

## NASTAVNO-NAUČNOM VEĆU FARMACEUTSKOG FAKULTETA

### UNIVERZITETA U BEOGRADU

Na sednici Nastavno-naučnog Veća Farmaceutskog fakulteta, održanoj 09.09.2021. godine, imenovana je Komisija za ocenu završene doktorske disertacije pod nazivom " Ispitivanje prediktivnog i dijagnostičkog značaja pojedinačnih i kombinovanih biomarkera lipidnog statusa i inflamacije kod pacijenata sa kolorektalnim karcinomom" kandidata magistra farmacije-medicinskog biohemičara Marije Mihajlović, asistenta na Katedri za medicinsku biohemiju Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, u sastavu:

1. Dr sc. Vesna Spasojević-Kalimanovska, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu-Farmaceutski fakultet
2. Dr sc. Aleksandra Stefanović, vanredni profesor, Univerzitet u Beogradu-Farmaceutski fakultet
3. Dr sc. Ana Ninić, vanredni profesor, Univerzitet u Beogradu-Farmaceutski fakultet
4. Dr sc. Milan Jovanović, docent, Univerzitet odbrane u Beogradu-Medicinski fakultet Vojnomedicinske akademije

Mentor: Dr sc. Aleksandra Zeljković, vanredni profesor, Univerzitet u Beogradu-Farmaceutski fakultet

Članovi Komisije su pregledali priloženu disertaciju i podnose Nastavno-naučnom Veću Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu sledeći:

### IZVEŠTAJ

#### A. Sadržaj doktorske disertacije

Doktorica disertacija je napisana na 132 strane, sadrži 28 tabela, 35 slika i 269 literaturnih navoda. Sadržaj je podeljen po poglavljima: Uvod, Ciljevi, Materijali i metode, Rezultati, Diskusija, Zaključci i Literatura.

**Cilj** ove doktorske disertacije je bilo ispitivanje dijagnostičkog i prediktivnog potencijala pojedinačnih biomarkera, ali i njihovih kombinacija u okviru multimarkerskih panela za predviđanje rizika za nastanak kolorektalnog karcinoma (*colorectal cancer*, CRC). Naime, smatra se da bi multimarkerski pristup koji podrazumeva određivanje plazmatskih koncentracija proteina, merenje nivoa ekspresije gena i genotipizaciju ispitanika za polimorfizme pojedinačnih nukleotida (*single nucleotide polymorphism*, SNP) od značaja mogao da predstavlja pouzdan alat laboratorijske dijagnostike. S obzirom da je poznato da je CRC bolest multifaktorske etiologije, u ovoj doktorskoj disertaciji su analizom obuhvaćeni parametri koji ukazuju na poremećaje energetskog metabolizma, narušenu redoks homeostazu, ali i na deregulaciju imunog, odnosno inflamatornog odgovora pojedinca.

Rezultati istraživanja su dopunjeni *in silico* analizom *online* dostupnih transkriptomskih baza podataka, dok su gensko-genske interakcije, kao i interakcije gena i faktora spoljašnje sredine ispitivane *multidimensionality reduction* (MDR) softverom.

U ove svrhe određivane su plazmatske koncentracije insulinu sličnog faktora rasta 1 (*insulin like growth factor 1*, IGF1), kao i koncentracije lipidnih markera u svojstvu indikatora metaboličkih promena, dok su koncentracije rezistina i E-kadherina reflektovale poremećaje inflamatorne ose. Lipoproteinske čestice visoke gustine (*high density lipoprotein*, HDL), kao značajni pokazatelji narušene metaboličke ravnoteže u CRC su bile bliže određene parametrima specifičnog lipidnog profila, odnosno merenjem aktivnosti enzima lecitin-holesterol aciltransferaze (LCAT), holesterol-estar transfernog proteina (CETP) i paraoksonaze 1 (PON-1) kao pokazatelja remodelovanja i funkcionalnosti čestica. Prooksidativni-antioksidativni balans (PAB) je izmeren u svojstvu činilaca redoks homeostaze. Genetski markeri su uključivali određivanje nivoa iRNK gena uključenih u kontrolu inflamatornog procesa (rezistina i njegovog receptora, proteina udruženog sa adenilat ciklazom 1, CAP-1), imunog odgovora (faktora nekroze tumora  $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ) i metaboličke homeostaze (adiponektinskih receptora, Adipor1 i Adipor2) u mononuklearnim ćelijama periferne krvi (*peripheral blood mononuclear cells*, PBMC). Genotipizacija ispitanika je izvedena za sledeće polimorfizme od interesa: *IGF1* (rs2946834), *ADIPOQ* (rs266729), *ADIPOR1* (rs7539542), *ADIPOR1* (rs1342387), *TNF- $\alpha$*  (rs1800629), *RETN* (rs1862513).

U poglavlju **Materijali i metode** su opisani postupci selekcije pacijenata sa CRC i zdravih ispitanika za učešće u istraživanju. Navedena je detaljna dijagnostička procedura kojoj su bili podvrgnuti pacijenti sa CRC, kao i način regrutacije zdravih ispitanika na redovnim sistematskim pregledima. Definitivna dijagnoza CRC je izvršena na osnovu patohistološkog nalaza resektovanog tkiva na Vojnomedicinskoj akademiji u Beogradu. Pacijenti sa CRC su pored patohistološkog nalaza, selektovani i po dodatnom kriterijumu da nisu imali prethodnu istoriju maligniteta, da nisu koristili neoadjuvantnu terapiju, niti terapiju koja bi mogla da utiče na lipidni status. Na osnovu gradusa i stadijuma bolesti formirane su podgrupe ispitanika. Za podelu prema stadijumu je korišćen Astler-Coller klasifikacioni sistem. Stratifikacija ispitanika je vršena i u odnosu na tri gradusa tumora. Zdravi ispitanici su bili podvrgnuti rutinskom kliničkom pregledu u Opštoj bolnici Medigroup u Beogradu. Kontrolnu grupu (KG) su činile osobe bez prethodne istorije malignih ili nemalignih bolesti, ali i akutnih stanja. Standardizovanim upitnikom se došlo do informacija o uzrastu, visini, težini, ličnoj i porodičnoj anamnezi, fizičkoj aktivnosti, konzumaciji alkohola i statusu pušenja. Na osnovu podataka o visini i težini je izračunat indeks telesne mase (ITM). Grupa pacijenata sa CRC je inicijalno obuhvatala 126 ispitanika, dok je KG činila 101 zdrava osoba. Shodno uspešnosti analiza i dostupnosti svih podataka, pojedinačne analize u studiji izvođene su na uzorcima različite veličine. Istraživanje je sprovedeno u skladu sa smernicama Helsinške deklaracije uz odobrenje lokalnih etičkih komiteta i to: Vojnomedicinske akademije, Opšte bolnice Medigroup i Farmaceutskog fakulteta u Beogradu.

Ispitanicima su rutinskim komercijalnim enzimskim i kolorimetrijskim metodama određivani osnovni biohemijski parametri (koncentracija ukupnog holesterola-UH, holesterola sadržanog u

lipoproteinima niske gustine (low density lipoprotein, LDL-h), HDL-h, koncentracija triglicerida (TG), te koncentracije proteina, glukoze i albumina) na biohemijskom analizatoru ILab 300+. Procena specifičnog lipidnog profila, odnosno određivanje aktivnosti enzima LCAT i CETP je podrazumevalo merenje promena koncentracija ukupnog i slobodnog holesterola u plazmi i izolovanoj HDL frakciji plazme u jedinici vremena. Aktivnost enzima je određivana uz dvočasovnu inkubaciju uzoraka na temperaturi od 37<sup>0</sup>C. Paraoksonazna aktivnost PON-1 je izmerena uz korišćenje paraoksiona kao supstrata, dok je arilesterazna aktivnost PON-1 procenjivana kinetički, metodom sa fenilacetatom. PAB je određivan metodom sa tetrametilbenzidin-katjonom. Masena koncentracija CETP, IGF1, E-kadherina i rezistina je određivana komercijalnim ELISA testovima. Nivoi iRNK u PBMC su izmereni metodom relativne standardne krive, odnosno kvantitativnom lančanom reakcijom polimerizacije (qPCR). Genotipizacija ispitanika za polimorfizme od interesa je izvršena metodom diskriminacije alela na 7500 Real-time PCR platformi. Standardni statistički parametarski testovi su korišćeni za analizu varijabli koje su inicijalno ili nakon logaritamske transformacije pratile normalnu raspodelu, a neparametarski za promenljive sa asimetričnom raspodelom. Multivarijantna binarna logistička regresiona analiza je korišćena za ispitivanje prediktivnog potencijala multimarkerskih modela, dok je dijagnostička tačnost procenjivana upotrebom *receiver operating characteristic* (ROC) krive. Za obradu i analizu podataka su korišćeni sledeći statistički softveri: IBM®SPSS® model 22.0 (IBM, USA), SNPStat (© 2006 Institut Català d'Oncologia), GraphPad Prism 7 program (GraphPad Software, La Jolla California USA), dok je *in silico* istraživanje podrazumevalo obradu transkriptomskih podataka primenom Gene Set Enrichment Analysis softvera (GSEA, Broad Institute, UC San Diego). GSE44076 baza podataka je uključivala 50 zdravih kontrolnih uzoraka i 98 uparenih uzoraka tkiva tumora kolona stadijuma II i susedne mukoze, dok su podaci iz GSE47756 skupa dobijeni na osnovu 38 uzoraka monocita periferne krvi (peripheral blood monocytes, *PBM*) zdravih dobrovoljaca i 55 pacijenata sa CRC. Chi kvadrat ( $\chi^2$ ) test je korišćen za analizu kategoričkih podataka, kao i za proveru odstupanja distribucije genotipova od Hardy-Weinbergove ravnoteže. Za procenu i vizuelizaciju gensko-genskih interakcija, te interakcija gena i faktora spoljašnje sredine korišćen je MDR softver (MDR software, version: 3.0.2, build 2; MDRPT module, version: 1.0.2, beta 2).

## Rezultati

U prvom delu poglavlja **Rezultati** predstavljene su antropometrijske karakteristike i osnovni biohemijski profil ispitanika sa CRC, kao i zdravih dobrovoljaca. Potom je ispitivana razlika u aktivnostima enzima LCAT, CETP, kao i razlika u paraoksonaznoj, odnosno arilesteraznoj aktivnosti PON-1 i vrednostima PAB. Zatim je usledila procena prediktivnog i dijagnostičkog značaja parametara, i to aktivnosti enzima CETP, PON-1, masene koncentracije CETP i vrednosti PAB, uz formiranje multimarkerskih modela.

