хистолошке диференцијације тумора и биомаркера AFP и СА 19-9 (114). У студији Virág-a и коаутора испитиван је ефекат рекомбинантног галектина-1 на пролиферацију и преживљавање мишијих и хуманих прогениторских и матичних ћелија хематопоезе. Галектин-1 у високим дозама (10  $\mu\text{g/ml}$ ) давао је значајну инхибицију раста ћелија CFU-GM и BFU-E (енглес. *Burst-forming unit-erythroid* – BFU-E), а такође је имао и улогу про-апоптотичког фактора на незреле ћелије хематопоезе (88).

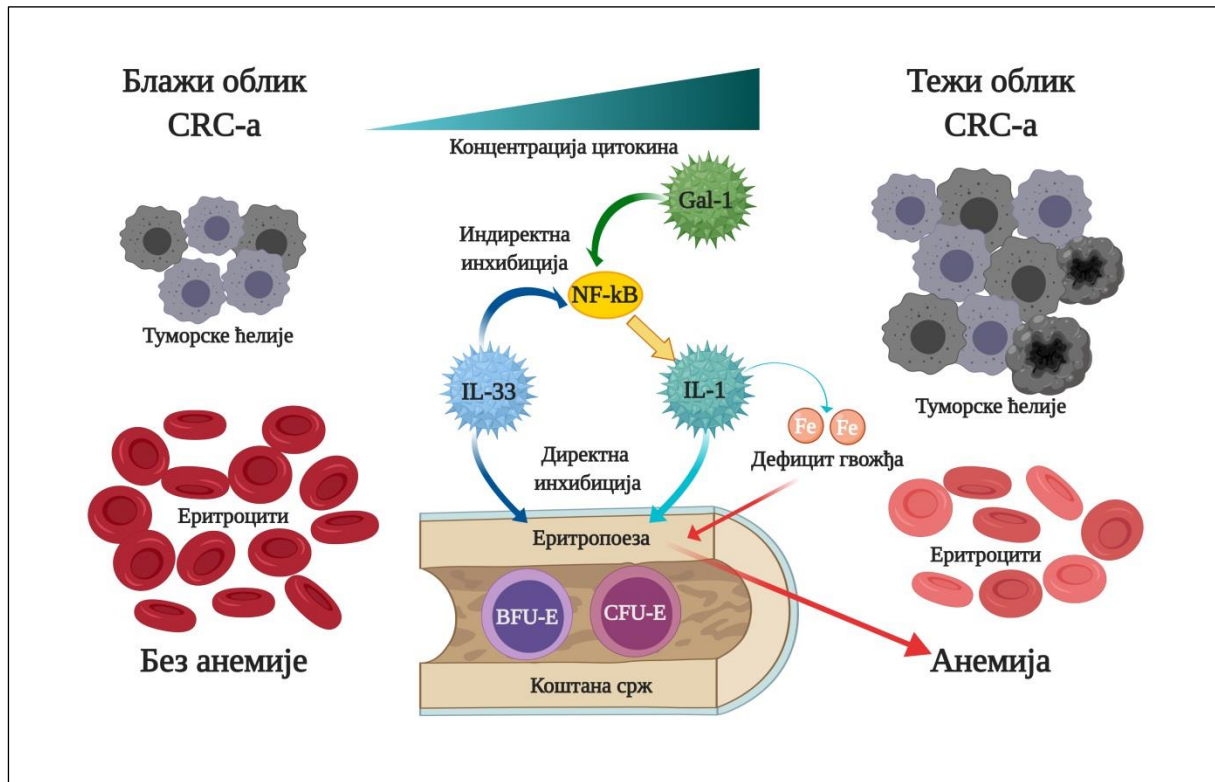
Према нама доступној литератури, ово је прва студија која испитује повезаност системског галектина-1 и анемије код болесника са CRC-ом. Наше истраживање показало је значајно веће системске вредности галектина-1 код болелих од CRC-а са анемијом у поређењу са оболелим од CRC-а без анемије (Фигур. 8Б). Штавише, серумска концентрација галектина-1 негативно корелира са хемоглобином (Фигур. 14А). IL-1 и IL-33 су чланови исте фамилије IL-1 цитокина и као такви деле многе заједничке ефекторске функције (115). Са друге стране, галектин-1 и IL-33 имају сличан ефекат на прогресију тумора тумора код CRC-а, првенствено олакшавајући ћелијама тумора да заобиђу апоптозу и антитуморски имунски одговор домаћина (48, 66, 67). Могуће је да галектин-1 преко НК-кВ сигналног пута промовише синтезу проинфламацијских цитокина, попут IL-1 и следствено инхибира еритроцитопоезу.

Позитивна корелација између системских вредности галектина-1, IL-33 и IL-1 код оболелих од CRC-а са дијагностикованом анемијом указује на могући синергистички ефекат ових цитокина у патогенези анемије. На основу претходно изнетих података, сматрамо да IL-1 и IL-33 директно инхибирају синтезу хемоглобина отежавајући доступност гвожђа, док галектин-1 и IL-33 испољавају своје дејство индиректним путем, активирајући транскрипциони фактор NF-кВ и подстичући производњу



Колоректални карцином: утицај системских концентрација цитокина и патохистолошких карактеристика на анемију и тромбоцитозу

проинфламацијских цитокина, попут IL-1 али и других, који затим директно инхибирају еритроцитопоезу (Фигур. 26).



**Фигура 26. Могући заједнички механизми деловања IL-1, IL-33 и галектина-1 у патогенези инфламацијске анемије код оболелих од колоректалног карцинома.** На дијаграму је шематски приказано симултано дејство цитокина у настанку инфламацијске анемије код пацијената са CRC-ом: 1. директно инхибиторно дејство IL-1 и IL-33 на незреле ћелије еритроидне лозе, уз придодати утицај IL-1 на метаболизам гвожђа и 2. индиректно дејство Gal-1 и IL-33 преко транскрипционг фактора NF-kB чиме се подстиче производњу проинфламаторних цитокина, попут IL-1, који затим последично директно инхибирају еритроцитопоезу.

Анализом ROC (Receiver Operating Characteristic) кривуља серумских вредности IL-33, Gal-1 и IL-1 $\beta$  показано је да ови цитокини могу бити предиктивни маркери развоја анемије код оболелих од CRC-а (Фигур. 14Б).

Оболели од CRC-а са анемијом имали су значајно већи број тромбоцита у поређењу са оболелима од CRC-а без анемије (Фигур. 13А). Системске вредности цитокина Gal-1, IL-1 и IL-33 позитивно су корелирале са већим бројем тромбоцита (Фигур. 13Б). Претходне студије показују да IL-1 стимулише мегакариопоезу и тиме директно повећава број тромбоцита (100). Студије на анималном моделу су показале да мишеви са прекомерном експресијом IL-33 имају анемију и тромбоцитозу (87). Могуће објашњење за тромбоцитозу и позитивну корелацију између већег броја тромбоцита и

медијатора од интереса, јесте да повећани нивои IL-1 и IL-33 могу директно да индукују мегакариоцитопоезу, а тиме и тромбозу.

Резултати показују веће системске вредности галектина-1, IL-1 и IL-33 код оболелих од CRC-а са анемијом, потврђујући ове цитокине као нове, до сада недовољно истражене, медијаторе у настанку и прогресији инфламацијске анемије. Ово истраживање указује на нов механизам настанка анемије код оболелих од CRC-а, поред манифестног или окултног крварења, и заслужује потврду у будућим истраживањима.

