

UNIVERZITET U BEOGRADU  
MEDICINSKI FAKULTET

Jasna M. Bjelanović

Analiza prediktivnog značaja promena u metabolizmu  
sfingolipida kod pacijenata sa lokalno uznapredovalim  
karcinomom rektuma

doktorska disertacija

Beograd, 2026

UNIVERSITY OF BELGRADE  
FACULTY OF MEDICINE

Jasna M. Bjelanović

Analysis of the predictive significance of alterations  
in sphingolipid metabolism in patients with locally  
advanced rectal cancer

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2026

**MENTORI:**

**dr Goran Barišić, redovni profesor**

Klinika za digestivnu hirurgiju – Prva hirurška, Univerzitetski klinički centar Srbije

Univerzitet u Beogradu – Medicinski fakultet

**dr Sandra Dragičević, viši naučni saradnik**

Univerzitet u Beogradu – Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo

**ČLANOVI KOMISIJE:**

**dr Ana Savić- Radojević, redovni profesor**

Univerzitet u Beogradu – Medicinski fakultet

**dr Aleksandra Nikolić, naučni savetnik**

Univerzitet u Beogradu – Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo

**dr Tatjana Cvetković, redovni profesor**

Univerzitet u Nišu – Medicinski fakultet

Datum odbrane: \_\_\_\_\_

## ZAHVALNICA

Istraživanje predstavljeno u ovoj doktorskoj disertaciji nastalo je tokom realizacije strateškog projekta Srpske akademije nauka i umetnosti MOHERATEKA (broj granta F-69), koji je postavio konceptualne temelje ovog rada. Eksperimentalni deo istraživanja realizovan je u Centru za medicinsku biohemiju Univerzitetskog kliničkog centra Srbije, zatim u Institutu za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo (IMGGI), Univerziteta u Beogradu, kao i na Odeljenju za biohemiju Medicinskog fakulteta Univerziteta Akdeniz u Antaliji, Republika Turska.

Izražavam duboku zahvalnost svojim mentorima Prof. dr Goranu Barišiću i dr Sandri Dragičević na nesebičnom i stručnom vođenju, bezgraničnom strpljenju i ogromnoj pomoći tokom izrade ove doktorske disertacije.

Zahvalna sam, takođe, i članovima komisije: Prof. dr Ani Savić- Radojević, dr Aleksandri Nikolić i Prof. dr Tatjani Cvetković na svim korisnim savetima, primedbama i sugestijama.

Zahvalnost dugujem i kolegama Prve hirurške klinike i Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu, za velikodušnu pomoć tokom svih faza izrade disertacije, kao i dr Mutay Aslan i Odeljenju za biohemiju Medicinskog fakulteta Univerziteta Akdeniz u Antaliji, Republika Turska i COST akciji CA17118 –TRANSCOLONCAN, koji su omogućili prve korake eksperimentalnog rada i bili ključni za realizaciju ove teze.

Zahvaljujem se osoblju laboratorije Prve hirurške klinike za svaku pomoć u izradi teze, ali i na pažnji, blagosti i požrtvovanosti kroz godine zajedničkog rada.

Takođe se zahvaljujem koautorima radova koji su proizašli kao rezultat istraživanja u okviru ove doktorske disertacije, jer su učestvovali u:

1. kreiranju koncepta teze: Prof. dr Goran Barišić, dr Sandra Dragičević
2. prikupljanje podataka: Prof. dr Goran Barišić, dr Marko Miladinov, dr Mutay Aslan, dr Katarina Zeljić, dr Sandra Dragičević
3. analiza i interpretacija podataka: dr Mutay Aslan, dr Sandra Dragičević
4. statistička analiza: dr Katarina Zeljić, dr Sandra Dragičević, dr Sandra Dragičević
5. pisanju- originalni nacrt: dr Sandra Dragičević
6. pisanju- recenzija i uređivanje: Prof. dr Goran Barišić, dr Marko Miladinov, dr Mutay Aslan, dr Katarina Zeljić, dr Sandra Dragičević, dr Aleksandra Nikolić
7. superviziji: Prof. dr Goran Barišić, dr Sandra Dragičević
8. obezbeđivanju finansija: Prof. dr Goran Barišić, dr Aleksandra Nikolić

Posebno hvala posvećujem mentoru, koji više nije sa nama, a sigurna sam da bi danas bio ponosan, Prof. dr Zoranu Krivokapiću, na hrabrosti i poverenju da budem deo njegovog tima.

I najviše hvala mojoj porodici za podršku i ljubav.

# ANALIZA PREDIKTIVNOG ZNAČAJA PROMENA U METABOLIZMU SFINGOLIPIDA KOD PACIJENATA SA LOKALNO UZNAPREDOVALIM KARCINOMOM REKTUMA