U sledećem odeljku **Rezultata** je prikazana razlika u koncentracijama IGF1 i E-kadherina između pacijenata i KG. Ispitivane su i razlike u koncentracijama IGF-1 i E-kadherina u odnosu na različite karakteristike ispitanika sa CRC, najpre u odnosu na pol, ITM, prisustvo dijabetesa, lokalizaciju tumora, gradus i stadijum tumora. Sledstveno je ispitivan prediktivni, dijagnostički

potencijal IGF1 i E-kadherina, kao i dijagnostička tačnost spomenutih biomarkera. Dalje je analizirana povezanost SNP *IGF1* (rs2946834) i rizika za razvoj CRC, na osnovu procene distribucije genotipova između pacijenata i zdravih ispitanika, te preko ispitivanja razlika u koncentracijama IGF1, E-kadherina, parametara lipidnog statusa i vrednostima ITM u odnosu na prisustvo rizičnog alela *IGF1* (rs2946834) polimorfizma (GG naspram GA+AA) zasebno kod pacijenata sa CRC i u KG.

Naredni odeljak **Rezultata** je bio posvećen detaljnoj analizi markera adiponektinskog statusa, odnosno njihove povezanosti sa metaboličkom i imunološkom homeostazom. U ovom delu istraživanja su prvobitno ispitivane razlike u nivoima genske ekspresije *Adipor1*, *Adipor2* i *TNF- $\alpha$*  u PBMC. Povezanost SNP *ADIPOQ* (rs266729), *ADIPOR1* (rs7539542), *TNF- $\alpha$*  (rs1800629) i rizika za razvoj CRC je ispitana tako što je najpre procenjivana razlika u distribuciji genotipova, a potom i razlike u nivoima genske ekspresije *TNF- $\alpha$* , *Adipor1* i *Adipor2*, kao i koncentracijama lipidnih parametara i vrednostima ITM u odnosu na određeni genotip rs266729 polimorfizma (CC naspram CG+GG, zasebno u CRC i u KG), te rs7539542 polimorfizma (CC naspram CG+GG, zasebno u CRC i u KG), kao i polimorfizma rs1800629 (GG naspram GA+AA, zasebno u CRC i u KG). U okviru istog odeljka **Rezultata**, multivarijantnom linearnom regresionom analizom je ispitivan nezavisan doprinos koji su polimorfne varijante *ADIPOQ* i *ADIPOR1* imale na varijacije nivoa genske ekspresije *TNF- $\alpha$*  i promenu u koncentracijama lipidnih markera, i to u grupi pacijenata sa karcinomom. *In silico* deo istraživanja je podrazumevao evaluaciju transkriptomskog profila adiponektinskih receptora i *TNF- $\alpha$*  u tkivu tumora, mukozi susednoj tumoru i zdravoj mukozi (GSE44076). Isti obrazac ekspresije je istražen i u PBM pacijenata sa CRC i zdravih ispitanika (GSE47756). Ovi rezultati su bili propraćeni primenom GSEA, te su detektovane korelacije od značaja, odnosno ispitivana je povezanost ekspresija adiponektinskih receptora sa genskim setovima vezanim za signalne puteve metaboličke, inflamatorne i imune homeostaze.

Deo poglavlja **Rezultata** je obuhvatio i detaljnu analizu postojanja razlika u plazmatskim koncentracijama rezistina, nivoima genske ekspresije rezistina i *CAP-1* u PBMC pacijenata sa CRC i zdravih ispitanika. Ispitivana je i razlika u odnosu koncentracija rezistina/iRNK rezistina. Negativna korelacija uočena između HDL-h i rezistina je vodila ka stratifikaciji ispitanika prema tercilima koncentracije HDL-h, te je analizirana razlika u koncentracijama rezistina kroz ove podgrupe, a zatim je na isti način analizirana i paraoksonazna aktivnost *PON-1*, kao indikatora funkcionalnosti HDL čestice. Primenom multivarijantne binarne logističke regresione analize ispitivan je prediktivni i dijagnostički potencijal plazmatskih koncentracija rezistina i *CAP-1*. Sledstveno je ispitivana dijagnostička tačnost određivanih biomarkera: rezistina, nivoa iRNK *CAP-1*, odnosa koncentracija rezistina/iRNK rezistina, ali i istih parametara grupisanih u klustere. U te svrhe su formirani modeli i to Model 1, koji su činili nivoi iRNK *CAP-1* i koncentracija rezistina, Model 2 koji se sastojao od koncentracija rezistina, aktivnosti enzima *PON-1* i koncentracije HDL-h, dok su Modelom 3 bile obuhvaćene godine ispitanika, vrednosti ITM, koncentracije HDL-h, LDL-h i rezistina. Na kraju ovog odeljka je analizirana povezanost polimorfizma *RETN* (rs1862513) i plazmatskih koncentracija rezistina, nivoa ekspresije gena rezistina i *CAP-1*, uz dodatno ispitivanje povezanosti ovog SNP i parametara lipidnog

statusa, aktivnosti PON-1, odnosa koncentracija rezistina/iRNK rezistina i ITM zasebno u grupi pacijenata i KG.

Poslednje poglavlje rezultata je bilo posvećeno MDR analizi kojom su bili obuhvaćeni sledeći polimorfizmi: *RETN* (rs1862513), *ADIPOR1* (rs1342387), *ADIPOR1* (rs7539542), *IGF1* (rs2946834), *ADIPOQ* (rs266729), SNP *TNF- $\alpha$*  (rs1800629), dok su od faktora spoljašnje sredine bili uključeni pušački status, alkohol i fizička aktivnost. Ispitano je odstupanje od Hardy-Weinbergove ravnoteže za obe analizirane grupe. Primenom Fruchterman-Rheingold grafika su vizualizovane značajne SNP-SNP interakcije, kao i interakcije SNP i faktora spoljašnje sredine, odnosno uočen je sinergizam interakcija, redundantnost, ili njihova međusobna nezavisnost.

Na kraju disertacije, dati su **Diskusija** i **Zaključci** koji proizilaze iz rezultata istraživanja i njihove analize.

## **B. Opis dobijenih rezultata**

Prvi rezultati koji su se odnosili na demografske karakteristike i parametre opšte biohemijske dijagnostike pacijenata i zdravih ispitanika, su pokazali da između grupa nema razlike u distribuciji muškaraca i žena, ali da postoji statistički značajna razlika u godinama, sa pretežno starijom populacijom pacijenata. Vrednosti ITM se nisu razlikovale između pacijenata i kontrola. Niže koncentracije ukupnih proteina i albumina su uočene kod pacijenata sa CRC, dok se nivoi glukoze i TG nisu značajno razlikovali u odnosu na zdrave osobe. Niže koncentracije UH, HDL-h i LDL-h su takođe uočene kod pacijenata sa karcinomom. Kada su u pitanju parametri specifičnog lipidnog profila, niža enzimski aktivnost LCAT je uočena u CRC, zajedno sa povišenom aktivnošću CETP i sniženom masenom koncentracijom ovog enzima. Obe aktivnosti enzima PON-1, su bile redukovane u CRC. Nasuprot tome povišene vrednosti PAB su uočene u grupi pacijenata u odnosu na zdrave ispitanike. Prvi model multivarijante binarne logističke regresione analize je pokazao da nakon korekcija za godine, pol, koncentraciju TG, HDL-h i LDL-h, aktivnost CETP ostaje statistički značajan prediktor razvoja CRC. Međutim kada je formiran model koji se sastojao od aktivnosti CETP, arilesterazne aktivnosti PON-1 i vrednosti PAB, izgubljena su prediktivna svojstva CETP. S druge strane, masena koncentracija CETP je pokazala statističku značajnost u modelu 1, ali ju je zadržala i nakon što je izvršena korekcija za parametre oksidativnog stresa. Ispitivanjem dijagnostičke tačnosti, došlo se do zaključaka da je PAB odličan potencijalni dijagnostički marker, dok se dijagnostička tačnost masene koncentracije CETP prema kriterijumu za površinu ispod krive (AUC, *area under the curve*) mogla opisati kao veoma dobra.

U delu istraživanja o značaju IGF1 i E-kadherina kao biomarkera CRC, uočene su snižene koncentracije IGF1 i povišene koncentracije E-kadherina kod pacijenata sa CRC. Pokazano da su viši nivoi IGF1 nađeni kod muškaraca sa karcinomom u odnosu na žene sa CRC. Istraživanjem promena u koncentracijama IGF1 u odnosu na ostale karakteristike pacijenata sa CRC, utvrđeno je da statistički značajnih razlika nije bilo u odnosu na prisustvo ili odsustvo dijabetesa, više ili niže vrednosti ITM, ili različite graduse tumora. Ipak, statistički značajne razlike su uočene u odnosu na stadijum tumora i lokalizaciju maligniteta. Pokazano je da pacijenti sa karcinomom rektuma imaju više koncentracije

IGF1 u odnosu na ispitanike sa karcinomom kolona, dok je smanjenje u koncentracijama ovog parametra evidentirano kroz stadijume bolesti, sa statistički značajnom razlikom između B1 i D stadijuma bolesti. Nasuprot IGF1, promene u koncentracijama E-kadherina nisu postojale u odnosu na bilo koju od antropoloških ili kliničkih karakteristika pacijenata sa CRC. Ispitivanje prediktivnog potencijala IGF1 i E-kadherina je pokazalo da su oba parametra u multivarijantnoj binarnoj logističkoj regresionoj analizi bila statistički značajna nakon korekcija za godine, pol i vrednosti ITM. Dodatno ROC analiza je pokazala prihvatljivu kliničku tačnost za određivanje nivoa IGF1 u CRC, a odličnu za određivanje koncentracije E-kadherina. U skladu sa tim je napravljen i model koji je uključivao oba parametra i za koji je pokazano da poseduje odličan dijagnostički potencijal. Međutim poređenjem ROC krivih dobijenih za kombinovani model i sam E-kadherin, statistički značajnih razlika između vrednosti AUC nije bilo. Nadalje je ispitivana i eventualna povezanost polimorfizma *IGF1* (rs2946834) i povećanog rizika za razvoj CRC. Međutim razlika u distribuciji genotipova između pacijenata sa CRC i KG nije uočena. Statistička značajnost nije evidentirana ni kada su ispitivane razlike u koncentracijama IGF1, E-kadherina, lipidnih parametara, kao i u vrednostima ITM u odnosu na genotipove pomenutog polimorfizma, ni kod pacijenata sa CRC, ni u KG. Dodatno, odstupanje od Hardy-Weinbergove ravnoteže nije uočeno ni u jednoj od ispitivanih grupa.