У другом делу истраживања анализирани су оболели од CRC-а са и без тромбозе. Показали смо да оболели од CRC-а са тромбозом имају значајно већи нуклеарни градус туморских ћелија, знатно израженију инвазију крвних и лимфних судова, као и проценат детектабилних метастатских лезија у јетри, плућима и карциноматозе перитонеума, у поређењу са групом оболелих од CRC-а без тромбозе. Такође, код оболелих од CRC-а са дијагностикованом тромбозом измерене су веће серумске концентрације биохемијских белега малигне болести AFP, CEA и CA 19-9 (Табела 5). Поред тога, доказане су повећане серумске вредности цитокина IL-1 и IL-33 код оболелих од CRC-а са тромбозом, у поређењу са групом оболелих од CRC-а без тромбозе. Однос цитокина IL-33/IL-1 значајно је већи код оболелих од CRC-а са тромбозом у односу на оболеле од CRC-а без тромбозе, а детектована је и преминација IL-33 и IL-1 у односу на IL-12, IFN- $\gamma$  и IL-17. Анализа резултата, показује да IL-1 и IL-33 могу послужити као маркери за потврду паранеопластичне природе тромбозе код пацијената са CRC-ом.

Резултати другог дела истраживања указују на постојање тежег и агресивнијег облика болести код експерименталне групе испитаника, односно групе оболелих од CRC-а са тромбозом. Добијени резултати су у складу са налазима претходних студија, које између осталог истичу да повећане концентрације туморских маркера код пацијената указују на тежи облик болести и агресивнији тип тумора, и да се могу сматрати факторима ризика лошије прогнозе код оболелих од CRC-а (116).

Реактивна тромбоза представља повишен број тромбоцита ( $\geq 450 \times 10^9/L$ ) који настаје као секундарни поремећај и према подацима из литературе може бити узрокована недостатком гвожђа, акутном инфекцијом или хроничним инфламацијским процесима (89). У новије време, карциноми се све чешће повезују са настанком паранеопластичне тромбозе (90). Доказано је да су убрзани раст тумора и појачана метастатска дисеминација туморских ћелија често удружени са тромбозом (91). У неколико недавних студија је истраживана веза између малигну болести и секундарне тромбозе, а објављени резултати говоре о повезаности тромбозе и лошије прогнозе код оболелих од CRC-а (92-96). Тромбоза је повезана са краћим општим и карцином-специфичним преживљавањем, као и краћим периодом без рецидива болести. Доказана је значајна позитивна корелација тромбозе са локализацијом тумора у колону, са T3-4 стадијумом болести, са присутним метастазама, захваћениошћу лимфних чворова и лимфних судова, као и са лошијом хистолошком диференцијацијом туморских ћелија (94). Sasaki и коаутори су показали да је канцер-специфично преживљавање код оболелих од CRC-а са тромбозом значајно краће у поређењу са оболелима од CRC-а без дијагностификоване тромбозе (95). Осим тога што присутна тромбоза представља један од параметара негативне прогнозе код CRC-а, она се може користити као клинички користан, неинвазивни и јефтин маркер за лакшу процену ризика или бити водич у постоперативном праћењу и лечењу болесника (94). Друге студије потврђују да је број тромбоцита значајан и код

метастаског облика колоректалног карцинома (mCRC), где се може користити као вредан прогностички маркер дужине преживљавања ових пацијената (96). Поред тога, постојање хематолошких абнормалности, попут анемије и тромбозе, пре почетка лечења се такође могу сматрати корисним прогностичким факторима код болесника са CRC-ом (117). Резултати ове студије су у складу са наведеним студијама и указују на постојање тежег и прогресивнијег облика колоректалног карцинома код пацијената са дијагностикованом тромбозом.

Различити хуморални фактори, медијатори запаљења и цитокини повезани са малигном болешћу утичу на прекомерно стварање тромбоцита код болесника са тумором и на тај начин доприносе настанку тумором-стимулисаним тромбоцитопоезама (91, 97). У циљу истраживања потенцијалне улоге поменутих молекула у развоју паранеопластичне тромбозе, анализирана је системска концентрација цитокина од интереса. IL-1 је цитокин укључен у мноштво проинфламацијских процеса, али поред тога значајан је и у процесима туморогенезе и прогресије тумора (118). Поред директног стимулативног утицаја на пролиферацију туморских ћелија, такође су у литератури приказани резултати да IL-1 $\alpha$ , из ћелија карцинома колоне, може појачати ангиогенезу модулацијом стромалних ћелија у туморској микросредини (33). У нашем истраживању, код оболелих од CRC-а са дијагностикованом тромбозом измерени су значајно више системске вредности IL-1 у поређењу са контролном групом оболелих од CRC-а са нормалним бројем тромбоцита (Фигур. 21А). Значај IL-1 у настанку тромбоцитопоезе је предмет истраживања многих ранијих студија (98–100). Yang и коаутори су објавили резултате о дејству IL-1 $\beta$  и његовом стимулативном ефекту на стварање јединица мегакариоцитних колонија (енглес. *Colony forming unit-megakaryocyte*, CFU-Mk). Показали су да мегакариоцитне ћелије имају рецепторе за IL-1 на својој површини (98). Слично овој студији, и резултати других студија су показали да једна доза IL-1 може да стимулише пораст производње тромбоцита током 3 недеље (99). Дејство IL-1 $\beta$  на тромбоцитопоезу је доказано и на анималним моделима. Давање рекомбинантног хуманог IL-1 $\beta$  мушким C57B1/6 мишевима је као последицу изазвало запажену тромбозу, која је око 2-3 пута већа код мишева третираних IL-1 $\beta$  у поређењу са контролном групом мишева (100). Ови резултати су у складу са резултатима нашег истраживања, и сви заједно указују на важну улогу IL-1 у развоју тромбозе.

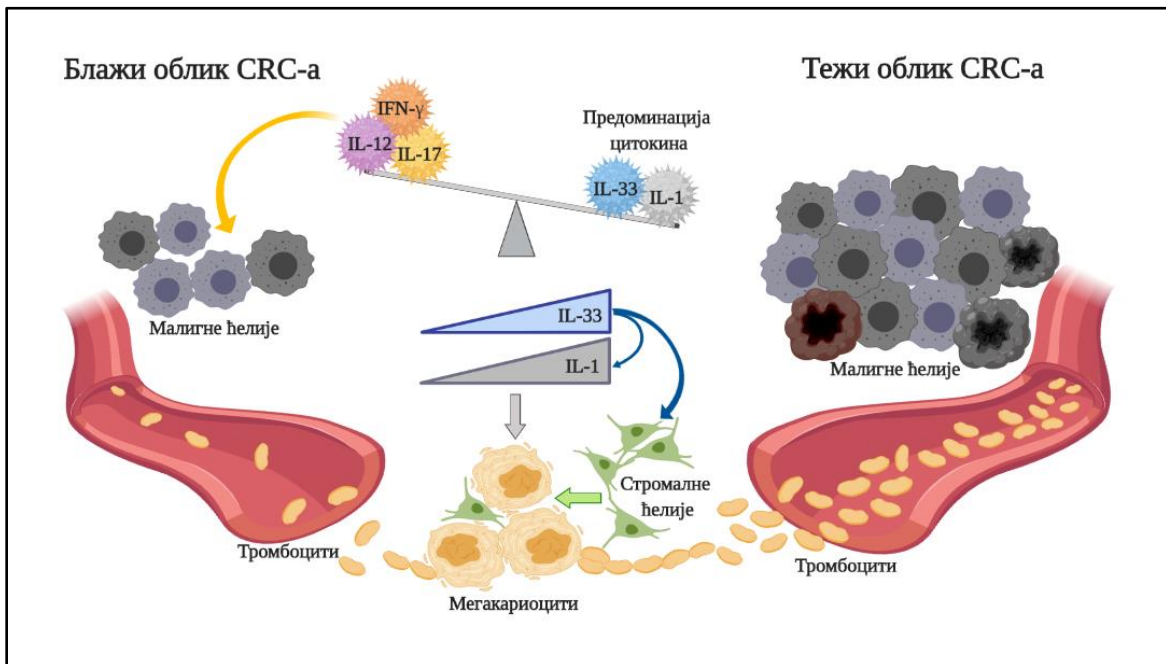
IL-33 члан је велике IL-1 породице цитокина, углавном је експримиран у епителним ћелијама мукозе (46). Раније студије потврдиле су важну улогу IL-33 у патогенези CRC-а (46). Познато је да IL-33 активира одређене гене матичних ћелија, мобилише макрофаге у туморску микросредину где фацитира производњу простагландина E2, што води промоцији карциногенезе CRC-а и олакшава метастазирање (48, 51). Узимајући у обзир нама доступне информације, сматрамо да наше истраживање по први пут описује пораст концентрације IL-33 у серуму оболелих од CRC-а са дијагностикованом тромбозом у поређењу са оболелима од CRC-а без присутне тромбозе (Фигур. 21Б). У складу са нашим резултатима, у литератури налазимо различите студије на животињским моделима или клиничке студије које указују на значај IL-33 у патогенези тромбозе (87, 119). Talabot и коаутори у свом раду описују да CMV/IL33 мишеве са прекомерном експресијом IL-33 карактерише повећање локалних или системских нивоа проинфламацијских медијатора, као што су IL-1b, Sxcl-1, G-CSF и IL-6. Ови мишеви такође пате од анемије, тромбозе и дисрегулације мијелопоезе (87). Друга студија је показала да је ST2, мембрански рецептор за IL-33, експримиран углавном на ендотелним, мезенхималним и раним мијелоидним ћелијама коштане сржи. Активација IL-33/ST2 сигналног пута на овим