## SAŽETAK

Promene u sfingolipidnom metabolizmu mogu doprineti razvoju, progresiji i terapijskom odgovoru karcinoma rektuma kroz regulaciju različitih bioloških procesa, uključujući apoptozu. Za održavanje ravnoteže između proapoptotskih i proliferativnih sfingolipida ključnu ulogu ima kisela ceramidaza (AC), koju kodira gen *ASAH1*. Ova studija je imala za cilj da ispita serumsku ekspresiju sfingolipida i AC, kao i njihovu povezanost sa apoptotskim statusom tumorskog tkiva i prediktivni potencijal za terapijski odgovor kod pacijenata sa lokalno uznapredovalim karcinomom rektuma (LARC). Nivo ceramida (CER) i sfingomijelina (SM) je analiziran u serumu 30 pacijenata sa LARC i 25 zdravih kontrola korišćenjem ultrafast tečne hromatografije u kombinaciji sa tandem masenom spektrometrijom. Apoptotski status parova tumorskog i netumorskog tkiva pacijenata procenjen je na osnovu odnosa ekspresije proapoptotskog gena *BAX* i antiapoptotskog gena *BCL2*, izmerenih pomoću metode reakcije lančanog umnožavanja u realnom vremenu. Pored toga, ekspresija *ASAH1* analizirana je u istim tkivnim uzorcima, dok je nivo AC u serumu meren ELISA testom. U serumu pacijenata su izmerene niže koncentracije ceramida i sfingomijelina, pri čemu su značajno bili smanjeni nivoi CER C18, CER C22 i CER C24, kao i SM C18 i SM C24 u poređenju sa kontrolama ( $p < 0,05$  za sve). U grupi pacijenata je uočena pozitivna korelacija između CER C20, CER C22 i CER C24 i odnosa *BAX/BCL2* ( $r = 0,619$ ,  $r = -0,694$  i  $r = 0,601$ , redom;  $p < 0,05$  za sve), dok je za AC pokazana negativna korelacija ( $r = -0,536$ ,  $p = 0,002$ ). Uočena je i smanjena ekspresija gena *ASAH1* u tumorskom u poređenju sa okolnim netumorskim tkivom, uz umerenu sposobnost razlikovanja ova dva tipa tkiva (AUC=0,652,  $p = 0,042$ ) i bez korelacije sa serumskim nivoom AC. Na osnovu odgovora na neoadjuvantnu hemioradioterapiju (nCRT) pacijenti su bili grupisani u one sa dobrim, umerenim i lošim odgovorom na terapiju. Međutim, ni za jedan analiziran parametar nije utvrđena povezanost sa odgovorom na nCRT. Rezultati ove studije ukazuju da smanjeni nivoi pojedinih ceramida i sfingomijelina u serumu mogu odražavati prisustvo karcinoma rektuma. Korelacija serumskih nivoa ceramida C20–C24 i AC sa apoptotskim statusom tumorskog tkiva ukazuje na mogućnost njihove upotrebe za indirektnu, neinvazivnu procenu apoptotske aktivnosti tumora, što bi trebalo dodatno istražiti. Za razjašnjenje značaja promena u metabolizmu sfingolipida u predikciji terapijskog odgovora neophodna su istraživanja na većem broju ispitanika, uz ujednačeniju zastupljenost pacijenata sa različitim odgovorima na terapiju.

**Ključne reči:** apoptoza, karcinom rektuma, kisela ceramidaza, neoadjuvantna hemioradioterapija, sfingolipidi

**Naučna oblast:** Medicina

**Uža naučna oblast:** Biologija tumora i oksidativna oboljenja

**UDK broj:** \_\_\_\_\_

# ANALYSIS OF THE PREDICTIVE SIGNIFICANCE OF ALTERATIONS IN SPHINGOLIPID METABOLISM IN PATIENTS WITH LOCALLY ADVANCED RECTAL CANCER

## ABSTRACT

Alterations in sphingolipid metabolism may contribute to the development, progression, and therapeutic response of rectal cancer by regulating various biological processes, including apoptosis. Acid ceramidase (AC), encoded by the *ASAH1* gene, plays a key role in maintaining the balance between pro-apoptotic and pro-proliferative sphingolipids. This study aimed to investigate serum sphingolipid and AC expression, their association with the apoptotic status of tumor tissue, and their predictive potential for response to therapy in patients with locally advanced rectal cancer (LARC). Ceramide (CER) and sphingomyelin (SM) levels were analyzed in the serum of 30 LARC patients and 25 healthy controls using ultrafast liquid chromatography combined with tandem mass spectrometry. The apoptotic status of paired tumor and non-tumor tissue from patients was assessed based on the ratio of the pro-apoptotic gene *BAX* to the anti-apoptotic gene *BCL2*, measured using real-time polymerase chain reaction. Additionally, *ASAH1* expression was analyzed in the same tissue samples, while serum AC levels were measured using ELISA assay. Lower concentrations of ceramide and sphingomyelins were showed in serum of patients, with significantly reduced levels of CER C18, CER C22, CER C24, as well as SM C18 and SM C24 compared to controls ( $p < 0.05$  for all). Within the patient group, a positive correlation was observed between CER C20, CER C22, and CER C24 and the *BAX/BCL2* ratio ( $r = 0.619$ ,  $r = -0.694$ , and  $r = 0.601$ , respectively;  $p < 0.05$  for all), whereas AC showed a negative correlation ( $r = -0.536$ ,  $p = 0.002$ ). *ASAH1* gene expression was reduced in tumor tissue compared to adjacent non-tumor tissue, demonstrating moderate discriminative ability between these tissue types ( $AUC = 0.652$ ,  $p = 0.042$ ) and showing no correlation with serum AC levels. Based on their response to neoadjuvant chemoradiotherapy (nCRT), patients were grouped into those with good, moderate, and poor responses to therapy. However, none of the analyzed parameters were associated with the response to nCRT. These findings suggest that reduced serum levels of specific ceramides and sphingomyelins may reflect the presence of rectal cancer. Correlation of serum ceramides C20–C24 and AC levels with the apoptotic status of tumor tissue indicates their potential use for indirect, non-invasive assessment of tumor apoptotic activity, which warrants further investigation. To clarify the significance of sphingolipid metabolism alterations in predicting therapeutic response, studies with larger patient cohorts and a more balanced representation of patients with different therapy responses are required.