Evaluacijom razlika u nivoima genske ekspresije adiponektinskih receptora i TNF- $\alpha$  utvrđeni su niži nivoi iRNK Adipor1 i TNF- $\alpha$  u PBMC ispitanika sa CRC, dok razlike u genskoj ekspresiji Adipor2 nije bilo. U nastavku je ispitivana povezanost SNP *ADIPOQ* (rs266729), SNP *ADIPOR1* (rs7539542), odnosno SNP *TNF- $\alpha$*  (rs1800629) i rizika za razvoj CRC. Razlike u distribuciji genotipova između CRC i KG nije bilo ni za jedan od navedenih polimorfizama. Dodatno, odstupanje od Hardy-Weinbergove ravnoteže nije uočeno ni u CRC, ni u KG. U okviru ovog dela istraživanja, ispitivano je i postojanje razlika u nivoima genske ekspresije TNF- $\alpha$ , Adipor1 i Adipor2, kao i u koncentracijama lipidnih markera i vrednostima ITM u odnosu na određeni genotip definisan na osnovu SNP, zasebno u CRC i u KG. Kada je u pitanju SNP *ADIPOQ* (rs266729), niža ekspresija TNF- $\alpha$  je zabeležena u grupi pacijenata sa CG i GG genotipom u poređenju sa CC genotipom, no sa graničnom statističkom značajnošću. U slučaju SNP *ADIPOR1* (rs7539542), pokazano je da pacijenti sa CG i GG genotipom imaju niže koncentracije HDL-h, LDL-h i UH, dok zdravi ispitanici sa istim genotipovima imaju povišene nivoe TG. Nivoi genskih ekspresija, lipidni parametri kao i vrednosti ITM se nisu razlikovali po genotipu polimorfizma *TNF- $\alpha$*  (rs1800629), ni u grupi pacijenata sa CRC, ni u grupi zdravih ispitanika. Model multivarijante linearne regresione analize je potvrdio uticaj SNP *ADIPOQ* (rs266729) na varijacije nivoa iRNK TNF- $\alpha$ , te je ovaj polimorfizam zajedno sa vrednostima ITM bio odgovoran za 9,9 % varijacija u zavisnoj promenljivoj. Sledeći model je pokazao da 16,4 % varijacija u koncentraciji LDL-h potiče od SNP *ADIPOR1* (rs7539542) i koncentracija TG, dok je model 3 sa statistički značajnim kovarijatama SNP *ADIPOR1* (rs7539542) i nivoima TG, doveden u vezu sa 26,8 % varijacija u koncentracijama UH. *In silico* analiza GSE44076 baze podataka je ukazala na nepromenjene nivoe genske ekspresije Adipor1 u tumoru kolona u odnosu na zdravo tkivo, dok je nishodna regulacija genske ekspresije Adipor1 evidentirana u mukozi susednoj tumoru. Suprotno tome, nivoi genske ekspresije Adipor2 u mukozi susednoj tumoru su bili uporedivi sa nivoima genske

ekspresije ovog receptora u zdravim ćelijama, ali su bili viši nego u malignom tkivu. Pored toga, rezultati *in silico* analize su ukazali na snižene nivoe iRNK TNF- $\alpha$  u susednoj mukozi i u samom malignom tkivu u poređenju sa zdravim tkivom. GSEA je ukazala na pozivnu korelaciju nivoa genske ekspresije Adipor2 i genskih setova prvenstveno vezanih za metaboličke puteve u karcinomu (homeostazu holesterola, glikolizu, biosintezu steroida i PPAR signalne puteve), dok je sa druge strane protektivna funkcija Adipor1 zabeležena kada je bila u pitanju progresija tumora, i to na osnovu negativne korelacije sa TNF- $\alpha$  NF- $\kappa$ B i *mechanistic target of rapamycin kinase* (MTORC1) signalnim putevima. GSEA je takođe pokazala da genska ekspresija Adipor1 negativno korelira sa genskim setovima vezanim za miogenezu i epitelno-mezenhimalnu tranziciju (EMT) u normalnoj susednoj mukozi. Nasuprot tome, analiza transkriptomskog profila GSE47756 baze podataka nije ukazala na razlike u nivoima genskih ekspresija adiponektinskih receptora i TNF- $\alpha$  između PBM pacijenata sa CRC i zdravih ispitanika. GSEA analiza je izdvojila Adipor1 kao metabolički aktivan receptor u monocitima pacijenata sa CRC s obzirom da je pozitivna relacija uočena između nivoa iRNK Adipor1 i genskih setova vezanih za homeostazu holesterola, glikolizu, insulinski signalni put. Dodatno, u uzorcima karcinoma, nivoi genske ekspresije Adipor1 su pozitivno korelirali sa genskim setovima vezanim za imunu homeostazu, odnosno sa genskim setovima vezanim za signalni put TNF- $\alpha$  NF- $\kappa$ B i komponente komplementa.

Više koncentracije rezistina, sniženi nivoi genske ekspresije rezistina i povišeni nivoi ekspresije CAP-1 su uočeni kod pacijenata sa CRC. Odnos plazmatskih koncentracija rezistina i iRNK rezistina je bio viši u karcinomu u odnosu na zdrave ispitanike. U okviru klasifikacije pacijenata prema tercilima plazmatske koncentracije HDL-h, zabeležen je porast u koncentraciji rezistina u najnižem tercilu u odnosu na srednji i gornji tercil. U formiranim podgrupama, uočen je i porast u enzimskoj aktivnosti PON-1 u grupi ispitanika koji su pripadali najvišem tercilu u odnosu na najniži tercil. Multivarijantna regresija je nakon korekcije za godine, pol, ITM i koncentracije HDL-h i LDL-h pokazala da nivoi genske ekspresije CAP-1 nemaju prediktivni značaj, za razliku od koncentracija rezistina. Ispitivanje dijagnostičke tačnosti, kako pojedinačnih biomarkera, tako i klastera parametara, je pokazalo vrednosti AUC preko 0,7 za sve parametre sem za CAP-1, dok su se po svom dijagnostičkom potencijalu posebno izdvojili odnos koncentracija rezistina/iRNK rezistina i kombinacija godina, vrednosti ITM, koncentracija HDL-h, LDL-h i rezistina. Nadalje, analiza razlika u plazmatskim koncentracijama rezistina, nivoima ekspresije gena rezistina i CAP-1, kao i ispitivanje razlika u parametrima lipidnog statusa, odnosu koncentracija rezistina/iRNK rezistina, aktivnosti PON-1 i vrednostima ITM prema genotipu polimorfizma *RETN* (rs1862513) nije dala statistički značajne rezultate, ni u grupi pacijenata, ni u KG. Dodatno, nije bilo razlika u distribuciji genotipova između pacijenata i zdravih ispitanika, niti je uočeno odstupanje od Hardy-Weinbergove ravnoteže u ispitivanim grupama.

Uz poštovanje preporuka koje su se ticale postojanja LD između SNP koji ulaze u MDR analizu i shodno izostanku ispitanika sa genotipom AA za SNP *TNF- $\alpha$*  (rs1800629) u grupi pacijenata sa CRC, kao i činjenici da modeli sa *ADIPOR1* (rs7539542) nisu bili zadovoljavajućih performansi, finalni SNP koji su predstavljali konstituente za formiranje interakcionih grafika su bili: SNP *RETN* (rs1862513),

SNP *ADIPOR1* (rs1342387), SNP *IGF1* (rs2946834) i SNP *ADIPOQ* (rs266729). Razlike u distribuciji genotipova navedenih polimorfizama nije bilo. Takođe, odstupanje od Hardy-Weinbergove ravnoteže nije postojalo ni u jednoj od analiziranih grupa. MDR analizom su se izdvojila dva adekvatna i statistički značajna modela za predikciju razvoja CRC. Model 1 je obuhvatao sledeće polimorfizme: *RETN* (rs1862513) i *ADIPOR1* (rs1342387) i faktore spoljašnje sredine, poput pušačkog statusa, konzumacije alkohola i fizičke aktivnosti ispitanika. Drugi model je obuhvatio iste faktore spoljašnje sredine ali i polimorfizam adiponektina i adiponektinskog receptora: *ADIPOQ* (rs266729) i *ADIPOR1* (rs1342387). Interakcioni grafici su pokazali značajne sinergističke efekte polimorfizama *ADIPOR1* (rs1342387) i *RETN* (rs1862513), te *ADIPOR1* (rs1342387) i *ADIPOQ* (rs266729). Fruchterman-Rheingold grafici su ukazali i na značajan sinergizam u interakcijama gena i faktora spoljašnje sredine, i to polimorfizama *ADIPOR1* i *RETN* gena i konzumacije alkohola, kao i polimorfizma *RETN* i pušačkog statusa.

### C. Uporedna analiza rezultata iz doktorske disertacije sa podacima iz literature

Poseban problem predstavlja postepen, "neosetan" razvoj ovog karcinoma, s obzirom da od početnih ne-kancerogenih proliferacija mukoznih epitelnih ćelija do njihove maligne transformacije može proći i do 10-20 godina (1), pri čemu sam tumor ne pokazuje simptome dok ne dostigne veličinu od nekoliko cm, te počne da ometa normalnu crevnu pasažu, izaziva bolove u stomaku i krvavu stolicu (2). CRC je bolest multifaktorske etiologije, na koju i pored izražene nasledne komponente, u velikoj meri utiču životne navike pojedinca, što modifikuje rizik za razvoj maligniteta. Naime, smatra se da se 16-71% slučajeva nastanka CRC može pripisati promenljivim faktorima rizika (3). Stoga se posebno značajnom za razvoj ovog karcinoma može smatrati interakcija urođenih, genetskih činilaca i spoljašnjih, promenljivih faktora sredine. Imajući na umu nisku stopu preživljavanja pacijenata sa uznapredovalom formom bolesti (2) neophodan je brz razvoj integrativnog laboratorijskog pristupa dijagnostici CRC koji bi uključio više parametara značajnih za razvoj karcinoma, a sve u cilju poboljšanja trenutno dostupnih skrining, odnosno dijagnostičkih neinvazivnih procedura. U te svrhe se u ovom doktoratu predlaže multimarkerski pristup. Ovaj pristup bi najpre obuhvatio markere metaboličke i inflamatorne homeostaze, zatim pokazatelje redoks statusa, te medijatore imunog odgovora, a sve imajući u vidu značaj ovih procesa za razvoj CRC.