ћелијама индукује производњу различитих растворљивих молекула, цитокина и других медијатора, који затим подстичу развој и пролиферацију мијелоидних ћелија (119). Предходне студије јасно потврђују корелацију између тромбозе и краћег општег преживљавања (енглес. *Overall Survival – OS*), као и краћег преживљавања без појаве болести (енглес. *Disease Free Survival – DFS*) (93, 120). Поред броја тромбоцита, у новије време се користе и други индикатори повезани са тромбоцитима, као што су тромбоцитокрит (енглес. *Plateletcrit – PCT*), средњи волумен тромбоцита (енглес. *Mean Platelet Volume – MPV*) и ширина дистрибуције тромбоцита (енглес. *Platelet Distribution Width – PDW*), који такође могу бити у корелацији са краћим преживљавањем оболелих од CRC-а, те се могу користити као потенцијални прогностички фактори (121). По нашем сазнању, мада поједине студије истичу да је развој и прогресија CRC-а повезана са измењеним серумским концентрацијама IL-1, утицај овог цитокина на опште преживљавање оболелих од CRC-а није до краја добро дефинисан (122, 123), док значај концентрације IL-33 у серуму, као потенцијалног маркера преживљавања код оболелих од CRC-а још увек није истраживана.

Поред тога, наша студија је показала преминацију IL-1 и IL-33 над проинфламацијским цитокинима IL-12, IFN- $\gamma$  и IL-17 (Фигур. 23А, 23Б и 23Ц и Фигур. 24А, 24Б и 24Ц), који су познати по својој кључној улози у анти-туморском имунском одговору (57). Занимљива је чињеница да у серуму оболелих од CRC-а са тромбозом IL-33 такође преминара над IL-1 (Фигур. 22). Преминација IL-1 и IL-33 над цитокинима, који се сматрају носиоцима антитуморског имунитета, код оболелих са тромбозом може делимично да објасни тежи и прогресивнији облик болести код пацијената са CRC-ом.

Јака позитивна корелација између серумских вредности IL-1 и IL-33, и припадност истој породици цитокина, указује на могући заједнички ефекат, односно синергистичко дејство ових цитокина у настанку тромбозе код оболелих од CRC-а. Овај истовремени ефекат може се остварити на најмање два начина: 1) IL-1 може директно утицати на мегакариоците и тиме подстицати производњу тромбоцита; 2) IL-33 може посредно стимулирати стромалне ћелије у коштаном сржи да производе цитокине и друге медијаторе, који могу затим у другом кораку стимулирати тромбоцитопоезу код болесника са CRC-ом (Фигур. 27).

**Фигура 27. Потенцијални синергистички механизам деловања ИЛ-1 и ИЛ-33 у патогенези и развоју тромбоцитозе код оболелих од колоректалног карцинома**



**Фигура 27.** На дијаграму је схематски приказано симултано дејство цитокина у настанку паранеопластичне тромбоцитозе: 1. директно стимулативно дејство ИЛ-1 на мегакариоците и 2. индиректно дејство ИЛ-33 на мегакариоците остварено преко стромалних ћелија коштане сржи. Оба цитокина (ИЛ-1 и ИЛ-33) имају потенцијалну заједничку улогу у патогенези тромбоцитозе код оболелих од CRC. Осим тога, на дијаграму је приказана преминација ИЛ-1 и ИЛ-33 над проинфламацијским цитокинима (ИЛ-12, ИЛ-17 and IFN- $\gamma$ ) код тежег облика колоректалног карцинома.

Предложени механизам, додатно потврђује анализа ROC (Receiver Operating Characteristic) кривуља за ИЛ-33 и ИЛ-1, која показује да ови цитокини могу послужити као потенцијални маркери за потврду паранеопластичне тромбоцитозе код оболелих са CRC-ом (Фигуре 25А, 25Б).

Повећане системске концентрације ИЛ-1 и ИЛ-33 код пацијената са CRC-ом имплицирају на важну улогу ових цитокина у генези и прогресији тромбоцитозе. Серумски нивои ИЛ-1 и ИЛ-33 могу се користити као потенцијални дијагностички маркери за паранеопластичну тромбоцитозу код пацијената са CRC-ом.

## 6. ЗАКЉУЧЦИ

Наши истраживачки резултати показују присуство тежег и прогресивнијег облика болести код оболелих од CRC-а са анемијом, односно тромбозом. Код оболелих од CRC-а са анемијом доказане су повећане системске вредности галектина-1, IL-1 и IL-33, док су код оболелих од CRC-а са тромбозом повећани IL-1 и IL-33. Серумске вредности галектина-1, IL-1 и IL-33 могу се користити као предиктивни маркери инфламацијске анемије, односно паранеопластичне тромбозе код оболелих од колоректалног карцинома. Наши резултати, такође, показују потенцијалну улогу галектина-1, IL-1 и IL-33 у патогенези анемије и тромбозе оболелих од CRC-а, која захтева даља истраживања.

У прилог потврде изведеног закључка износимо доленаведене доказе:

1. Оболели од CRC-а са анемијом имају тежу и унапредовалу болест (нуклеарни градус, степен инвазије лимфних и крвних судова, TNM стадијум болести, детектоване метастазе у плућима, јетри или перитонеуму);
2. Значајно веће серумске концентрације IL-33, Gal-1 и IL-1 $\beta$  као и позитивна корелација између серумских вредности галектина-1, IL-33 и IL-1 $\beta$  детектоване су код оболелих од CRC-а са анемијом;
3. Тромбоза код оболелих од CRC-а је у позитивној корелацији са анемијом, као и са серумским вредностима IL-33, Gal-1 и IL-1 $\beta$ ;
4. Концентрације IL-33, Gal-1 и IL-1 су у негативној корелацији са концентрацијом хемоглобина;
5. IL-33, Gal-1 и IL-1 $\beta$  могу бити предиктивни маркери инфламацијске анемије код оболелих од CRC-а;
6. Код оболелих од CRC-а са тромбозом вредности биохемијских белега малигне болести (AFP, CEA и CA 19-9) у серуму, биле су значајно веће у поређењу са оболелима од CRC-а без тромбозе;
7. Оболели од CRC-а са тромбозом имају тежи и напреднији облик болести (нуклеарни градус, степен инвазије лимфних и крвних судова, метастазе у плућима, јетри или перитонеуму) у поређењу са оболелима од CRC-а без тромбозе;
8. Оболелих од CRC-а са тромбозом имају повећане серумске вредности IL-33 и IL-1 у поређењу са оболелима од CRC-а без тромбозе;
9. У серуму оболелих од CRC-а са тромбозом присутна је преминација IL-1 и IL-33 односу на IL-12, IFN- $\gamma$  и IL-17;
10. IL-1 и IL-33 могу послужити као потенцијални маркери за потврду паранеопластичне тромбозе код пацијената са CRC-ом.