**Keywords:** acid ceramidase, apoptosis, neoadjuvant chemoradiotherapy, rectal cancer, sphingolipids

**Scientific field:** Medicine

**Specialty:** Tumor Biology and Oxidative Diseases

**UDK number:** \_\_\_\_\_

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	1
<b>1.1 Kolorektalni karcinom (CRC)</b> .....	1
1.1.1 Epidemiologija CRC.....	1
1.1.2 Patogeneza CRC .....	1
1.1.3 Faktori rizika za nastanak CRC .....	3
1.1.4 Skrining CRC.....	5
1.1.5 Dijagnostika CRC.....	6
1.1.6 Terapija CRC.....	9
1.1.7 Biomarkeri u CRC.....	10
<b>1.2 Sfingolipidi</b> .....	12
1.2.1 Struktura i funkcija sfingolipida.....	12
1.2.2 Metabolizam sfingolipida.....	14
1.2.3 Ceramidi .....	15
1.2.4 Sfingomijelini .....	17
1.2.5 Enzimi sfingolipidnog metabolizma.....	17
1.2.6 Uloga sfingolipida u CRC .....	19
<b>2. CILJEVI</b> .....	21
<b>3. MATERIJAL I METODE</b> .....	22
3.1 Ispitanici .....	22
3.2 Uzorkovanje biološkog materijala .....	22
3.3 Laboratorijske analize krvi .....	23
3.4 Merenje nivoa sfingolipida u uzorcima seruma.....	23
3.5 Merenje kisle ceramidaze (AC) u uzorcima seruma .....	24
3.6 Analiza ekspresije gena metodom kvantitativne reakcije lančanog umnožavanja u realnom vremenu .....	24
3.7 Analiza javno dostupnih transkriptomskih podataka.....	25
3.8 Statistička obrada podataka .....	25
<b>4. REZULTATI</b> .....	27
4.1 Osnovne karakteristike ispitanika .....	27
4.2 Analiza ceramida i sfingomijelina u serumu ispitanika .....	30
4.2.1 Određivanje koncentracija ceramida i sfingomijelina u grupama ispitanika.....	30
4.2.2 Poređenje serumskih profila ceramida i sfingomijelina između grupa pacijenata i kontrola .....	31
4.2.3 Promene u nivou serumskih ceramida i sfingomijelina u grupi pacijenata nakon neoadjuvantne hemioradioterapije (nCRT).....	33
4.3 Analiza AC u serumu pacijenata .....	35
4.3.1 Određivanje koncentracije AC u serumu pacijenata .....	35
4.3.2 Povezanost nivoa AC sa nivoom ceramida u serumu pacijenata .....	35

<b>4.4 Analiza ekspresije gena <i>ASAH1</i> u tkivu pacijenata.....</b>	<b>35</b>
4.4.1 Određivanje nivoa ekspresije gena <i>ASAH1</i> u tkivima pacijanata .....	35
4.4.2 Promene u nivou ekspresije gena <i>ASAH1</i> u tkivima pacijenata nakon nCRT .....	37
4.4.3 Povezanost ekspresije gena <i>ASAH1</i> u tumorskom tkivu pacijenata sa nivoom AC u serumu .....	38
<b>4.5 Analiza povezanosti učesnika sfingolipidnog metabolizma sa kliničko-patološkim karakteristikama pacijenata.....</b>	<b>38</b>
4.5.1 Povezanost učesnika sfingolipidnog metabolizma sa tumor-markerima i inflamatornim parametrima pre terapije .....	38
4.5.2 Povezanost učesnika sfingolipidnog metabolizma sa karakteristikama tumora nakon nCRT .....	40
<b>4.6 Analiza apoptotskog statusa tkiva pacijenata.....</b>	<b>40</b>
4.6.1 Određivanje nivoa ekspresije gena <i>BAX</i> , <i>BCL2</i> i određivanje njihovog odnosa u tkivima pacijenata .....	40
4.6.2 Promene u ekspresiji gena <i>BAX</i> , <i>BCL2</i> i njihovog odnosa u tkivima pacijenta nakon nCRT .....	41
4.6.3 Povezanost učesnika sfingolipidnog metabolizma sa apoptotskim statusom tkiva pacijenata pre terapije .....	43
4.6.4 Povezanost apoptotskog statusa tumorskog tkiva pacijenata sa odgovorom na nCRT .....	44
<b>4.7 Analiza povezanosti učesnika sfingolipidnog metabolizma sa ishodima bolesti i lečenja .....</b>	<b>44</b>
4.7.1 Povezanost učesnika sfingolipidnog metabolizma sa preživljavanjem .....	44
4.7.2 Povezanost učesnika sfingolipidnog metabolizma sa odgovorom na nCRT.....	45
<b>5. DISKUSIJA .....</b>	<b>47</b>
<b>6. ZAKLJUČCI.....</b>	<b>54</b>
<b>7. LITERATURA .....</b>	<b>55</b>

## 1. UVOD

### 1.1 Kolorektalni karcinom (CRC)

#### 1.1.1 Epidemiologija CRC

Prema podacima Globalne opservatorije za rak (eng. *Global Cancer Observatory*, GLOBOCAN) za 2022. godinu, kolorektalni karcinom (eng. *colorectal cancer*, CRC) je treći po učestalosti, a drugi po smrtnosti od svih malignih bolesti u svetskoj populaciji. Za istu godinu broj novootkrivenih slučajeva CRC na globalnom nivou je iznosio približno 1,93 miliona (1). Na osnovu projekcija za 2025. godinu očekuje se povećanje na oko 2,06 miliona, a za 2040. godinu se predviđa gotovo 3 miliona novih slučajeva (<https://gco.iarc.fr/en>; pristupljeno 18.10.2025.).