Kada je u pitanju metabolički fenotip ćelija sa CRC, na prvom mestu treba naglasiti da ga pored anaerobne glikolize i intenzivne glutaminolize odlikuju još i pojačana sinteza masnih kiselina, ali i holesterola (4). Danas postoji sve više dokaza o uvećanim potrebama malignih ćelija za holesterolom. Štaviše, pokazano je da maligne ćelije osim što koriste holesterol kao gradivnu komponentu membrana, dodatno mogu i da ga konvertuju u odgovarajuće metabolite koji dalje služe za aktivaciju signalnih puteva vezanih za procese ćelijske diferencijacije i proliferacije (5). Samim tim su holesterol i njegovi metaboliti direktno povezani sa rastom i metastaziranjem tumora (5). Stoga se u naučnim krugovima intenzivno razmatra primena povišenih koncentracija ukupnog holesterola kao markera rizika za razvoj CRC, ali i primena niskih koncentracija holesterola kao indikatora maligne progresije u toku koje maligne ćelije intenzivno preuzimaju holesterol iz plazme i utiču na smanjenje njegovih cirkulišućih



nivoa (6). Ipak, trenutno dostupni rezultati nisu jednoglasni i kreću se od nalaza da su povišeni nivoi lipidnih parametara povezani sa metastaziranjem tumora (7), do toga da je nishodno regulisana sinteza UH vezana sa preživljavanjem ćelija CRC (8). Slična dilema postoji i kada su u pitanju koncentracije LDL-h i TG. Naime Xie i sar. su ukazali na prediktivni značaj visokih koncentracija LDL-h i TG za pojavu polipa (9), dok su Hong i sar. (10) ukazali na povezanost niskih koncentracija LDL-h i limfovaskularne invazije tumora. Rezultati predstavljeni u sklopu ove disertacije su ukazali na snižene koncentracije UH, LDL-h i HDL-h u CRC, što govori u prilog potencijalnog doprinosa dislipidemije progresiji bolesti.

Promene HDL su posebno zanimljive s obzirom da je ova lipoproteinska čestica zahvaljujući svojim strukturnim i funkcionalnim svojstvima postavljena u središte metaboličke, inflamatorne, redoks i imune ravnoteže. HDL je i u prethodnim studijama dovođen u vezu sa CRC. Naime, Zhang i sar. su ukazali na povišene koncentracije HDL-h u kancerogenom tkivu, u odnosu na parakancerogeno (11), dok su prema istraživanju Healy i sar. (12) serumske koncentracije HDL-h bile povezane sa širenjem tumora na limfne čvorove. Kod pacijenata sa II i III stadijumom CRC, niže pre-operativne koncentracije HDL-h, su bile povezane sa lošijom stopom preživljavanja (13). Više studija je ukazalo i na vezu redukovanih nivoa HDL-h i razvoja adenomatoznih polipa (14). Ipak, bez obzira na brojna istraživanja u kojima je evaluirana koncentracija HDL-h u CRC, parametri remodelovanja i funkcionalnosti HDL čestica do sada nisu ispitivani u okviru ovog maligniteta. Određivanje specifičnog lipidnog profila pacijenata sa CRC je podrazumevalo ispitivanje aktivnosti enzima LCAT i CETP, kao i određivanje masenih koncentracija CETP. Naime u grupi pacijenata sa karcinomom je uočena snižena aktivnost enzima LCAT, povišena aktivnost CETP, uz redukovane nivoe CETP proteina. Smatra se da snižena aktivnost LCAT predstavlja potencijalni uzrok poremećaja u sazrevanju HDL čestica (15), što za posledicu može da ima i niske koncentracije HDL-h u CRC.

U slučaju CETP, studije su dokazale značaj ovog enzima za ćelijsko preuzimanje hoesterola, te je zahvaljujući tome ovaj protein prepoznat kao jedan od činilaca kompleksnog razvoja karcinoma dojke (16), dok je njegova uloga u CRC do sada ostala neispitana. U ovoj doktorskoj disertaciji je pokazano da bez obzira na redukciju u masenoj koncentraciji CETP, aktivnost enzima ostaje povišena u karcinomu, što upućuje na to da male, inače nedovoljno zrele HDL čestice, postaju obogaćene TG preuzetim sa drugih cirkulišućih lipoproteina. Na ovaj način, uz sniženu aktivnost LCAT i povišenu aktivnost CETP, narušava se struktura i smanjuje funkcionalni kapacitet HDL čestica (17). Uočeno smanjenje u paraoksonaznoj i arilesteraznoj aktivnosti enzima PON-1 u CRC dobro odslkava poremećaje funkcionalnosti HDL čestica. Uloga CETP u povećanju rizika za nastanak kardiovaskularnih bolesti je dobro istražena u prethodnim studijama, ali značaj ovog enzima u nastanku i razvoju CRC do sada nije ispitivan. Ipak, imajući u vidu doprinos CETP nastanku disfunkcionalnih HDL čestica, jasno je da bi rezultati dobijeni u ovoj doktorskoj disertaciji mogli da se tumače u istom pravcu. U tom smislu, uočen nezavisni potencijal masene koncentracije CETP u predviđanju rizika za nastanak CRC ukazuje na moguću primenu ovog biomarkera u predikciji i prevenciji CRC.

U sklopu ispitivanja metaboličkih poremećaja u CRC određivan je IGF1, kao i polimorfizam od značaja vezan za IGF1 gen (SNP *IGF1 rs2946834*) (18). Naime studije su pokazale da

IGF1 kroz interakciju sa IGF1R promoviše razvoj adenomatoznih polipa (19). Zapravo više studija je ukazalo na značajnu povezanost između povišenih koncentracija IGF1 i razvoja CRC, ali i ostalih karcinoma. Za IGFB3, koji inače predstavlja glavni vezujući protein IGF1, je pokazano da direktno ispoljava antiproliferativne i proapoptotske efekte u ćelijskim linijama CRC (20, 21), dok je nasuprot tome IGF1R/Akt/Bcl-xL signalna osa dovedena u vezu sa razvojem agresivnijeg oblika CRC (22). Međutim bez obzira na dokaze osnovnih studija, zaključci kliničkih istraživanja o koncentracijama IGF1 u CRC nisu usaglašeni, te su pojedine studije isticale značaj povišenih ekspresija IGF1 u CRC (23), dok su drugi autori ukazali na postojanje niskih nivoa IGF1 u karcinomu (24). Skorašnje studije su uputile i na dijagnostički potencijal koji može da ima recipročna zavisnost IGF1 i E-kadherina, uočena u različitim tipovima karcinoma (25, 26). Naime, pokazano je da IGF1 može da doprinese razvoju agresivnijeg tipa karcinoma preko uticaja na migraciju ćeliju kroz regulisanje E-kadherin/ $\beta$  katenin kompleksa, te je važno ispitati značaj oba markera za CRC (27). E-kadherin, kao jedan od glavnih proteina EMT, predstavlja jedan od najvažnijih pokazatelja razvoja metastaza tumora (28). Ipak, iako je redukovana ekspresija E-kadherina bila povezivana sa uznapredovalim CRC (29), pojedini autori su isticali povišene koncentracije solubilne forme ovog proteina u tumoru kolorektuma (30). Utvrđeno je da nivoi solubilnog E-kadherina rastu u odnosu na progresiju bolesti (31). Dodatno, pokazano je da je uloga E-kadherina u očuvanju epitelne homeostaze, otežana u inflamaciji, što može biti od posebnog značaja za CRC, s obzirom da inflamatorni procesi predstavljaju jednu od glavnih odlika maligniteta (32). Samim tim može se reći da E-kadherin, kao parametar predstavlja sponu dva procesa: inflamacije i EMT. Shodno svemu navedenom u ovom istraživanju su analizirane razlike u koncentracijama IGF1 i E-kadherina kod pacijenata sa CRC i zdravih ispitanika, te je procenjivan njihov dijagnostički potencijal. Prema dobijenim rezultatima, niže koncentracije IGF1 su uočene u CRC, zajedno sa višim nivoima E-kadherina. Postavljena je hipoteza da su niske vrednosti IGF1 u studiji verovatno posledica kaheksije ispitanika. Iako u istraživanju nije procenjivan stepen kaheksije, naglašeno je da je veliki procenat ispitanika imao ITM  $<25 \text{ kg/m}^2$ . Dodatno, poznato je da je kaheksija praćena narušenom funkcijom jetre (33) koja je glavno mesto sinteze IGF1. U prilog ovog zaključka govore i niske koncentracije ukupnih proteina i albumina uočene u grupi pacijenata sa CRC.

S druge strane, ranije je utvrđeno je da proteolizom intaktnog molekula E-kadherina nastaje solubilni fragment (30) što je u skladu sa rezultatima dobijenim u ovoj doktorskoj tezi. Dodatno, nisu utvrđene razlike u koncentracijama E-kadherina u odnosu na pol, vrednosti ITM, ili istovremeno prisustvo dijabetesa, te se može zaključiti da E-kadherin predstavlja stabilan marker CRC. Razlike nisu uočene ni kada se radilo o lokalizaciji tumora, podeli na osnovu stadijuma ili gradusa tumora. Pored studija koje su utvrdile da je smanjena ekspresija E-kadherina povezana sa agresivnijim oblikom bolesti (34) i lošijom prognozom (35), rađena je i studija koja je pokazala da nema razlika u koncentracijama E-kadherina u odnosu na stadijum ili gradus CRC, što je u skladu sa predstavljanim rezultatima (36).

Ispitivanje prognostičkog potencijal E-kadherina i IGF-1 je pokazalo da i nakon korekcije za vrednosti ITM, starost i pol ispitanika, oba parametra ostaju statistički značajno povezana sa rizikom za razvoj CRC, s tim da bi se E-kadherin mogao pre posmatrati kao biomarker prisustva CRC, nezavisno

od stadijuma ili gradusa maligniteta, dok bi se IGF1 više mogao koristiti za predviđanje pojave uznapredovale forme CRC. Ispitivanje dijagnostičke tačnosti je ukazalo na poseban značaj E-kadherina kao potencijalnog biomarkera CRC, s obzirom na visoku vrednost AUC dobijenu ROC analizom ovog parametra. Dodatno, pokazano je i da AUC vrednost u slučaju kombinovanog određivanja IGF-1 i E-kadherina nije značajno poboljšana u odnosu na AUC samog E-kadherina, te ovo ukazuje da bi E-kadherin mogao imati prednosti u odnosu na IGF1, odnosno da predstavlja bolji dijagnostički marker.