## 7. СКРАЋЕНИЦЕ

<b>CRC</b>	(енглес. ColoRectal Cancer)
<b>IARC</b>	(енглес. International Agency for Research on Cancer)
<b>WHO</b>	(енглес. World Health Organisation)
<b>HDI</b>	(енглес. Human Development Index)
<b>ASIR</b>	(енглес. Age Standardized Incidence Rate)
<b>ASMR</b>	(енглес. Age Standardized Mortality Rate)
<b>AAPC</b>	(енглес. Average Annual Percentage Change)
<b>IBD</b>	(енглес. Inflammatory Bowel Disease)
<b>HPCC</b>	(енглес. Hereditary polyposis colorectal cancer)
<b>HNPCC</b>	(енглес. Hereditary non-polyposis colorectal cancer)
<b>FAP</b>	(енглес. Familial adenomatous polyposis)
<b>AFAP</b>	(енглес. Attenuated Familial Adenomatous Polyposis)
<b>MAP</b>	(енглес. MUTYH associated polyposis)
<b>NAP</b>	(енглес. NTHL1 associated polyposis)
<b>PPAP</b>	(енглес. Polymerase proofreading-associated Polyposis)
<b>APC</b>	(енглес. Adenomatous Polyposis Coli)
<b>MSI-H</b>	(енглес. High Microsatellites Instability)
<b>UC</b>	(енглес. Ulcerative colitis)
<b>CD</b>	(енглес. Crohn's Disease)
<b>BMI</b>	(енглес. Body Mass Index-)
<b>NSAID</b>	(енглес. Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs)
<b>CAC</b>	(енглес. Colitis Associated Carcinoma)
<b>AOM/DSS</b>	(енглес. Azoxymethane/Dextran sodium sulphate)
<b>MDSCs</b>	(енглес. Myeloid Derived Suppressor Cells)
<b>BIRC-5</b>	(енглес. Baculoviral IAP repeat-containing protein 5)
<b>JNK</b>	(енглес. c-Jun N terminal kinase)
<b>TNF</b>	(енглес. Tumor Necrosis Factor)
<b>CSF-1</b>	(енглес. Colony-Stimulating Factor – 1)
<b>VEGF-A</b>	(енглес. <i>Vascular Endothelial Growth Factor A</i> )
<b>MMP2</b>	(енглес. Matrix Metalloproteinase 2)
<b>CTLs</b>	(енглес. Cytotoxic T Lymphocytes)
<b>PD-1</b>	(енглес. Programmed Death – 1)
<b>ROS</b>	(енглес. Reactive Oxygen Species)
<b>cPLA2</b>	(енглес. Cytosolic Phospholipase A2)
<b>Raf/Mek/Erk</b>	(енглес. Raf/mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase)
<b>CEA</b>	(енглес. Carcinoembryonic Antigen)
<b>OS</b>	(енглес. Overall Survival)
<b>APN</b>	(енглес. aminopeptidase N/CD13)

<b>bFGF</b>	(енглес. Basic Fibroblast Growth Factor).
<b>MCV</b>	(енглес. Mean Corpuscular Volume)
<b>CSS</b>	(енглес. Cancer Specific Survival)
<b>RFS</b>	(енглес. Relapse-Free Survival)
<b>mGPS</b>	(енглес. modified Glasgow prognostic score)
<b>MCH</b>	(енглес. Mean Corpuscular Hemoglobin)
<b>CFU-GMs</b>	(енглес. Granulocyte-Macrophage Colony-Forming Units)
<b>BFU-E</b>	(енглес. Burst-Forming Unit-Erythroid)
<b>HIF - 1<math>\alpha</math></b>	(енглес. Hypoxia Inducible Factor – 1 alpha)
<b>LDH5</b>	(енглес. Lactate Dehydrogenase 5)
<b>GLUT1</b>	(енглес. Glucose Transporter 1)
<b>BNIP3</b>	(енглес. bcl-2 19 kDa interacting protein 3)
<b>DFS</b>	(енглес. Disease Free Survival)
<b>mCRC</b>	(енглес. liver metastasis of colorectal cancer).
<b>G-CSF</b>	(енглес. Granulocyte Colony-Stimulating factor)
<b>GM-CSF</b>	(енглес. granulocyte macrophage colony-stimulating factor)
<b>TPO</b>	(енглес. Thrombopoietin)
<b>CFU-Mk</b>	(енглес. Megakaryocyte Colony Forming Units)
<b>FOBT</b>	(енглес. Fecal Occult Blood Test)
<b>UICC</b>	(енглес. The Union for International Cancer Control)
<b>AJCC</b>	(енглес. American Joint Committee on Cancer)
<b>CRP</b>	(енглес. C - Reactive Protein)
<b>AFP</b>	(енглес. Alpha phetoprotein)
<b>CEA</b>	(енглес. Carcinoembryonic antigen)
<b>CA 19-9</b>	(енглес. Carbohydrate antigen)
<b>CFU-GMs</b>	(енглес. Granulocyte-Macrophage colony-forming units)
<b>BFU-E</b>	(енглес. Burst-forming unit-erythroid)
<b>PCT</b>	(енглес. Plateletcrit)
<b>MPV</b>	(енглес. Mean Platelet Volume)
<b>PDW</b>	(енглес. Platelet Distribution Width)



## 8. ЛИТЕРАТУРА

1. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 2018; 68: 394-424.
2. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2019. *CA Cancer J Clin* 2019; 69: 7-34.
3. International Agency for Research on Cancer WHO. Cancer today. IARC Web site. <https://gco.iarc.fr/today/>. Accessed September 15, 2019.
4. Bray F. Transitions in human development and the global cancer burden. In: Stewart BW, Wild CP, eds. *World Cancer Report 2014*. Lyon: IARC Press; 2014: 42-55.
5. Fidler MM, Soerjomataram I, Bray F. A global view on cancer incidence and national levels of the Human Development Index. *Int J Cancer*. 2016; 139: 2436-2446.
6. World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research (WCRF/AICR). Continuous Update Project Report: Diet, Nutrition, Physical Activity and Colorectal Cancer 2017. Revised 2018. London: World Cancer Research Fund International; 2018. [aicr.org/continuous-update-project/reports/colorectal-cancer-2017-report.pdf](http://aicr.org/continuous-update-project/reports/colorectal-cancer-2017-report.pdf). Accessed: Sept. 21, 2019.
7. Abar L, Vieira AR, Aune D, Sobiecki JG, Vingeliene S, Polemiti E, et al. Stevens C, Greenwood DC, Chan DSM, Schlesinger S, Norat T. Height and body fatness and colorectal cancer risk: an update of the WCRF-AICR systematic review of published prospective studies. *Eur J Nutr*. 2018; 57(5): 1701-20.
8. Wong MC, Ding H, Wang J, Chan PS, Huang J. Prevalence and risk factors of colorectal cancer in Asia. *Intest Res*. 2019; 17(3): 317-29.
9. American Cancer Society. About colorectal cancer. American Cancer Society Web site. <https://www.cancer.org/content/dam/CRC/PDF/Public/8604.00.pdf>. Updated February 21, 2018. Accessed September 13, 2019.
10. Arnold M, Sierra MS, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality. *Gut* 2017; 66: 683-691.
11. Douaiher J, Ravipati A, Grams B, Chowdhury S, Alatisse O, Are C. Colorectal cancer-global burden, trends, and geographical variations. *J Surg Oncol*. 2017; 115(5): 619-30.
12. Moons L, Mariman A, Vermeir P, Colemont L, Clays E, Van Vlierberghe H, et al. Sociodemographic factors and strategies in colorectal cancer screening: a narrative review and practical recommendations. *Acta Clin Belg*. 2019; 4: 1-9.
13. Lei Zhang, Fei Cao, Guoyao Zhang, Lei Shi, Suhua Chen, Zhihui Zhang, et al. Trends in and Predictions of Colorectal Cancer Incidence and Mortality in China From 1990 to 2025. *Front Oncol*. 2019; 9: 98.