Podaci Programa za praćenje, epidemiologiju i ishode lečenja (eng. *Surveillance, Epidemiology, and End Results Program*) za 2025. godinu govore o preciznijem broju dijagnostikovanih slučajeva CRC u Sjedinjenim američkim državama (SAD): 154.270 novoregistrovanih pacijenata (7,6 % svih maligniteta) i 52.900 umrlih (8,6 % svih umrlih od karcinoma). Zabrinjavajuća je i pretpostavka, na osnovu podataka od 2018. do 2021. godine da će otprilike 3,9% svih osoba u jednom trenutku oboleti od CRC (2). Slične podatke daje i Mreža za prevenciju kolorektalnog karcinoma (eng. *Colorectal Cancer Prevention Network*), Univerziteta Južne Karoline, da će 1 od 24 muškarca i 1 od 26 žena razviti rak debelog creva (<https://www.crcfacts.com/>; pristupljeno 18.10.2025.). Takođe, incidenca oboljevanja raste za 2,4 % kod osoba mlađih od 50 godina. Međutim, ohrabruje podatak da kod osoba starijih od 50 godina incidenca pada za oko 1% godišnje, što je svakako povezano sa razvojem i propagiranjem skrining programa najčešće kroz kolonoskopski pregled i imunohemijsku detekciju fekalnog okultnog krvarenja, dok se na novim i osetljivijim metodama kontinuirano radi (<https://colorectalcancer.org/basics/facts-and-statistics>; pristupljeno 18.10.2025.).

Izveštaji Instituta za javno zdravlje „Dr Milan Jovanović Batut“, ažurirani za 2022. godinu, navode da je u Srbiji CRC kod muškaraca drugi (14,3%), a kod žena treći (10,5%) vodeći uzrok oboljevanja od malignih bolesti. Za istu godinu prijavljenih novih slučajeva je 3.146 muškaraca i 2.053 žene. Standardizovane stope incidence su 97,3% (muškarci) i 60,1% (žene), a stope mortaliteta su najveće u uzrastu preko 70 godina i regionalno su više u severnim krajevima Srbije (<https://www.batut.org.rs/index.php?content=2096>; pristupljeno 18.10.2025.).

#### 1.1.2 Patogeneza CRC

Mukozu debelog creva karakteriše kontinuirana obnova, pri čemu je za očuvanje integriteta i funkcionalnosti epitela neophodna precizna i strogo kontrolisana regulacija proliferacije, diferencijacije, migracije i apoptoze ćelija. Hemostatska ravnoteža održava se putem kompleksnih signalnih puteva, a promene u genima koji kodiraju njihove komponente mogu dovesti do poremećaja ovih regulatornih mehanizama.

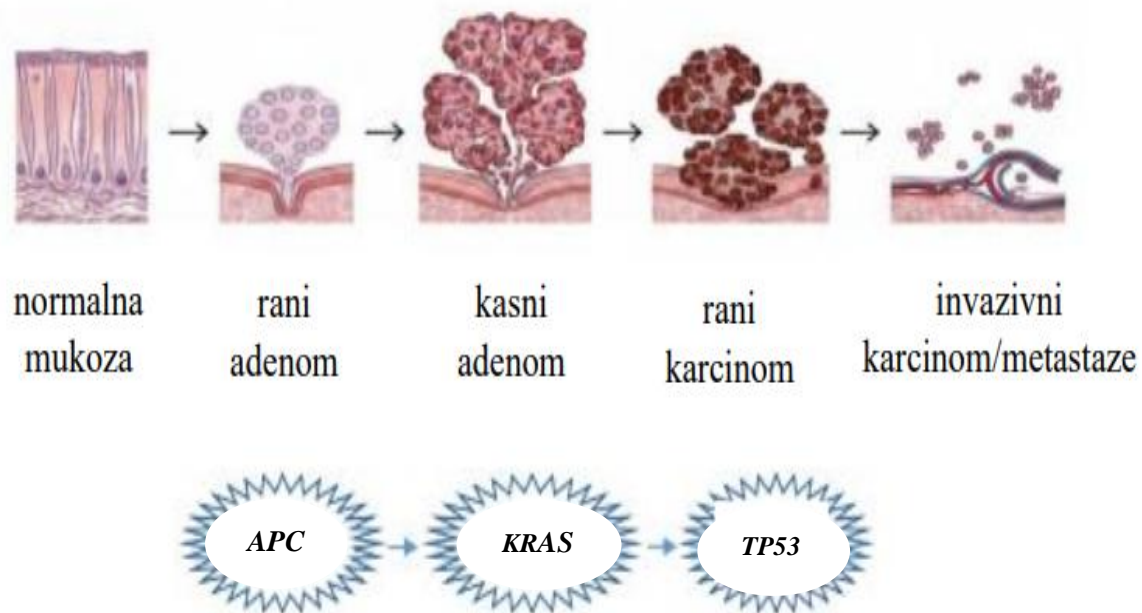
Kolorektalna karcinogeneza je kompleksan i postepen proces. Naučna saznanja ukazuju na to da se CRC tipično razvija kroz sekvencu adenom-karcinom, što podrazumeva promene od početnih aberantnih fokus kripti, preko adenomatoznih polipa, do maligno transformisanih ćelija. Seratni put predstavlja drugi mehanizam karcinogeneze, u okviru kojeg se CRC razvija od normalne sluznice preko hiperplastičnih polipa i sesilnih seratnih adenoma do karcinoma (3). Treći put je povezan sa hroničnom inflamacijom gde se CRC razvija polazeći od displazije, kakav je slučaj kod pacijenata sa inflamatornim bolestima creva (4).

Molekularni mehanizmi koji se nalaze u osnovi kolorektalne karcinogeneze, a koji se često međusobno preklapaju, su:

- 1) hromozomska nestabilnost (eng. *chromosomal instability*, CIN),
- 2) mikrosatelitska nestabilnost (eng. *microsatellite instability*, MSI), i

3) fenotip nastao metilacijom CpG ostrvaca (eng. *CpG island methylator phenotype, CIMP*) (5).