Ispitivanjem polimorfizma *IGF1* (*rs2946834*), pokazano je da razlika u distribuciji genotipova između pacijenata i kontrola ne postoji. Dodatno, masene koncentracije IGF1, E-kadherina, vrednosti ITM i lipidnih parametara se nisu razlikovale prema genotipu polimorfizma *IGF1* (*rs2946834*) niti u CRC, niti u KG. Naime, prethodne studije su istakle povezanost ovog polimorfizma sa promenama u koncentraciji cirkulišućeg IGF1, ali i sa lošijom stopom preživljavanja u CRC (37, 38). U disertaciji ove relacije nisu uočene, što bi se moglo pripisati i relativno maloj veličini uzorka u istraživanju.

Više studija je ukazalo na vezu adiponektina, odnosno adiponektinskih receptora sa razvojem CRC (39). Naime, pokazani su viši nivoi genske i proteinske ekspresije adiponektinskih receptora kod pacijenata sa tumorom kolona (40), ali je uočeno i da sa napredovanjem T stadijuma tumora, stepen imunohemijskog bojenja na adiponektinske receptore opada (41). S obzirom da su metabolički efekti adiponektina u malignim bolestima u velikoj meri razjašnjeni, ali i dominantno ispitani u malignom tkivu, a ne u plazmi, ovo istraživanje je imalo za cilj sticanje uvida u izmene parametara metabolizma adiponektina korišćenjem lako dostupnih PBMC. Imajući u vidu značaj adiponektina za polarizaciju i plastičnost monocita/makrofaga (42) jasno je zašto se sve više studija okreće ka istraživanju njegovih imunomodulatornih efekata. Naime poznato je da adiponektin potiskuje aktivaciju M1 makrofaga i pomera ravnotežu ka razvoju antiinflamatornog M2 fenotipa (43). Pretpostavlja se da vezivanje adiponektina za receptor Adipor1 doprinosi modulaciji imunog odgovora, te je istaknuta veza ovog receptora sa nishodnom regulacijom NF- $\kappa$ B proinflamatorne kaskade, dok su efekti posredovani Adipor2 vezivani mahom za polarizaciju makrofaga ka M2 subpopulaciji (43). Pored navedenog, jasno je i da polimorfizmi adiponektina, odnosno adiponektinskih receptora mogu imati važnu ulogu u pravilnom ispoljavanju zaštitnih metaboličkih, ali i imunoloških efekata adiponektina, te samim tim ovi parametri mogu naći i kliničku primenu, pogotovo u kompleksnim stanjima poput CRC. U te svrhe u okviru ove teze istraživani SNP *ADIPOQ* (*rs266729*) i SNP *ADIPOR1* (*rs7539542*, *rs1342387*). Određivanje nivoa ekspresija gena je vršeno iz PBMC, sa namerom da se uvaži važan postulat savremene medicine o neinvazivnosti primenjenih dijagnostičkih procedura. Takođe, u ovoj doktorskoj disertaciji posebno je istaknuta povezanost adiponektinskih receptora i TNF- $\alpha$  kao imunološkog medijatora. Prethodne studije dale su oprečne rezultate u vezi sa ulogom TNF- $\alpha$  u nastanku malignih bolesti, te postoje dokazi o TNF- $\alpha$  posredovanoj aktivaciji NF- $\kappa$ B-aktivator protein 1 signalne kaskade koja doprinosi preživljavanju i proliferaciji malignih ćelija (44), dok je s druge strane TNF- $\alpha$  prepoznat i kao aktivator citotoksičnih T limfocita, odnosno tumor-infiltrirajućih makrofaga (45). Dok je povezanost adiponektina i TNF- $\alpha$  već detaljno opisana, podataka o vezi između TNF- $\alpha$  i adiponektinskih receptora ima veoma malo, pogotovo u CRC. Naime, pokazano je da se protektivni efekti adiponektina, posredovani redukcijom inflamatornog odgovora TNF- $\alpha$ , mogu ostvariti preko

Adipor-1 zavisne aktivacije, u endotelnim ćelijam pupčane vene (46), ali ovaj odnos nije ispitivan u CRC.

U ovom istraživanju uočeni su niži nivoi genske ekspresije Adipor1 i TNF- $\alpha$  u PBMC pacijenata sa CRC, dok razlike u nivoima ekspresije Adipor2 nije bilo. Ovakav interesantan nekoherentan obrazac adiponektinske ekspresije je uočen i prilikom *in silico* analize GSE44076 baze podataka, te su niži nivoi iRNK Adipor2 i povišeni nivoi iRNK Adipor1 nađeni u tumorskom tkivu u odnosu na mukožu susednu tumoru. Isto tako niži nivoi genske ekspresije Adipor2 su detektovani u malignom tkivu prilikom poređenja sa potpuno zdravom mukozom, dok razlike u nivoima ekspresije Adipor1 nije bilo. Transkriptomski profil dobijen poređenjem zdrave mukoze i mukoze susedne tumoru se najbolje slagao sa stanjem uočenim u PBMC, odnosno niži nivoi genske ekspresije Adipor1 su evidentirani u tumor-susednoj mukozu, dok se nivoi Adipor2 nisu razlikovali u odnosu na zdravo tkivo. Neki od predloženih uzročnika dominacije jedne od formi receptora su varijacije u koncentracijama adiponektina, te uticaj proteina na ekspresiju sopstvenih receptora (47), kao i reverzni efekat, odnosno uticaj polarizacije makrofaga na ekspresiju Adipor1 i Adipor2 (47). Rezultati dobijeni u ovoj disertaciji su bili u saglasnosti i sa ranijim literaturnim navodima o redukovanoj ekspresiji Adipor1 kad pacijenata sa uznapredovalim karcinomom (48), s obzirom da je kod visokog procenta ispitanika sa CRC bolest uznapredovala. Postavljena je i hipoteza o produženom i pojačanom inflamatornom odgovoru usled sniženih nivoa ekspresije Adipor1 u PBMC ispitanika sa CRC, shodno rezultatima studija na životinjskim modelima (49). Slaganje opservacionih i *in silico* rezultata dobijenih u ovoj tezi je postojalo i kada se radilo o ekspresiji TNF- $\alpha$ , s obzirom da su niži nivoi iRNK ovog imunološkog medijatora zabeleženi kada su tumorsko tkivo, ali i tumor-susedna mukoza upoređivani sa zdravim tkivom. Interesantno je da su Ganapathi i sar. (50) naveli mikrosatelitsku nestabilnost kao jedan od uzročnika nižih ekspresija TNF- $\alpha$  u PBMC pacijenata sa CRC. Prethodne studije opisuju ulogu TNF- $\alpha$  u CRC kao dualnu, te su se mogle naći studije koje su na različite načine apostrofirale značaj viših nivoa ekspresije TNF- $\alpha$  za razvoj CRC (51, 52).

Drugi deo *in silico* ispitivanja koji je podrazumevao GSEA je ukazao na veći značaj Adipor2 za metabolizam u malignom tkivu (GSE44076), dok je uloga Adipor1 naglašena kao protektivna shodno negativnoj korelaciji nivoa genske ekspresije ovog receptora i genskih setova TNF- $\alpha$  NF- $\kappa$ B i *mechanistic target of rapamycin kinase* (MTORC1). Naime prethodne studije su istakle značaj tumor-infiltrirajućih leukocita u modulaciji ćelijskog rasta i preživljavanju malignih ćelija CRC upravo kroz aktivaciju kaskada signalnog transduktora i aktivatora transkripcije 3 (STAT3) i NF- $\kappa$ B (53). TNF- $\alpha$  je ovde posebno naglašen kao jedan od glavnih citokina odgovornih za efekte posredovane NF- $\kappa$ B signalizacijom (53). Samim tim negativna relacija Adipor1-TNF- $\alpha$  NF- $\kappa$ B uočena u GSEA se može smatrati posebno bitnom za razvoj CRC. Studije su takođe pokazale da aktivacijom adenozinmonofosfat-aktivirane protein kinaze, adiponektin zapravo suprimira mammalian target of rapamycin (mTOR) signalizaciju, te na taj način sprečava i rast ćelija CRC (54). Nadalje, antineoplastični efekti adiponektina posredovani Adipor1 su istaknuti i kroz negativnu korelaciju genske ekspresije Adipor1 i miogeneze odnosno EMT u tumor susednoj mukozu. Nasuprot tome GSEA druge baze podataka (GSE47756) je pokazala da je u PBM pacijenata sa karcinomom, Adipor1 taj koji je zapravo

metabolički aktivan, dok je zapažena i iznenađujuća pozitivna relacija nivoa iRNK Adipor1 i TNF- $\alpha$  NF- $\kappa$ B signalne kaskade. Ipak ovi rezultati su bili bazirani samo na ispitivanju populacije monocita, te bi pre konačnog zaključka o vezi Adipor1-TNF- $\alpha$ , trebalo razmotriti i druge subpopulacije leukocita preko kojih adiponektin takođe ostvaruje imunomodulatorne efekte (43).