14. Bray F1, Jemal A, Grey N, Ferlay J, Forman D. Global cancer transitions according to the Human Development Index (2008-2030): a population-based study. *Lancet Oncol.* 2012; 13(8): 790-801.
15. Migliore L, Migheli F, Spisni R, Coppedè F. Genetics, cytogenetics, and epigenetics of colorectal cancer. *J Biomed Biotechnol* 2011; 2011: 792362.
16. Yurgelun MB, Kulke MH, Fuchs CS, Allen BA, Uno H, Hornick JL, et al. Cancer Susceptibility Gene Mutations in Individuals With Colorectal Cancer. *J Clin Oncol.* 2017; 35(10): 1086-95.
17. Pearlman R, Frankel WL, Swanson B, Zhao W, Yilmaz A, Miller K, et al. Prevalence and Spectrum of Germline Cancer Susceptibility Gene Mutations Among Patients With Early-Onset Colorectal Cancer. *JAMA Oncol.* 2017; 3(4): 464-71.
18. Talseth-Palmer BA. The genetic basis of colonic adenomatous polyposis syndromes. *Hered Cancer Clin Pract.* 2017; 15: 5.
19. Valle L, Vilar E, Tavtigian SV, Stoffel EM. Genetic predisposition to colorectal cancer: syndromes, genes, classification of genetic variants and implications for precision medicine. *J Pathol.* 2019; 247(5): 574-88.
20. Siegel RL, Fedewa SA, Anderson WF, Miller KD, Ma J, Rosenberg PS, et al. Cancer Incidence Patterns in the United States, 1974-2013. *J Natl Cancer Inst.* 2017; 109(8).
21. Tawadros PS, Paquette IM, Hanly AM, Mellgren AF, Rothenberger DA, Madoff RD. Adenocarcinoma of the rectum in patients under age 40 is increasing: impact of signet-ring cell histology. *Dis Colon Rectum.* 2015; 58(5): 474-8.
22. Nguyen LH, Liu PH, Zheng X, Keum N, Zong X, Li X, et al. Sedentary Behaviors, TV Viewing Time, and Risk of Young-Onset Colorectal Cancer. *JNCI Cancer Spectr.* 2018; 2(4): pky073.
23. Stidham RW, Higgins PDR. Colorectal Cancer in Inflammatory Bowel Disease. *Clin Colon Rectal Surg.* 2018; 31(3): 168-78.
24. Eaden JA, Abrams KR, Mayberry JF. The risk of colorectal cancer in ulcerative colitis: a meta-analysis. *Gut* 2001; 48(04): 526
25. Canavan C, Abrams KR and Mayberry J. Meta-analysis: colorectal and small bowel cancer risk in patients with Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther Aliment Pharmacol Ther.* 2006, 15; 23(8): 1097-104.
26. Domingo JL, Nadal M. Carcinogenicity of consumption of red meat and processed meat: A review of scientific news since the IARC decision. *Food Chem Toxicol.* 2017; 105: 256-61.
27. Stattin P, Palmqvist R, Söderberg S, Biessy C, Ardnor B, Hallmans G, et al. Plasma leptin and colorectal cancer risk: a prospective study in Northern Sweden. *Oncol Rep.* 2003; 10(6): 2015-21.
28. Doubeni CA, Laiyemo AO, Major JM, Schootman M, Lian M, Park Y, et al. Socioeconomic status and the risk of colorectal cancer: an analysis of more than a half million

adults in the National Institutes of Health-AARP Diet and Health Study. *Cancer* 2012; 118: 3636–44.

29. Doubeni CA, Major JM, Laiyemo AO, Schootman M, Zauber AG, Hollenbeck AR, et al. Contribution of behavioral risk factors and obesity to socioeconomic differences in colorectal cancer incidence. *J Natl Cancer Inst* 2012; 104: 1353–62.

30. Ordóñez-Mena JM, Walter V, Schöttker B, Jenab M, O'Doherty MG, Kee F, et al. Impact of prediagnostic smoking and smoking cessation on colorectal cancer prognosis: a meta-analysis of individual patient data from cohorts within the CHANCES consortium. *Ann Oncol*. 2018; 29(2): 472-83.

31. Walter V, Jansen L, Hoffmeister M, Brenner H. Smoking and survival of colorectal cancer patients: systematic review and meta-analysis. *Ann Oncol*. 2014; 25(8): 1517-25.

32. Din FV, Theodoratou E, Farrington SM, Tenesa A, Barnetson RA, Cetnarskyj R, et al. Effect of aspirin and NSAIDs on risk and survival from colorectal cancer. *Gut*. 2010; 59(12): 1670-9.

33. Mager LF, Wasmer MH, Rau TT, Krebs P. Cytokine-Induced Modulation of Colorectal Cancer. *Front Oncol*. 2016; 6: 96.

34. Voronov E, Apte RN. IL-1 in Colon Inflammation, Colon Carcinogenesis and Invasiveness of Colon Cancer. *Cancer Microenviron*. 2015; 8(3): 187-200.

35. Arend WP, Palmer G, Gabay C. IL-1, IL-18, and IL-33 families of cytokines. *Immunol Rev*. 2008; 223: 20-38.

36. Cui G, Yuan A, Sun Z, Zheng W, Pang Z. IL-1 $\beta$ /IL-6 network in the tumor microenvironment of human colorectal cancer. *Pathol Res Pract*. 2018; 214(7): 986-92.

37. Maihöfner C, Charalambous MP, Bhambra U, Lightfoot T, Geisslinger G, Gooderham NJ; et al. Colorectal Cancer Group. Expression of cyclooxygenase-2 parallels expression of interleukin-1beta, interleukin-6 and NF-kappaB in human colorectal cancer. *Carcinogenesis*. 2003; 24(4): 665-71.

38. Bankaitis KV, Fingleton B. Targeting IL4/IL4R for the treatment of epithelial cancer metastasis. *Clin Exp Metastasis*. 2015; 32(8): 847-56.

39. Di Stefano AB, Iovino F, Lombardo Y, Eterno V, Höger T, Dieli F, et al. Survivin is regulated by interleukin-4 in colon cancer stem cells. *J Cell Physiol*. 2010; 225(2): 555-61.

40. Abtahi S, Davani F, Mojtahedi Z, Hosseini SV, Bananzadeh A, Ghaderi A. Dual association of serum interleukin-10 levels with colorectal cancer. *J Cancer Res Ther*. 2017; 13(2): 252-6

41. Stanilov NS, Miteva L, Cirovski G, Stanilova SA. Increased transforming growth factor  $\beta$  and interleukin 10 transcripts in peripheral blood mononuclear cells of colorectal cancer patients. *Contemp Oncol*. 2016; 20(6): 458-62.