CIN je najčešći mehanizam nastanka CRC i prema opisu Fearon i Vogelstein-a predstavlja klasičan model kolorektalne karcinogeneze u kome se genetičke alteracije nagomilavaju određenim redosledom, a koje favorizuju nekontrolisan rast ćelija i prelazak benignih lezija u maligni oblik. CIN se javlja u većini slučajeva CRC (75–80%) i dominantno je u vezi sa adenom-karcinom sekvencom (Slika 1). Inaktivacija tumorsupresora *APC* je prvi događaj u ovom putu, reguliše početni prelazak ćelija iz adenoma u karcinom zbog čega je okarakterisan kao “čuvar ulaza”. Mutacija u onkogenu *KRAS* dalje dovodi do ubrzane i neregularne proliferacije ćelija, dok je mutacija u genu *TP53* kasni događaj u karcinogenezi, sa posledicom poremećene apoptoze transformisane ćelije i progresije adenoma do karcinoma (6, 7). Za razliku od adenom-karcinom sekvence, u inflamatornom putu mutacije u *TP53* genu se javljaju ranije, dok se mutacije u *APC* genu retko javljaju, i to u kasnijoj fazi karcinogeneze (4, 8).



**Slika 1. Proces kolorektalne karcinogeneze.** Pojednostavljen prikaz razvoja CRC kroz sekvencu adenom-karcinom, sa naznačenim genima u kojima se dešavaju mutacije određenim redosledom.

MSI predstavlja promene u dužini repetitivnih sekvenci DNK usled neispravnog mehanizma reparacije pogrešno sparenih baza (eng. *mismatch repair, MMR*). U humanom genomu identifikovano je približno 100.000 kratkih, repetitivnih sekvenci poznatih kao mikrosateliti. Uloga MMR sistema ogleda se u prepoznavanju i korekciji grešaka pri uparivanju nukleotida tokom procesa rekombinacije i replikacije DNK. Mutacijom u nekim od gena koji kodiraju proteine odgovorne za reparaciju (*MLH1, MSH2, MSH6* i *PMS2*), dolazi do deficita MMR sistema (eng. *deficient mismatch repair – dMMR*), što rezultira akumulacijom mutacija u molekulu DNK (9). Ovakvo stanje dovodi do stanja hipermutabilnosti, čime se značajno povećava rizik od maligne transformacije ćelija. Germinativne mutacije u MMR genima predstavljaju molekularnu osnovu Lynch sindroma, a koji nosi povećan rizik za razvoj naslednog nepolipoznog CRC (eng. *hereditary nonpolyposis CRC*). U sporadičnim slučajevima (10-12%), MSI se javlja kao posledica hipermetilacije ili dvostruke mutacije MMR gena (10).

CIMP predstavlja epigenetički mehanizam koji se pretežno ogleda u hipermetilaciji gena *MLH1*, *MINT1*, *CACNA1G* i *CDKN2A*. U seratnom putu CIMP je drugi događaj, dok je mutacija onkogena *BRAF* prvi. Oko 20% sporadičnih slučajeva nastalih ovim mehanizmom se karakteriše hipermetilacijom *MLH1* gena (11).

CRC se anatomski može definisati u 2 odvojena patofiziološka entiteta: karcinom kolona i karcinom rektuma. S obzirom na njihovo različito embrionalno poreklo, različite funkcije koje ovi delovi debelog creva imaju, kao i lokaciju rektuma u karličnom prostoru i odnosa sa organima i funkcijama urogenitalnog sistema, rektum se može posmatrati kao posebna celina (12). Stoga i ne čudi što se poslednjih nekoliko godina ovaj završni deo debelog creva, koji anatomski povezuje sigmoidini kolon i analni kanal, posmatra dijagnostički i terapijski kao zaseban organ. Histološki, 95% svih karcinoma rektuma su adenokarcinomi, dok ostalo mogu biti neuroendokrini tumori, limfomi, skvamocelularni tumori, sarkomi i drugi (13).