Kada se radilo o polimorfizmima, ni za SNP *ADIPOQ* (rs266729), *ADIPOR1* (rs7539542) ili *TNF- $\alpha$*  (rs1800629) nije pokazana veza sa CRC, odnosno nije uočena razlika u zastupljenosti genotipova između pacijenata i kontrola. Iznenađujuće SNP *ADIPOQ* (rs266729), zapravo kombinacija CG i GG genotipova ovog polimorfizma je pokazala povezanost sa nivoima genske ekspresije TNF- $\alpha$  u CRC, iako sa graničnom statističkom značajnošću. Ova relacija je dodatno potvrđena rezultatima linearne regresije. Studija Divella i sar. (55) je takođe ukazala na povezanost *ADIPOQ* (rs266729) i TNF- $\alpha$ . Zapravo pokazano je da nosioci CG i GG genotipova imaju više koncentracije TNF- $\alpha$  i niže koncentracije cirkulišućeg adiponektina (55). Ovi rezultati potvrđuju vezu adiponektinske i imune homeostaze, ostvarene preko promena u nivou genske ekspresije ili koncentracija TNF- $\alpha$ . Kada je bio u pitanju sledeći polimorfizam od interesa *ADIPOR1* (rs7539542) na isti način je uočeno da su CG i GG genotipovi bili povezani sa promenama u koncentracijama lipida. Rezultati multivarijantne linearne regresije su ukazali na značaj kombinacije SNP *ADIPOR1* (rs7539542) i koncentracija TG za objašnjenje 16,4 % varijacija u koncentracijama LDL-h, odnosno 26,8% varijacija u koncentracijama UH. Inače veza ovog polimorfizma i UH je već dokazana u ranijim studijama, ali u okviru subkliničkih kardiovaskularnih bolesti, dok ovaj tip relacije nije prijavljivan u malignim bolestima (56). S druge strane polimorfizam *TNF- $\alpha$*  (rs1800629) nije mogao da se dovede u vezu niti sa promenama u nivoima genske ekspresije adiponektinskih receptora ili samog TNF- $\alpha$ , niti sa vrednostima ITM, odnosno sa lipidnim pokazateljima ni u jednoj od ispitivanih grupa (CRC ili KG). Ipak meta analiza je ukazala na veći značaj ovog polimorfizma za razvoj CRC kada je u bila u pitanju azijska populacija, dok isto nije važno za belu rasu, te se ovo poklapa sa rezultatima prikazanog istraživanja (57).

Važan segment ove doktorske disertacije činilo je ispitivanje značaja rezistina kao biomarkera CRC. Studije su već pokazale da su povišene vrednosti rezistina bile u vezi sa većim rizikom za razvoj CRC (58). Povezanost rezistina sa inflamacijom je jasno potvrđena, ali do sada nije ispitivana veza ovog markera i dislipidemije koja uobičajeno prati CRC. U tom smislu, rezistin se može posmatrati kao jedan od parametara koji predstavlja sponu inflamacije, dislipidemije i karcinogeneze. U ove svrhe analizirana je relacija rezistina i HDL-h odnosno posredna veza rezistina i paraoksonazne aktivnosti enzima PON-1, te su na kraju formirani i odgovarajući klasteri biomarkera. Inače studije na životinjskim modelima su već predložile mehanizam prema kome HDL čestice interakcijom sa oksidovanim LDL smanjuju količinu slobodnog holesterola, kao i stres endoplazmatskog retikuluma, usled čega dolazi do redukcije sekrecije rezistina (59). U skladu s tim, niži nivoi HDL-h, kao i umanjena funkcionalnost čestica kod pacijenata sa CRC bi mogli uticati na sposobnost ovog lipoproteina da redukuje sekreciju rezistina. Ovakav zaključak je usaglašen sa porastom koncentracije rezistina u najnižem tercilu koncentracija HDL-h kod ispitanika sa CRC, što je uočeno u ovoj disertaciji.

U okviru ispitivanja značaja rezistina za razvoj CRC, podvlači se interakcija ovog proteina sa novootkrivenim receptorom CAP-1. Naime, poznato je da PBMC predstavljaju važan izvor rezistina, dok je paralelno dokazana visoka zastupljenost CAP-1 u koštanoj srži i u PBMC (60, 61). Zbog svega navedenog, bilo je značajno ispitati obrazac interakcije protein-receptor i u ovom istraživanju, s obzirom da su slične studije retke, a da ih u CRC uopšte nije ni bilo. Prethodno je pokazano da vezivanje rezistina za CAP-1 rezultuje pojačanom aktivacijom protein kinaze A i NF- $\kappa$ B signalnog puta, što ima za posledicu produkciju proinflamatornih citokina (61). Ovome treba pridodati i značaj koji polimorfizam *RETN* (rs1862513) kao jedan od najčešćih genetskih diverziteta može da ima ne samo na nivoe genske ekspresije rezistina i koncentraciju cirkulišućeg proteina, već i na interakciju sa receptorom. Dodatno, više studija je istaklo vezu ovog polimorfizma i CRC (62). Rezultati ove disertacije su ukazali na postojanje viših koncentracija rezistina, sniženih nivoa genske ekspresije rezistina i ushodno regulisanu ekspresiju CAP-1 kod pacijenata sa CRC. Uočeni trend visokih koncentracija rezistina i visokih nivoa iRNK CAP-1 sugerišu njihovu potencijalnu interakciju u CRC. Studije su već ukazale na značaj CAP-1 za razvoj i progresiju karcinoma. Naime, pokazana je povezanost prekomerne genske ekspresije CAP-1 u tkivima i niže stope preživljavanja kod karcinoma dojki i ovarijuma (63). Dodatno je naglašeno da ovaj protein predstavlja bitan medijator invazivnosti karcinoma, upravo zbog svoje uloge u vezivanju aktina (63, 64). U tom smislu, ispitivanje interakcije rezistin-CAP-1 u CRC predstavlja značajan doprinos prethodnim istraživanjima u ovoj oblasti. Rezultati ove disertacije nisu ukazali na povezanost polimorfizma *RETN* (rs1862513) sa rizikom za razvoj CRC, niti sa bilo kojim od određivanih parametara, što opet može biti posledica malog uzorka.

Neočekivan rezultat su predstavljale visoke koncentracije rezistina kod pacijenata sa CRC, paralelno sa nishodno-regulisanom genskom ekspresijom. Međutim objašnjenje za ovakav rezultat može da se potraži u činjenici da iako PBMC predstavljaju važan izvor rezistina (60), smatra se da veliki deo ovog proteina može da potiče i iz tumor-infiltrirajućih makrofaga (65). Svakako da PBMC svojom produkcijom doprinose plazmatskim nivoima rezistina, ali se naglašava da one nisu njegov jedini i najvažniji izvor u CRC. Dodatno, odnos koncentracija rezistina/iRNK rezistina se pokazao izuzetno dobrim prediktivnim faktorom, s obzirom da su vrednosti ovog parametra bile izrazito povišene u CRC u poređenju sa kontrolom, kao i da je ROC analiza ukazala na visoku dijagnostičku tačnost ovog izvedenog parametra. Takođe, finalna ROC analiza više različitih klastera parametara je još jednom istakla značaj multimarkerskih modela za predviđanje prisustva CRC, te dala prednost multimarkerskom modelu u odnosu na pojedinačne biomarkere.

#### **D. Zaključak - obrazloženje naučnog doprinosa doktorske disertacije**

Savremena medicina teži ka razvoju novih dijagnostičkih i prognostičkih alata u svrhe ranog otkrivanja, prevencije i tretmana bolesti, posebno onih sa velikom globalnom učestalošću. Maligne bolesti se nalaze među najvećim pretnjama globalnom zdravlju, a CRC se nalazi na trećem mestu po incidenci, odmah nakon karcinoma pluća i karcinoma dojke. Međutim, osnovna dijagnostička tehnika

kod CRC je visoko invazivna kolonoskopija, dok još uvek nema dovoljno specifičnih i osetljivih, a neinvazivnih i lako dostupnih markera za ranu detekciju ovog stanja.

U ovoj doktorskoj disertaciji primenjen je inovativni pristup prema kojem se potencijalni biomarkeri CRC analiziraju primenom nekoliko metodoloških aspekata: određivanje plazmatske koncentracije proteina, njegove genske ekspresije, te ekspresije odgovarajućeg receptora u PBMC, uz ispitivanje SNP od interesa. PBMC su izabrane kao materijal za genetske analize, pre svega imajući u vidu dostupnost uzorka, što je u skladu sa osnovnim ciljem da se detektuju minimalno invazivni biomarkeri. Rutinsko određivanje koncentracija proteina dopunjeno određivanjem nivoa genske ekspresije, sem boljih prediktivnih i dijagnostičkih karakteristika, sa sobom nosi i relevantnu informaciju o mogućim posttranskripcionim, odnosno posttranslacionim izmenama, te uticaju mutacija i epigenetske varijabilnosti, koji se svakako mogu odraziti i na finalne koncentracije analita od interesa. Ovakav pristup u dijagnostici otvara i mogućnosti za razvoj novih, personalizovanih terapijskih strategija.

S druge strane, u istraživanju je primenjeno i povezivanje biomarkera pojedinačnih patoloških procesa koji prate karcinogenezu u integrisane panele, radi obezbeđivanja većeg prediktivnog i dijagnostičkog potencijala. Na taj način su objedinjeni istraživački rezultati i postavljene osnove za njihovu moguću praktičnu primenu u kliničko-laboratorijskoj praksi. U studiji su u sklopu multimarkerskih modela identifikovani nezavisni prediktori razvoja CRC koji do sada nisu bili ispitivani. Dodatno je pokazano da klasteri strukturno sličnih i funkcionalno povezanih parametara imaju ili veoma dobru, ili čak odličnu dijagnostičku tačnost. Naročito treba istaći da je utvrđen prediktivni i dijagnostički značaj različitih indikatora strukturnih i funkcionalnih promena HDL čestica, kao i njihovih kombinacija sa markerima inflamacije i oksidativnog stresa. Naime, iako je koncentracija HDL-h često analizirana kod pacijenata sa CRC, dosadašnje studije nisu u velikoj meri ispitivale kvalitativne karakteristike ovog lipoproteina. Međutim, s obzirom da se pokazatelji narušenog metabolizma HDL relativno jednostavno određuju iz uzoraka krvi, ovi biomarkeri mogu imati veliki značaj u neinvazivnoj dijagnostici i proceni rizika za nastanak oboljenja.

Dodatni značaj ovoj tezi daje i procena povezanosti poremećaja metaboličke i imune ravnoteže kod pacijenata sa CRC, koja je realizovana uporednim izvođenjem opservacione studije i *in silico* ispitivanja nivoa ekspresije adiponektinskih receptora i TNF- $\alpha$  u tkivu i u krvi. Ujedno ovo je jedna od retkih studija koja je ispitala značaj gensko-genske interakcije, kao i interakcija polimorfizama i faktora spoljašnje sredine za razvoj CRC.

## **Literatura:**

1. Rawla P, Sunkara T, Barsouk A. Epidemiology of colorectal cancer: incidence, mortality, survival, and risk factors. *Przeglad gastroenterologiczny*. 2019; 14:89-103.
2. Simon K. Colorectal cancer development and advances in screening. *Clinical interventions in aging*. 2016; 11:967-976.
3. Kuipers EJ, Grady WM, Lieberman D, et al. Colorectal cancer. *Nature reviews. Disease Primers*. 2015; 1:15065. DOI: 10.1038/nrdp.2015.65
4. Brown RE, Short SP, Williams CS. Colorectal cancer and metabolism. *Current colorectal cancer reports*. 2018; 14:226-241.