42. Berg DJ, Davidson N, Kühn R, Müller W, Menon S, Holland G, et al. Enterocolitis and colon cancer in interleukin-10-deficient mice are associated with aberrant cytokine production and CD4(+) TH1-like responses. *J Clin Invest.* 1996; 98(4): 1010-20.
43. Hyun YS, Han DS, Lee AR, Eun CS, Youn J, Kim HY. Role of IL-17A in the development of colitis-associated cancer. *Carcinogenesis.* 2012; 33:931–6.
44. Wang K, Kim MK, Di Caro G, Wong J, Shalpour S, Wan J, et al. Interleukin-17 receptor a signaling in transformed enterocytes promotes early colorectal tumorigenesis. *Immunity.* 2014; 41:1052–63.
45. Tong Z, Yang XO, Yan H, Liu W, Niu X, Shi Y, et al. A protective role by interleukin-17F in colon tumorigenesis. *PLoS One.* 2012; 7(4): e34959.
46. Cui G, Yuan A, Pang Z, Zheng W, Li Z, Goll R. Contribution of IL-33 to the Pathogenesis of Colorectal Cancer. *Front Oncol.* 2018; 8: 561.
47. Maywald RL, Doerner SK, Pastorelli L, De Salvo C, Benton SM, Dawson EP, et al. IL-33 activates tumor stroma to promote intestinal polyposis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015; 112(19): E2487-96.
48. Fang M, Li Y, Huang K, Qi S, Zhang J, Zgodzinski W, et al. IL33 Promotes Colon Cancer Cell Stemness via JNK Activation and Macrophage Recruitment. *Cancer Res.* 2017; 77(10): 2735-45.
49. Li Y, Shi J, Qi S, Zhang J, Peng D, Chen Z, et al. IL-33 facilitates proliferation of colorectal cancer dependent on COX2/PGE2. *J Exp Clin Cancer Res.* 2018; 37(1): 196.
50. Choi YS, Park JA, Kim J, Rho SS, Park H, Kim YM, et al. Nuclear IL-33 is a transcriptional regulator of NF- $\kappa$ B p65 and induces endothelial cell activation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012; 421(2): 305-11.
51. Zhang Y, Davis C, Shah S, Hughes D, Ryan JC, Altomare D, et al. IL-33 promotes growth and liver metastasis of colorectal cancer in mice by remodeling the tumor microenvironment and inducing angiogenesis. *Mol Carcinogenesis.* 2017; 56: 272–87.
52. Akimoto M, Maruyama R, Takamaru H, Ochiya T, Takenaga K. Soluble IL-33 receptor sST2 inhibits colorectal cancer malignant growth by IL-33 in Cancers modifying the tumour microenvironment. *Nat Commun.* 2016; 7: 13589.
53. Lu J, Kang J, Zhang C, Zhang X. The role of IL-33/ST2L signals in the immune cells. *Immunol Lett.* 2015; 164(1): 11-7.
54. Popivanova BK, Kitamura K, Wu Y, Kondo T, Kagaya T, Kaneko S, et al. Blocking TNF-alpha in mice reduces colorectal carcinogenesis associated with chronic colitis. *J Clin Invest.* 2008; 118(2): 560-70.
55. Zins K, Abraham D, Sioud M, Aharinejad S. Colon cancer cell-derived tumor necrosis factor-alpha mediates the tumor growth-promoting response in macrophages by up-regulating the colony-stimulating factor-1 pathway. *Cancer Res.* 2007; 67(3): 1038-45.

56. Buhrmann C, Yazdi M, Popper B, Shayan P, Goel A, Aggarwal BB, et al. Evidence that TNF- $\beta$  induces proliferation in colorectal cancer cells and resveratrol can down-modulate it. *Exp Biol Med.* 2019; 244(1): 1-12.
57. Xu M, Mizoguchi I, Morishima N, Chiba Y, Mizuguchi J, Yoshimoto T. Regulation of antitumor immune responses by the IL-12 family cytokines, IL-12, IL-23, and IL-27. *Clin Dev Immunol.* 2010; 2010: 832454.
58. Wang L, Wang Y, Song Z, Chu J, Qu X. Deficiency of interferon-gamma or its receptor promotes colorectal cancer development. *J Interferon Cytokine Res.* 2015; 35(4): 273-80.
59. Katlinski KV, Gui J, Katlinskaya YV, Ortiz A, Chakraborty R, Bhattacharya S, et al. Inactivation of Interferon Receptor Promotes the Establishment of Immune Privileged Tumor Microenvironment. *Cancer Cell.* 2017; 31(2): 194-207.
60. Wang QS, Shen SQ, Sun HW, Xing ZX, Yang HL. Interferon-gamma induces autophagy-associated apoptosis through induction of cPLA2-dependent mitochondrial ROS generation in colorectal cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2018; 498(4): 1058-65.
61. Liu FT, Rabinovich GA. Galectins as modulators of tumour progression. *Nat Rev Cancer.* 2005; 5(1): 29-41.
62. Barrow H, Rhodes JM, Yu LG. The role of galectins in colorectal cancer progression. *Int J Cancer.* 2011; 129(1): 1-8.
63. Zhu XL, Liang L, Ding YQ. Galectin-1 expression in human colorectal carcinoma and its clinical significance. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao.* 2007; 27(9): 1331-4.
64. Wu KL, Chen HH, Pen CT, Yeh WL, Huang EY, Hsiao CC, et al. Circulating Galectin-1 and 90K/Mac-2BP Correlated with the Tumor Stages of Patients with Colorectal Cancer. *Biomed Res Int.* 2015; 2015: 306964.
65. Ito K, Ralph SJ. Inhibiting galectin-1 reduces murine lung metastasis with increased CD4(+) and CD8(+) T cells and reduced cancer cell adherence. *Clin. Exp. Metastasis* 2012; 29: 561-72.
66. Kovacs-Solyom F, Blasko A, Fajka-Boja R, Katona RL, Vegh L, Novak J, et al. Mechanism of tumor cell-induced T-cell apoptosis mediated by galectin-1. *Immunol Lett* 2010; 127: 108-18.
67. Satelli A, Rao US. Galectin-1 is silenced by promoter hypermethylation and its re-expression induces apoptosis in human colorectal cancer cells. *Cancer Lett.* 2011; 301(1): 38-46.
68. Thijssen VL, Barkan B, Shoji H, Aries IM, Mathieu V, Deltour L, et al. Tumor cells secrete galectin-1 to enhance endothelial cell activity. *Cancer Res.* 2010; 70(15): 6216-24.
69. Wang C, Zhou X, Ma L, Zhuang Y, Wei Y, Zhang L, et al. Galectin-3 may serve as a marker for poor prognosis in colorectal cancer: A meta-analysis. *Pathol Res Pract.* 2019; 215(10): 152612.

70. Jovanovic M, Gajovic N, Zdravkovic N, Jovanovic M, Jurisevic M, Vojvodic D, et al. Fecal Galectin-3: A New Promising Biomarker for Severity and Progression of Colorectal Carcinoma. *Mediators Inflamm.* 2018; 2018: 8031328.
71. Yang E, Shim JS, Woo HJ, Kim KW, Kwon HJ. Aminopeptidase N/CD13 induces angiogenesis through interaction with a pro-angiogenic protein, galectin-3. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007; 363(2): 336-41.
72. Markowska AI, Liu FT, Panjwani N. Galectin-3 is an important mediator of VEGF- and bFGF-mediated angiogenic response. *J Exp Med.* 2010; 207(9): 1981-93.
73. Yu LG. Circulating galectin-3 in the bloodstream: An emerging promoter of cancer metastasis. *World J Gastrointest Oncol.* 2010; 2(4): 177-80.
74. American Cancer Society. *Colorectal Cancer Facts and Figures 2017-2019.* Atlanta: American Cancer Society; 2017. p. 2-3
75. WHO. Haemoglobin concentrations for the diagnosis of anaemia and assessment of severity. Vitamin and Mineral Nutrition Information System. Geneva, World Health Organization, 2011 (WHO/NMH/NHD/MNM/11.1). <http://www.who.int/vmnis/indicators/haemoglobin.pdf>. Accessed: September 20, 2019.
76. Muñoz M, Gómez-Ramírez S, Martín-Montañez E, Auerbach M. Perioperative anemia management in colorectal cancer patients: a pragmatic approach. *World J Gastroenterol.* 2014; 20(8): 1972-85.
77. Edna TH, Karlsen V, Jullumstrø E, Lydersen S. Prevalence of anaemia at diagnosis of colorectal cancer: assessment of associated risk factors. *Hepatogastroenterology.* 2012; 59(115): 713-6.
78. Ho CH, Yu YB, Wu PH. The prevalence of iron deficiency anemia and its clinical implications in patients with colorectal carcinoma. *J Chin Med Assoc.* 2008; 71(3): 119-22.
79. Moreno Chulilla JA, Romero Colás MS, Gutiérrez Martín M. Classification of anemia for gastroenterologists. *World J Gastroenterol.* 2009; 15(37): 4627-37.
80. Tokunaga R, Nakagawa S, Miyamoto Y, Ohuchi M, Izumi D, Kosumi K, et al. The impact of preoperative anaemia and anaemic subtype on patient outcome in colorectal cancer. *Colorectal Dis.* 2019; 21(1): 100-9.
81. McSorley ST, Johnstone M, Steele CW, Roxburgh CSD, Horgan PG, McMillan DC, et al. Normocytic anaemia is associated with systemic inflammation and poorer survival in patients with colorectal cancer treated with curative intent. *Int J Colorectal Dis.* 2019; 34(3): 401-8.
82. Väyrynen JP, Tuomisto A, Väyrynen SA, Klintrup K, Karhu T, Mäkelä J, et al. Preoperative anemia in colorectal cancer: relationships with tumor characteristics, systemic inflammation, and survival. *Sci Rep.* 2018 Jan 18; 8(1): 1126.
83. Weiss G, Goodnough LT. Anemia of chronic disease. *N Engl J Med.* 2005; 352(10): 1011-23.