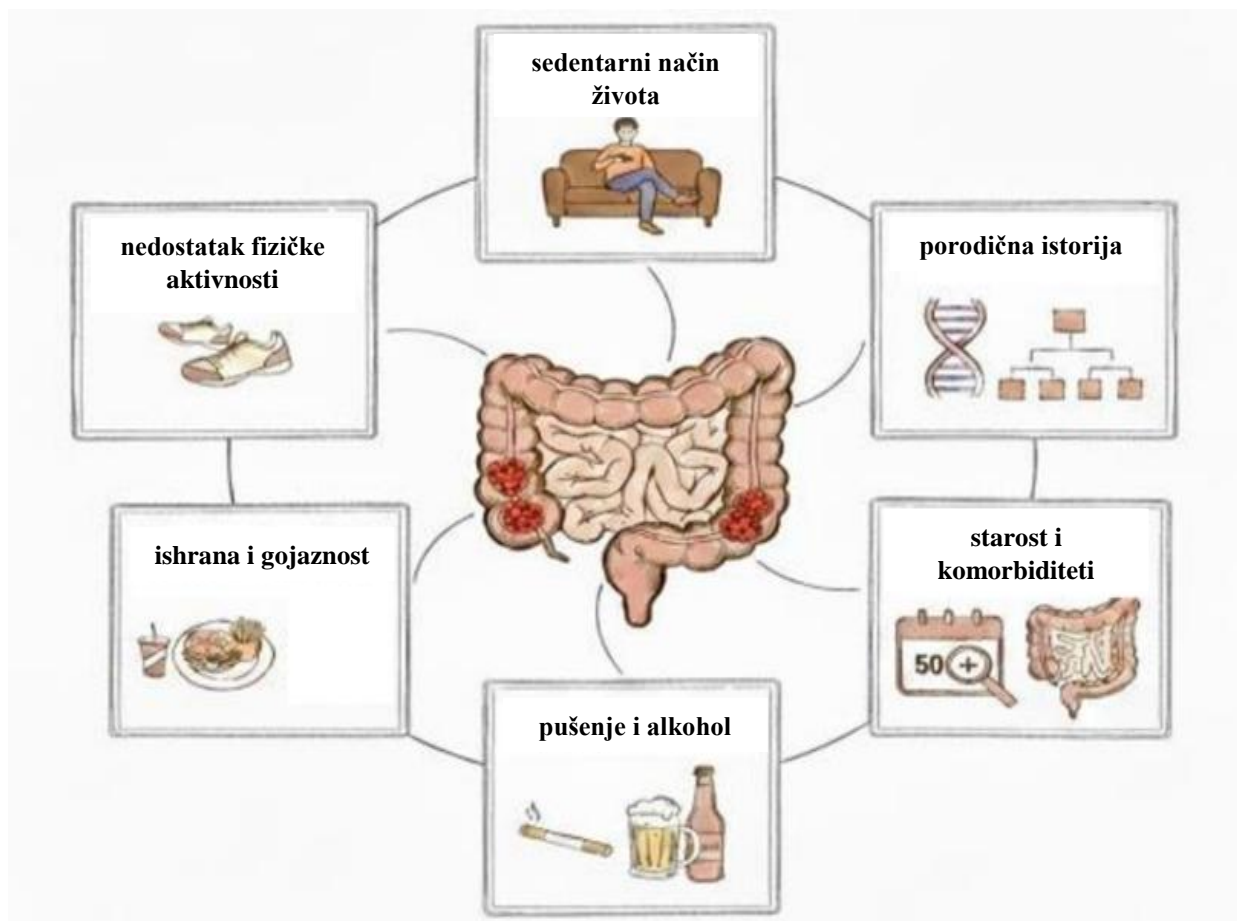
### 1.1.3 Faktori rizika za nastanak CRC

Faktori rizika za nastanak CRC su brojni i najčešće se dele na:

- nasledne, kod kojih se osim pozitivne porodične anamneze, opisuju i germinativne mutacije odgovorne za razvoj naslednog polipoznog i nepolipoznog oblika CRC, i.
- stečene, koji se opisuju kroz nezdrave životne navike, ali i prisustvo komorbiditeta i posledica ranijih lečenja (14).

Takođe, prigodna je i podela na faktore (Slika 2):

- koji se ne mogu kontrolisati – starost, pol, inflamatorne bolesti creva i nasledna predispozicija, i
- koji se mogu kontrolisati – gojaznost, pušenje, konzumiranje alkohola, sedentarni način života.



**Slika 2. Faktori rizika za nastanak CRC.** Prikaz faktora na koje se ne može uticati i životnih navika koji povećavaju rizik od razvoja bolesti.

Rizik od nastanka CRC se povećava sa starošću i većina bolesnika su stariji od 50 godina. Statistika pokazuje i da muškarci stariji od 50 godina češće oboljevaju od CRC. Prema podacima GLOBOCAN za 2022. godinu incidenca oboljevanja standardizovana prema godinama je 23,4 prema 16,2 na 100.000 za muškarce, odnosno za žene, a mortaliteta 11 prema 7,2 na 100.000 (1). Razlike u incidencama između polova mogu imati veze sa hormonskim statusom, iako su rezultati studija nedovoljno jasni. I kod žena i kod muškaraca nivoi estrogena, odnosno testosterona i proteina SHBG koji se vezuje za polne hormone (eng. *sex hormone binding protein*) negativno korelišu sa rizikom od nastanka CRC (15). Međutim, meta-analiza koja je obuhvatila 8 velikih studija nije potvrdila ove argumente i moguće da je odnos estrogena i testosterona (E/T) kod oba pola značajniji od nivoa pojedinačnih hormona (16). Osobe sa pozitivnom porodičnom anamnezom se nalaze od 2 do 4 puta većim rizikom oboljevanja u odnosu na osobe koje u porodici nemaju istoriju karcinoma debelog creva (17). Kod Lynch sindroma, zbog mutacija u *MHL1* genu šanse za razvoj nepolipoznog CRC pre 70. godine je 50%. Kod familijarne adenomatozne polipoze (eng. *familial adenomatous polyposis*, FAP), zbog prisutne mutacija u *APC* genu, osobe u ranoj mladosti razvijaju na stotine polipa u kolonu, sa velikom verovatnoćom da se CRC razvije pre 35 godine (18). Osobe sa inflamatornim bolestima crevnog trakta poput ulceroznog kolitisa i Kronove bolesti, su takođe pod povećanim rizikom od razvoja CRC usled hronične inflamacije crevnog trakta (8).

U grupi faktora podložnih uticaju važan deo pripada ishrani. Istraživanja u polju životnih navika i veza sa nastankom CRC pokazuju kontradiktorne podatke. Brojne studije su se bavile navikama u ishrani, u smislu konzumiranja većih količina hrane bogate vlaknima (voće, povrće, semenke, orašasti plodovi i integralne žitarice), uz pretpostavku da antioksidativni vitamini (vitamini C i E, i  $\beta$ - karoten), folna kiselina, mikronutrijenti, flavonoidi mogu imati protektivnu ulogu (19).