5. Swan R, Alnabulsi A, Cash B, Alnabulsi A, Murray GI. Characterisation of the oxysterol metabolising enzyme pathway in mismatch repair proficient and deficient colorectal cancer. *Oncotarget*. 2016; 7:46509- 46527.
6. Mamtani R, Lewis J, Scott F, Ahmad T, Goldberg D, Datta J, Yang Y, Boursi B. Disentangling the Association between Statins, Cholesterol, and Colorectal Cancer: A Nested Case-Control Study. *PLOS MEDICINE*.2016; <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1002007>
7. Notarnicola M, Altomare DF, Correale M, Ruggieri E, D'Attoma B, Mastrosimini A, Guerra V, Caruso MG. Serum lipid profile in colorectal cancer patients with and without synchronous distant metastases. *Oncology*. 2005; 68:371-374.
8. Kaneko R, Tsuji N, Asanuma K, Tanabe H, Kobayashi D, Watanabe N. Survivin down-regulation plays a crucial role in 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitor-induced apoptosis in cancer. *Journal of Biological Chemistry*. 2007; 282:19273-19281.
9. Xie C, Wen P, Su J, Li Q, Ren Y, Liu Y, Shen R, Ren J. Elevated serum triglyceride and low-density lipoprotein cholesterol promotes the formation of colorectal polyps. *BMC gastroenterology*. 2019; 19:1-6.
10. Hong TT, Shen D, Chen XP, Wu XH, Hua D. Preoperative serum lipid profile and outcome in nonmetastatic colorectal cancer. *Chronic diseases and translational medicine*. 2016; 2:241-249.
11. Zhang X, Zhao XW, Liu DB, Han CZ, Du LL, Jing JX, Wang Y. Lipid levels in serum and cancerous tissues of colorectal cancer patients. *World Journal of Gastroenterology: WJG*. 2014; 20:8646-8652.
12. Healy LA, Howard JM, Ryan AM, Beddy P, Mehigan B, Stephens R, Reynolds JV. Metabolic syndrome and leptin are associated with adverse pathological features in male colorectal cancer patients. *Colorectal Disease*. 2012; 14:157-165.
13. Wang Y, Sun XQ, Lin HC, Wang DS, Wang ZQ, Shao Q, Wang FH, Yan SM, Liang JY, Zeng ZL, Ju HQ. Correlation between immune signature and high-density lipoprotein cholesterol level in stage II/III colorectal cancer. *Cancer medicine*. 2019; 8:1209-1217.
14. Li CF, Li J, Bai P, Lv YM. Characteristic analysis of plasma lipid metabolism level in patients with colorectal adenoma. *Beijing da xue xue bao. Yi xue ban= Journal of Peking University. Health Sciences*. 2011; 43:432-435.
15. Kunnen S, Van Eck M. Lecithin: cholesterol acyltransferase: old friend or foe in atherosclerosis? *Journal of lipid research*. 2012; 53:1783-1799.
16. Esau L, Sagar S, Bangarusamy D, Kaur M. Identification of CETP as a molecular target for estrogen positive breast cancer cell death by cholesterol depleting agents. *Genes & cancer*. 2016; 7:309-322.
17. Kontush A, Chapman MJ. Functionally defective high-density lipoprotein: a new therapeutic target at the crossroads of dyslipidemia, inflammation, and atherosclerosis. *Pharmacological reviews*. 2006; 58:342-374.
18. Schirripa M, Zhang W, Heinemann V, Cao S, Okazaki S, Yang D, Loupakis F, Berger MD, Ning Y, Miyamoto Y, Suenaga M. Single nucleotide polymorphisms in the IGF-IRS pathway are associated with outcome in mCRC patients enrolled in the FIRE-3 trial. *International journal of cancer*. 2017; 141:383-392.
19. Zhang R, Xu GL, Li Y, He LJ, Chen LM, Wang GB, Lin SY, Luo GY, Gao XY, Shan HB. The role of insulin-like growth factor 1 and its receptor in the formation and development of colorectal carcinoma. *Journal of international medical research*. 2013; 41:1228-1235.
20. Williams AC, Smartt H, H-Zadeh AM, Macfarlane M, Paraskeva C, Collard TJ. Insulin-like growth factor binding protein 3 (IGFBP-3) potentiates TRAIL-induced apoptosis of human colorectal carcinoma cells through inhibition of NF- $\kappa$  B. *Cell Death & Differentiation*. 2007; 14:137-145.
21. Baxter RC. Signalling pathways involved in antiproliferative effects of IGFBP-3: a review. *Molecular Pathology*. 2001; 54:145-148.
22. Sekharam M, Zhao H, Sun M, Fang Q, Zhang Q, Yuan Z, Dan HC, Boulware D, Cheng JQ, Coppola D. Insulin-like growth factor 1 receptor enhances invasion and induces resistance to apoptosis of colon cancer cells through the Akt/Bcl-xL pathway. *Cancer research*. 2003;63:7708-7716.



23. Hu J, Liu X, Chi J, Che K, Feng Y, Zhao S, Wang Z, Wang Y. Expressions of IGF-1, ERK, GLUT4, IRS-1 in metabolic syndrome complicated with colorectal cancer and their associations with the clinical characteristics of CRC. *Cancer Biomarkers*. 2018; 21:883-891.
24. Yosry A, Omran D, Yousef M, Salah M, Omar H, Hamdy S, Shaker O, Elsherif Y, Marie MS. SNPs in the insulin-like growth factor gene and obesity impact on colorectal cancer in Egyptians. *Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP*. 2017; 18:2959-2964.
25. Le Coz V, Zhu C, Devocelle A, Vazquez A, Boucheix C, Azzi S, Gallerne C, Eid P, Lecourt S, Giron-Michel J. IGF-1 contributes to the expansion of melanoma-initiating cells through an epithelial-mesenchymal transition process. *Oncotarget*. 2016; 7:82511- 82527.
26. Nagle AM, Levine KM, Tasdemir N, Scott JA, Burlbaugh K, Kehm J, Katz TA, Boone DN, Jacobsen BM, Atkinson JM, Oesterreich S. Loss of E-cadherin Enhances IGF1–IGF1R pathway activation and sensitizes breast cancers to anti-IGF1R/InsR inhibitors. *Clinical Cancer Research*. 2018; 24:5165-5177.
27. Playford MP, Bicknell D, Bodmer WF, Macaulay VM. Insulin-like growth factor 1 regulates the location, stability, and transcriptional activity of  $\beta$ -catenin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2000; 97:12103-12108.
28. Daulagala AC, Bridges MC, Kourtidis A. E-cadherin beyond structure: a signaling hub in colon homeostasis and disease. *International journal of molecular sciences*. 2019; 20:2756. 10.3390/ijms20112756
29. Kwak JM, Min BW, Lee JH, Choi JS, Lee SI, Park SS, Kim J, Um JW, Kim SH, Moon HY. The prognostic significance of E-cadherin and liver intestine-cadherin expression in colorectal cancer. *Diseases of the colon & rectum*. 2007; 50:1873-1880.
30. Repetto O, De Paoli P, De Re V, Canzonieri V, Cannizzaro R. Levels of soluble E-cadherin in breast, gastric, and colorectal cancers. *BioMed research international*. 2014;2014. <https://doi.org/10.1155/2014/408047>
31. Okugawa Y, Toiyama Y, Inoue Y, Iwata T, Fujikawa H, Saigusa S, Konishi N, Tanaka K, Uchida K, Kusunoki M. Clinical significance of serum soluble E-cadherin in colorectal carcinoma. *Journal of Surgical Research*. 2012;175: e67-73.
32. Suarez-Carmona M, Lesage J, Cataldo D, Gilles C. EMT and inflammation: inseparable actors of cancer progression. *Molecular oncology*. 2017; 11:805-823.
33. Schwarz S, Prokopchuk O, Esefeld K, Gröschel S, Bachmann J, Lorenzen S, Friess H, Halle M, Martignoni ME. The clinical picture of cachexia: a mosaic of different parameters (experience of 503 patients). *BMC cancer*. 2017; 17:1-10.
34. Elzagheid A, Buhmeida A, Laato M, EL-FAITORI OM, SyrjÄnen K, Collan Y, PyrhÖnen S. Loss of E-cadherin expression predicts disease recurrence and shorter survival in colorectal carcinoma. *Apmis*. 2012; 120:539-548.
35. Yun JA, Kim SH, Hong HK, Yun SH, Kim HC, Chun HK, Cho YB, Lee WY. Loss of E-Cadherin expression is associated with a poor prognosis in stage III colorectal cancer. *Oncology*. 2014; 86:318-328.
36. Cepowicz D, Zaręba K, Pryczynicz A, Dawidziuk T, Żurawska J, Hołody-Zaręba J, Gryko M, Kędra B. Blood serum levels of E-cadherin in patients with colorectal cancer. *Przegląd gastroenterologiczny*. 2017; 12:186-191.
37. D'Aloisio AA, Schroeder JC, North KE, Poole C, West SL, Travlos GS, Baird DD. IGF-I and IGFBP-3 polymorphisms in relation to circulating levels among African American and Caucasian women. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*. 2009; 18:954-966.
38. Winder T, Zhang W, Yang D, Ning Y, Bohanes P, Gerger A, Wilson PM, Pohl A, Mauro DJ, Langer C, Rowinsky EK. Germline polymorphisms in genes involved in the IGF1 pathway predict efficacy of cetuximab in wild-type KRAS mCRC patients. *Clinical Cancer Research*. 2010;16:5591-5602.
39. Dalamaga M, Diakopoulos KN, Mantzoros CS. The role of adiponectin in cancer: a review of current evidence. *Endocrine reviews*. 2012; 33:547-594.
40. Williams CJ, Mitsiades N, Sozopoulos E, Hsi A, Wolk A, Nifli AP, Tseleni-Balafouta S, Mantzoros CS. Adiponectin receptor expression is elevated in colorectal carcinomas but not in gastrointestinal stromal tumors. *Endocrine-related cancer*. 2008; 15:289-299.