84. Koukourakis MI, Giatromanolaki A, Polychronidis A, Simopoulos C, Gatter KC, Harris AL, et al. Endogenous markers of hypoxia/anaerobic metabolism and anemia in primary colorectal cancer. *Cancer Sci.* 2006; 97(7): 582-8.
85. Stankovic MS, Turuntas V, De Luka SR, Jankovic S, Stefanovic S, Puskas N, et al. Effects of Il-33/St2 pathway on alteration of iron and hematological parameters in acute inflammation. *Exp Mol Pathol.* 2015; 99(3): 687-92.
86. Kenswil KJG, Jaramillo AC, Ping Z, Chen S, Hoogenboezem RM, Mylona MA, et al. Characterization of Endothelial Cells Associated with Hematopoietic Niche Formation in Humans Identifies IL-33 As an Anabolic Factor. *Cell Rep.* 2018; 22(3): 666-678.
87. Talabot-Ayer D, Martin P, Vesin C, Seemayer CA, Vigne S, Gabay C, et al. Severe neutrophil-dominated inflammation and enhanced myelopoiesis in IL-33-overexpressing CMV/IL33 mice. *J Immunol.* 2015; 194(2): 750-60.
88. Virág Vas, Roberta Fajka-Boja, Gabriela Ion, Valéria Dudics, Éva Monostori, Ferenc Uhera. Biphasic Effect of Recombinant Galectin-1 on the Growth and Death of Early Hematopoietic Cells. *Stem Cells.* 2005; 23(2): 279-87.
89. Schafer AI. Thrombocytosis. *N Engl J Med.* 2004, 18; 350(12): 1211-9.
90. Lin RJ, Afshar-Khargan V, Schafer AI. Paraneoplastic thrombocytosis: the secrets of tumor self-promotion. *Blood.* 2014; 124(2): 184–187.
91. Wojtukiewicz MZ, Sierko E, Hempel D, Tucker SC, Honn KV. Platelets and cancer angiogenesis nexus. *Cancer Metastasis Rev.* 2017; 36(2): 249-262.
92. Wang YH, Deng SJ, Yang YD, Yao N, Zhao JM, Min GT, et al. The pretreatment thrombocytosis may predict prognosis of patients with colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *Biomark Med.* 2017; 11(2): 195-210.
93. Long Y, Wang T, Gao Q, Zhou C. Prognostic significance of pretreatment elevated platelet count in patients with colorectal cancer: a meta-analysis. *Oncotarget.* 2016; 7(49): 81849-61.
94. Gu D, Szallasi A. Thrombocytosis Portends Adverse Prognosis in Colorectal Cancer: A Meta-Analysis of 5,619 Patients in 16 Individual Studies. *Anticancer Res.* 2017; 37(9): 4717-26.
95. Sasaki K, Kawai K, Tsuno NH, Sunami E, Kitayama J. Impact of preoperative thrombocytosis on the survival of patients with primary colorectal cancer. *World J Surg.* 2012; 36(1): 192-200.
96. Jóna V, Krzystanek M, Vass T, Lang T, Juhász V, Szilágyi K, et al. Thrombocytosis of Liver Metastasis from Colorectal Cancer as Predictive Factor. *Pathol Oncol Res.* 2015; 21(4): 991-7.
97. Buergy D, Wenz F, Groden C, Brockmann MA. Tumor-platelet interaction in solid tumors. *Int J Cancer.* 2012; 130(12): 2747-60.

98. Yang M, Li K, Chui CM, Yuen PM, Chan PK, Chuen CK, et al. Expression of interleukin (IL) 1 type I and type II receptors in megakaryocytic cells and enhancing effects of IL-1beta on megakaryocytopoiesis and NF-E2 expression. *Br J Haematol.* 2000; 111(1): 371-80
99. Monroy RL, Davis TA, Donahue RE, MacVittie TJ. In vivo stimulation of platelet production in a primate model using IL-1 and IL-3. *Exp Hematol.* 1991; 19(7): 629-35.
100. Kimura H, Ishibashi T, Shikama Y, Okano A, Akiyama Y, Uchida T, et al. Interleukin-1 beta (IL-1 beta) induces thrombocytosis in mice: possible implication of IL-6. *Blood.* 1990; 76(12): 2493-500.
101. DeSantis CE, Lin CC, Mariotto AB, Siegel RL, Stein KD, Kramer JL, et al. Cancer treatment and survivorship statistics, 2014. *CA Cancer J Clin.* 2014; 64(4): 252-71.
102. Allemani C, Weir HK, Carreira H, Harewood R, Spika D, Wang XS, et al. Global surveillance of cancer survival 1995-2009: analysis of individual data for 25,676,887 patients from 279 population-based registries in 67 countries (CONCORD-2). *Lancet.* 2015; 385(9972): 977-1010.
103. Lee YS, Suh KW, Oh SY. Preoperative thrombocytosis predicts prognosis in stage II colorectal cancer patients. *Ann Surg Treat Res.* 2016; 90(6): 322-7.
104. Heidenhain M. Noch einmal uber die darstellung der centralkorper durch eisenhamatoxylin nebst einigen allgemeinen bemerkungen uber die hamatoxylinfarben. *Z Wiss Mikrosk.* 1896; 13: 186.
105. Gurr AB. Biological staining methods. Hopkin and Williams Chadowell Heath 1976.
106. Edge SB, Compton CC. The American Joint Committee on Cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM. *Ann Surg Oncol.* 2010; 17(6): 1471-4.
107. N.D. Zdravkovic, I.P. Jovanovic, G.D. Radosavljevic, A.N. Arsenijevic, N.D. Zdravkovic, S.Lj. Mitrovic, N.N. Arsenijevic. Potential Dual Immunomodulatory Role of VEGF in Ulcerative Colitis and Colorectal Carcinoma. *Int J Med Sci* 2014; 11(9): 936-947.
108. Zdravkovic N, Pavlovic M, Radosavljevic G, Jovanovic M, Arsenijevic A, Zdravkovic N, et al. Serum levels of immunosuppressive cytokines and tumor markers in metastatic colorectal carcinoma *JBUON* 2017; 22(5): 1-8.
109. Madeddu C, Gramignano G, Astara G, Demontis R, Sanna E, Atzeni V, et al. Pathogenesis and Treatment Options of Cancer Related Anemia: Perspective for a Targeted Mechanism-Based Approach. *Front Physiol.* 2018; 9: 1294
110. Lewis AM, Varghese S, Xu H, Alexander HR. Interleukin-1 and cancer progression: the emerging role of interleukin-1 receptor antagonist as a novel therapeutic agent in cancer treatment. *J Transl Med.* 2006; 4: 48.
111. Voulgari PV, Kolios G, Papadopoulos GK, Katsaraki A, Seferiadis K, Drosos AA. Role of cytokines in the pathogenesis of anemia of chronic disease in rheumatoid arthritis. *Clin Immunol.* 1999; 92(2): 153-60.