Dve velike randomizirane kohortne studije u SAD i nisu našle vezu sa ovakvim načinom ishrane i rizikom od CRC (20, 21). Proučavajući rezultate meta-analize kineskih istraživača, dobijene korišćenjem ključnih izraza “colorectal cancer” i “dietary fiber”, sagledava se 18 velikih studija u celom svetu u periodu od 2019. do 2023.godine. Zaključak ove analize je da, iako ima brojnih kontradiktornosti, većina studija pokazuje značajnu korelaciju između visokog unosa vlakana i smanjenja rizika od CRC (22). Dijete bogate mastima svakako dovode do povećanja rizika od CRC ili direktno ili uzrokovanjem prekomerne težine i gojaznosti. Naime, hronična inflamacija niskog inzenziteta, insulinska rezistencija, hormonski disbalans i poremećena crevna mikrobiota, sve obeležja gojaznosti, poznati su faktori rizika za nastanak maligne transformacije mukoze debelog creva. Ovakav način ishrane pojačava sekreciju žučnih kiselina koje u povećanoj količini dospevaju do kolona zbog emulgovanja masti, a žučne kiseline kao što je dezoksiholna, na primer, poznate su kao karcinogene supstance. Nasuprot ovome, zna se i da neke masti deluju protektivno, kao što su omega-3 polinezasićene masne kiseline zbog svojih antiinflamatornih karakteristika. Zasićene masti, kontraverzno, promovišu rizik, ali i štite sluznicu kolona povećavajući produkciju mucina, što su potvrdili eksperimenti na životinjama (23-25).

Pušenje je dobro proučen faktor rizika, ne samo za CRC, i opisano je bar 70 poznatih karcinogena, kao što su nitrozamini, heterociklični amini, policiklični aromatični ugljovodonici, benzen i drugi (26). Onkogeno delovanje ovih supstanci ostvaruje se direktnim uništenjem kroz epitel ili putem cirkulacije do ciljnog tkiva. Istraživanja pokazuju da pušači imaju veću verovatnoću za pojavu mutacija *KRAS* i *BRAF* gena, kao i za razvoj MSI, u poređenju sa nepušačima (27).

Velika meta-analiza ukazala je na postojanje jasne povezanosti između konzumiranja alkohola i nastanka karcinoma kolona i rektuma (28). Mehanizmi kojim alkoholizam doprinosi povećanom riziku od oboljevanja još uvek nisu u potpunosti razjašnjeni i predstavljaju predmet savremenih istraživanja. Smatra se da metabolit acetaldehid negativno utiče na procese replikacije i reparacije oštećene DNK (29).

Smanjena fizička aktivnost predstavlja važan faktor rizika za CRC, iako je često povezana sa gojaznošću i drugim metaboličkim poremećajima (30). Redovno vežbanje ubrzava intestinalni tranzit, smanjuje kontakt sluzokože sa karcinogenim supstancama, pomaže u redukciji visceralne masti i snižava nivo insulina, čime ograničava inicijaciju i progresiju tumorskog rasta (31, 32). Takođe poboljšava imunološku funkciju, insulinsku osetljivost i smanjuje sistemsku inflamaciju, pružajući zaštitu od nastanka i razvoja bolesti. Dugotrajna neaktivnost može dovesti do metaboličkih poremećaja i narušene lokalne imunološke odbrane, stvarajući povoljne uslove za malignitet (33).

#### 1.1.4 Skrining CRC

Skrining program predstavlja termin koji se odnosi na uobičajene procedure za rano otkrivanje raka u zdravoj populaciji. Ciljevi ovakvih preventivnog delovanja je detektovanje tumora u ranoj fazi i na taj način povećavanja šansi za izlečenje i smanjenje broja smrtnih ishoda.

Poslednji vodiči Američke radne grupe za preventivne usluge (eng. *US Preventive Services Task Force*) za 2021. godinu potvrđuju značaj ovakvih testiranja, najviše u populaciji od 45 do 75 godina. Ova testiranja obuhvataju analizu uzoraka stolice, koji se sprovode jednom godišnje, direktan pregled crevne sluznice svakih 5 do 10 godina metodama kolonoskopije, kolonografije pomoću kompjuterizovane tomografije (eng. *computed tomography*, CT), fleksibilne sigmoidoskopije, kao i kombinacije fleksibilne sigmoidoskopije i imunohemijskog testa iz uzorka stolice (34). Slična uputstva daje Nacionalna sveobuhvatna mreža za rak (eng. *National Comprehensive Cancer Network*) iz 2024. godine sa detaljnim uputstvima i objašnjenjima opštoj populaciji o patogenezi i simptomima bolesti (<https://www.nccn.org/>; pristupljeno 18.10.2025.).

Kancelarija za skrining raka u Srbiji je sproveda dva ciklusa nacionalnog programa organizovanog testiranja ciljne populacije od 50 do 74 godine. Prvi korak u testiranju bio je pregled uzoraka stolice, nakon čega su svi ispitanici sa pozitivnim rezultatom upućeni na kolonoskopiju, dok

su oni sa negativnim rezultatom ponovo testirani nakon dve godine. Osobe sa pozitivnim nalazom kolonoskopije su procesuirani dalje po protokolu. Od ukupnog broja urađenih kolonoskopija, kod osoba bez ikakvih simptoma bolesti, dijagnoza CRC je potvrđena kod 8,3 za period od 2013. do 2014., i 7,4% za period od 2015. do 2016. (13, 35).

Testovi iz uzoraka stolice imaju za cilj otkrivanje, ranu dijagnostiku i povećanje izgleda za izlječenje pacijenata sa karcinomom debelog creva, a kako su ovakva testiranja neinvazivna i prihvatljivija za pacijente danas imaju sve veću primenu.