41. Byeon JS, Jeong JY, Kim MJ, Lee SM, Nam WH, Myung SJ, Kim JG, Yang SK, Kim JH, Suh DJ. Adiponectin and adiponectin receptor in relation to colorectal cancer progression. *International journal of cancer*. 2010; 127:2758-2767.
42. Ohashi K, Parker JL, Ouchi N, Higuchi A, Vita JA, Gokce N, Pedersen AA, Kalthoff C, Tullin S, Sams A, Summer R. Adiponectin promotes macrophage polarization toward an anti-inflammatory phenotype. *Journal of Biological Chemistry*. 2010; 285:6153-6160.
43. Luo Y, Liu M. Adiponectin: a versatile player of innate immunity. *Journal of molecular cell biology*. 2016;8:120-128.
44. Balkwill F. TNF- $\alpha$  in promotion and progression of cancer. *Cancer and Metastasis Reviews*. 2006; 25:409-416.
45. Wang X, Lin Y. Tumor necrosis factor and cancer, buddies or foes? *Acta Pharmacologica Sinica*. 2008; 29:1275-1288.
46. Wang Y, Wang X, Lau WB, Yuan Y, Booth D, Li JJ, Scalia R, Preston K, Gao E, Koch W, Ma XL. Adiponectin inhibits tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced vascular inflammatory response via caveolin-mediated ceramidase recruitment and activation. *Circulation research*. 2014; 114:792-805.
47. Van Stijn CM, Kim J, Lusic AJ, Barish GD, Tangirala RK. Macrophage polarization phenotype regulates adiponectin receptor expression and adiponectin anti-inflammatory response. *The FASEB Journal*. 2015; 29:636-649.
48. Gialamas SP, Petridou ET, Tseleni-Balafouta S, Spyridopoulos TN, Matsoukis IL, Kondi-Pafiti A, Zografos G, Mantzoros CS. Serum adiponectin levels and tissue expression of adiponectin receptors are associated with risk, stage, and grade of colorectal cancer. *Metabolism*. 2011; 60:1530-1538.
49. Luo N, Chung BH, Wang X, Klein RL, Tang CK, Garvey WT, Fu Y. Enhanced adiponectin actions by overexpression of adiponectin receptor 1 in macrophages. *Atherosclerosis*. 2013; 228:124-135.
50. Ganapathi SK, Beggs AD, Hodgson SV, Kumar D. Expression and DNA methylation of TNF, IFNG and FOXP3 in colorectal cancer and their prognostic significance. *British journal of cancer*. 2014; 111:1581-1589.
51. Barth Jr RJ, Camp BJ, Martuscello TA, Dain BJ, Memoli VA. The cytokine microenvironment of human colon carcinoma: Lymphocyte expression of tumor necrosis factor- $\alpha$  and interleukin-4 predicts improved survival. *Cancer: Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society*. 1996; 78:1168-1178.
52. Al Obeed OA, Alkhayal KA, Al Sheikh A, Zubaidi AM, Vaali-Mohammed MA, Boushey R, Mckerrow JH, Abdulla MH. Increased expression of tumor necrosis factor- $\alpha$  is associated with advanced colorectal cancer stages. *World Journal of Gastroenterology: WJG*. 2014; 20:18390-18396.
53. De Simone V, Franze E, Ronchetti G, Colantoni A, Fantini MC, Di Fusco D, Sica GS, Sileri P, MacDonald TT, Pallone F, Monteleone G. Th17-type cytokines, IL-6 and TNF- $\alpha$  synergistically activate STAT3 and NF- $\kappa$ B to promote colorectal cancer cell growth. *Oncogene*. 2015;34:3493-3503.
54. Sugiyama M, Takahashi H, Hosono K, Endo H, Kato S, Yoneda K, Nozaki Y, Fujita K, Yoneda M, Wada K, Nakagama H. Adiponectin inhibits colorectal cancer cell growth through the AMPK/mTOR pathway. *International journal of oncology*. 2009; 34:339-344.
55. Divella R, Daniele A, Mazzocca A, Abbate I, Casamassima P, Caliandro C, Ruggeri E, Naglieri E, Sabbà C, De Luca R. ADIPOQ rs266729 G/C gene polymorphism and plasmatic adipocytokines connect metabolic syndrome to colorectal cancer. *Journal of Cancer*. 2017; 8:1000-1008.
56. Cox AJ, Lambird JE, Sandy An S, Register TC, Langefeld CD, Carr JJ, Freedman BI, Bowden DW. Variants in adiponectin signaling pathway genes show little association with subclinical CVD in the diabetes heart study. *Obesity*. 2013; 21:456-462.
57. Mandal RK, Khan MA, Hussain A, Akhter N, Jawed A, Dar SA, Wahid M, Panda AK, Lohani M, Mishra BN, Haque S. A trial sequential meta-analysis of TNF- $\alpha$ -308G> A (rs1800629) gene polymorphism and susceptibility to colorectal cancer. *Bioscience reports*. 2019;39. doi: 10.1042/BSR20181052
58. Yang G, Fan W, Luo B, Xu Z, Wang P, Tang S, Xu P, Yu M. Circulating resistin levels and risk of colorectal cancer: a meta-analysis. *BioMed research international*. 2016; 2016:1-11.

59. Song G, Wu X, Zhang P, Yu Y, Yang M, Jiao P, Wang N, Song H, Wu Y, Zhang X, Liu H. High-density lipoprotein inhibits ox-LDL-induced adipokine secretion by upregulating SR-BI expression and suppressing ER Stress pathway. *Scientific reports*. 2016; 6:1-11.
60. Acquarone E, Monacelli F, Borghi R, Nencioni A, Odetti P. Resistin: A reappraisal. *Mechanisms of ageing and development*. 2019; 178:46-63.
61. Lee S, Lee HC, Kwon YW, Lee SE, Cho Y, Kim J, Lee S, Kim JY, Lee J, Yang HM, Mook-Jung I. Adenylyl cyclase-associated protein 1 is a receptor for human resistin and mediates inflammatory actions of human monocytes. *Cell metabolism*. 2014; 19:484-497.
62. Hashemi M, Bahari G, Tabasi F, Moazeni-Roodi A, Ghavami S. Association between rs1862513 and rs3745367 genetic polymorphisms of resistin and risk of cancer: a meta-analysis. *Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP*. 2018; 19:2709-2716.
63. Xie S, Shen C, Zhou S, Xiong M, Tan M, Song X, Wang C. Role of adenylyl cyclase-associated protein 1 in cancers. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*. 2018; 11:3086-3099.
64. Zhang H, Zhou GL. CAP1 (cyclase-associated protein 1) exerts distinct functions in the proliferation and metastatic potential of breast cancer cells mediated by ERK. *Scientific Reports*. 2016; 6: 25933. doi: 10.1038/srep25933
65. Ghaemmaghami S, Mohaddes SM, Hedayati M, Mohammadi MG, Dehbashi G. Resistin and visfatin expression in HCT-116 colorectal cancer cell line. *International journal of molecular and cellular medicine*. 2013; 2:143-150.

#### **E. Objavljeni rezultati koji čine deo doktorske disertacije:**

1. **Mihajlovic M**, Gojkovic T, Vladimirov S, Miljkovic M, Stefanovic A, Vekic J, Zeljkovic D, Trifunovic B, Kotur-Stevuljevic J, Spasojevic-Kalimanovska V, Zeljkovic A. Changes in lecithin: cholesterol acyltransferase, cholesteryl ester transfer protein and paraoxonase-1 activities in patients with colorectal cancer. *Clinical Biochemistry*. 2019; 63:32-38; IF 2019: 2,573; rang časopisa M22 (12/29) u kategoriji *Medical Laboratory Technology*
2. **Mihajlovic M**, Ninic A, Sopic M, Miljkovic M, Stefanovic A, Vekic J, Spasojevic-Kalimanovska V, Zeljkovic D, Trifunovic B, Stjepanovic Z, Zeljkovic A. Association among resistin, adenylyl cyclase-associated protein 1 and high-density lipoprotein cholesterol in patients with colorectal cancer: a multi-marker approach, as a hallmark of innovative predictive, preventive, and personalized medicine. *EPMA Journal*. 2019; 10:307-316; IF 2019: 4,901; rang časopisa M21 (28/139) u kategoriji *Medicine, Research and Experimental*.
3. Zeljkovic A, **Mihajlovic M**, Stefanovic A, Zeljkovic D, Trifunovic B, Miljkovic M, Spasojevic-Kalimanovska V, Vekic J. Potential use of serum insulin-like growth factor 1 and E-cadherin as biomarkers of colorectal cancer. *Colorectal Disease*. 2020; 22:2078-86. IF 2020: 3,788; rang časopisa M21 (47/212) u kategoriji *Surgery*.
4. Zeljkovic A, Vekic J, **Mihajlovic M**, Gojkovic T, Vladimirov S, Zeljkovic D, Spasojevic-Kalimanovska V, Trifunovic B. Revealing the role of high-density lipoprotein in colorectal cancer. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021; 22:3352. IF 2020: 5,923; rang časopisa M21 (67/297) u kategoriji *Biochemistry and Molecular Biology*.

#### **F. Mišljenje i predlog**

Na osnovu svega izloženog smatramo da ova doktorska disertacija predstavlja originalni, značajni naučni doprinos za oblast medicinske biohemije. Istraživanje nezavisnog prediktivnog i

dijagnostičkog potencijala pojedinačnih, ali i kombinovanih biomarkera dislipidemije, inflamacije i imunološkog statusa predstavlja deo inovativnog multimarkerskog pristupa koji može da doprinese boljem razumevanju etiopatogeneze CRC, ali i da nađe primenu u rutinskoj laboratorijskoj dijagnostici. Rezultati ove doktorske disertacije su publikovani u četiri rada u međunarodnim časopisima kategorije M21 (tri rada) i M22. Stoga predlažemo Nastavno-naučnom Veću Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu da prihvati ovaj izveštaj i uputi ga Veću naučnih oblasti medicinskih nauka, radi dobijanja saglasnosti za javnu odbranu doktorske disertacije pod nazivom " Ispitivanje prediktivnog i dijagnostičkog značaja pojedinačnih i kombinovanih biomarkera lipidnog statusa i inflamacije kod pacijenata sa kolorektalnim karcinomom", kandidata magistra farmacije-medicinskog biohemičara Marije Mihajlović.

---

*dr Vesna Spasojević-Kalimanovska,*  
*redovni profesor u penziji*  
*Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu*

---

*dr Aleksandra Stefanović,*  
*vanredni profesor*  
*Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu*

---

*dr Ana Ninić,*  
*vanredni profesor*  
*Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu*

---

*dr Milan Jovanović,*  
*docent Medicinskog fakulteta Vojnomedicinske akademije Univerziteta odbrane*  
*u Beogradu*

Beograd 15.10.2021.