112. Petrovic S, Radosavljevic GD, Pantic J, Jovanovic I, Jankovic N, Arsenijevic N. Circulating and tissue galectin-1 and galectin-3 in colorectal carcinoma: association with clinicopathological parameters, serum CEA, IL-17 and IL23. *J BUON*. 2016; 21(4): 941-949.
113. Wang W, Zhou Z, Xiang L, Lv M, Ni T, Deng J, et al. CHIP-mediated ubiquitination of Galectin-1 predicts colorectal cancer prognosis. *Int J Biol Sci*. 2020; 16(4): 719-29.
114. Jovanovic M, Gajovic N, Zdravkovic N, Jovanovic M, Jurisevic M, Vojvodic D, et al. Fecal galectin-1 as a potential marker for colorectal cancer and disease severity. *Vojnosanit Pregl* 2019; 76(10): 1037-44.
115. Dinarello CA. Overview of the IL-1 family in innate inflammation and acquired immunity. *Immunol Rev*. 2018; 281(1): 8-27.
116. Lech G, Słotwiński R, Słodkowski M, Krasnodębski IW. Colorectal cancer tumour markers and biomarkers: Recent therapeutic advances. *World J Gastroenterol*. 2016; 22(5): 1745-55.
117. Qiu MZ, Yuan ZY, Luo HY, Ruan DY, Wang ZQ, Wang FH, et al. Impact of pretreatment hematologic profile on survival of colorectal cancer patients. *Tumour Biol*. 2010; 31(4): 255-60.
118. Litmanovich A, Khazim K, Cohen I. The Role of Interleukin-1 in the Pathogenesis of Cancer and its Potential as a Therapeutic Target in Clinical Practice *Oncol Ther* 2018; 6: 109
119. Mager LF, Riether C, Schurch CM, Banz Y, Wasmer MH, Stuber R, et al. IL-33 signaling contributes to the pathogenesis of myeloproliferative neoplasms. *J Clin Invest*. 2015; 125(7): 2579-91.
120. Rao XD, Zhang H, Xu ZS, Cheng H, Shen W, Wang XP. Poor prognostic role of the pretreatment platelet counts in colorectal cancer: A meta-analysis. *Medicine (Baltimore)*. 2018; 97(23): e10831.
121. Qian W, Ge XX, Wu J, Gong FR, Wu MY, Xu MD, et al. Prognostic evaluation of resectable colorectal cancer using platelet-associated indicators. *Oncol Lett*. 2019; 18(1): 571-580.
122. Väyrynen JP, Kantola T, Väyrynen SA, Klintrup K, Bloigu R, Karhu T, et al. The relationships between serum cytokine levels and tumor infiltrating immune cells and their clinical significance in colorectal cancer. *Int J Cancer*. 2016; 139(1): 112-21.
123. Vardy JL, Dhillon HM, Pond GR, Renton C, Clarke SJ, Tannock IF. Prognostic indices of inflammatory markers, cognitive function and fatigue for survival in patients with localised colorectal cancer. *ESMO Open*. 2018; 3(2): e000302.

## БИОГРАФСКИ ПОДАЦИ АУТОРА

Др Миодраг Јочић рођен је 1974. године у Нишу. Основну и средњу школу завршио је одличним успехом. На Медицинском факултету у Нишу дипломирао је просечном оценом 9,26 (девет и 26/100) у току студија и оценом 10 (десет) на дипломском испиту. Школу резервних официра СнСл завршио је просечном оценом 9,52 (девет и 52/100). Од 2003. до 2005. био је управник Гарнизонске амбуланте и Начелник СнСл у Куршумлији, где је оцењен службеном оценом „нарочито се истиче“. Дана 16.12.2008. године положио је специјалистички испит из трансфузиологије оценом 5,00. Ради као лекар специјалиста и начелник одељења у Институту за трансфузиологију и хемобиологију ВМА. Више пута награђиван за свој рад, добитник одликовања 2015. године. Од 2016. у чину потпуковника Војске Србије. Два пута учествовао у мировним операцијама ВС на позицији лекара Рола 1 и главног официра санитетске службе команде ЕУТМ мисије у Сомалији. Оба пута одликован и оцењен највишим оценама. До сада је објавио је укупно 36 научних публикација, од чега се четири рада се налазе на SCI листи. На докторским академским студијама Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу је положио Усмени докторски испит оценом 10 (десет). Члан је Тима за трансплантацију солидних органа на ВМА и до сада је учествовао у 23 трансплантације јетре. Носилац је увођења нове технологије под називом: „Употреба аутологних серум капи у лечењу офталмолошких болесника на ВМА“. Више од годину дана је асистент на предмету Трансфузиологија на Медицинском факултету ВМА Универзитета одбране. Учествовао је на више конгреса у земљи и иностранству. Активно чита, пише и говори енглески језик на нивоу трећег степена. Члан је Српског лекарског друштва, удружења АРТ и Удружења трансфузиолога Србије. Ожењен и отац двоје деце.

1. **Jocić M**, Gajović N, Jurišević M, Jovanović M, Zdravković N, Arsenijević N, Vuković-Dejanović V, Marić V, Milev B, Jovanović M. Colorectal carcinoma: Evaluation of systemic values of IL-1 and IL-33 in patients with and without thrombocytosis. *Vojnosanit Pregl*, 2019 OnLine-First (00):110-110. doi: <https://doi.org/10.2298/VSP190910110J> (M23)
2. Radenković G, Petrović V, Nedin-Ranković G, Denčić T, Živković V, **Jocić M**. CD11c immunopositive cells in the human fetal vermiform appendix. *Vojnosanitetski pregled*, 2019 OnLine-First (00):148-148 <https://doi.org/10.2298/VSP191126148R> (M23)
3. Stojanović V, Jovanović I, Ugrenović S, Vasović Lj, Živković V, **Jocić M**, Kundalić B, Pavlović M. Morphometric Analysis of Nonsclerosed Glomeruli Size and Connective Tissue Content during the Aging Process. *Scientific World Journal* 2012, art. no. 845046. doi: 10.1100/2012/845046 ISSN: 1537-744X. (M21)
4. **Jocić M**, Trkuljić M, Jovičić D, Borovčanin N, Balint B. Mirasol PRT System inactivation efficacy evaluated in platelet concentrates by bacteria–contamination model. *Vojnosanit Pregl* 2011; 68(12): 1041–6. (M23)

**Образац 1**

**ИЗЈАВА АУТОРА О ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Ја, Миодраг Јоцић, изјављујем да докторска дисертација под насловом:

„Колоректални карцином: утицај системских концентрација цитокина и патохистолошких карактеристика на анемију и тромбоцитозу“

---

која је одбрањена на Факултету медицинских наука,

Универзитета у Крагујевцу представља *оригинално ауторско дело* настало као резултат *сопственог истраживачког рада*.

*Овом Изјавом такође потврђујем:*

да сам *једини аутор* наведене докторске дисертације,

да у наведеној докторској дисертацији *нисам извршио/ла повреду* ауторског нити другог права интелектуалне својине других лица,

да умножени примерак докторске дисертације у штампаној и електронској форми у чијем се прилогу налази ова Изјава садржи докторску дисертацију истоветну одбрањеној докторској дисертацији.

У Крагујевцу, 12.10.2020.године,

  
потпис аутора

## Образац 2

### ИЗЈАВА АУТОРА О ИСКОРИШЋАВАЊУ ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, Миодраг Јоцић \_\_\_\_\_,

дозвољавам

не дозвољавам

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

„Колоректални карцином: утицај системских концентрација цитокина и патохистолошких карактеристика на анемију и тромбозу“ \_\_\_\_\_

која је одбрањена на Факултету медицинских наука \_\_\_\_\_

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

Овом Изјавом такође

дозвољавам

не дозвољавам<sup>1</sup>

---

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

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

- 1) Ауторство
- 2) Ауторство - делити под истим условима
- 3) Ауторство - без прерада
- 4) Ауторство - некомерцијално
- 5) Ауторство - некомерцијално - делити под истим условима
- 6) Ауторство - некомерцијално - без прерада<sup>2</sup>

У Крагујевцу, 12.10.2020. године,



потпис аутора

---

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