Test na okultno krvarenje u stolici (eng. *fecal occult blood test*, FOBT) je jedan od najstarijih testova za otkrivanje prisustva krvi u stolici. Zasniva se na detekciji dela molekula hemoglobina preko pseudoperoksidazne aktivnosti hema, koji katalizuje oslobađanje kiseonika iz vodonik peroksida, pa se oksidacijom određenog hromogena detektuje pojava boje na test polju (36). Test je nespecifičan za kolon, a zahteva i pripremu pacijenata kao što je izbegavanje nesteroidnih antiinflamatornih lekova i antikoagulanasa, određene hrane koja sadrži visok procenat peroksidaze zbog mogućih lažno pozitivnih rezultata, kao i visokih doza vitamina C, koji može dovesti do lažno negativnih interpretacija testa (37, 38).

Fekalni imunohemijski testovi (eng. *fecal immunochemical test*, FIT) detektuju globinski deo molekula hemoglobina. Ovaj način testiranja omogućava veću specifičnost za kolon, jer se globin, oslobođen u gornjem delu digestivnog trakta, hidrolizuje proteolitičkim enzimima u crevima i ne detektuje se u stolici. Takođe, ovo testiranje ne zahteva dijetarni postupak pripreme pacijenta (39).

Postoje i testovi koji detektuju porfirinski deo molekula hema metodom spektrofotometrije i specifičniji su za krvarenja u tankom crevu (40). Jedna od novijih metoda je matricom potpomognuta laserska desorpcija/ionizacija sa masenom spektrometrijom (eng. *matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight-mass spectrometry*), kojom se detektuju  $\alpha$ - i  $\beta$ -globinski lanci hemoglobina. Metoda je višestruko osetljivija od FOBT i FIT, ali je neprikladna za skrining zbog komplikovane opreme i visoke cene (41).

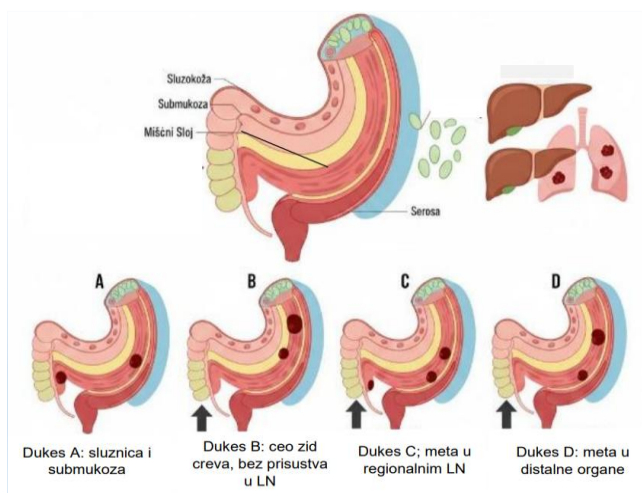
U SAD je tokom 2014. godine Uprava za hranu i lekove (eng. *Food and Drug Administration*, FDA) odobrila sDNA-FIT test koji obuhvata 11 biomarkera, i to: 7 tačkastih mutacija gena *KRAS*, 2 metilaciona markera *NDRG4* i *BMP3* gena,  $\beta$ -aktin kao DNK kvantitativnu kontrolu i FIT test (42). Značajnost ovog testa ispitana je u studiji koja je obuhvatila skoro 10.000 ispitanika i dobijena je osetljivost ovog kombinovanog testa od 92,3% za CRC i 42,4% za premaligne lezije. Specifičnost je bila, takođe, značajna i iznosila je 89,8%, a očekivano je bilo više lažno pozitivnih rezultata nego primenom samog FIT testa (43).

### 1.1.5 Dijagnostika CRC

Iako su testovi iz uzoraka stolice jeftiniji i mogu se automatizovati, što povećava objektivnost rezultata i efikasnost svih faza laboratorijskog procesa, kolonoskopija je i dalje zlatni standard u detekciji i dijagnostici CRC. Ova procedura podrazumeva endoskopski pregled creva i biopsiju vizuelno izmenjenih delova sluznice, čime se omogućava definitivna histopatološka potvrda. Osim u dijagnostičke svrhe, kolonoskopija može biti i terapijska intervencija, jer se određeni polipi mogu ukloniti ovakvom procedurom, a mogu se dilatirati stenozе određenog stepena i zaustaviti krvarenja iz manjih krvarećih lezija mukoze (44). Ova metoda je skupa, invazivna, nosi rizik perforacije creva, sindroma polipektomije, krvarenja, povrede slezine, kao i eventualne neželjene događaje anestezije, ukoliko se radi u sedaciji, ali je benefit za pacijenta nemerljiv i za sada nijedna druga metoda nema toliki klinički značaj.

Inicijalna faza nakon potvrde maligniteta obuhvata precizno kliničko određivanje stadijuma (eng. *staging*) primenom radioloških metoda, prvenstveno CT, magnetne rezonance (eng. *magnetic resonance imaging*, MRI) i endorektalne ultrasonografije (ERUS), radi evaluacije lokalne proširenosti i detekcije sekundarnih depozita (45).

Jedan od najranijih sistema za određivanje stadijuma CRC, a koji se zasniva na proceni dubine infiltracije tumora u zidu creva i zahvaćenosti regionalnih limfnih čvorova, je Dukesova klasifikacija (Slika 3). Prema ovoj klasifikaciji stadijum A obuhvata tumore ograničene na sluznicu i submukozu, stadijum B tumore koji zahvataju čitav zid creva bez metastaza u limfnim čvorovima, dok stadijum C podrazumeva prisustvo metastaza u regionalnim limfnim čvorovima. U kasnijim modifikacijama uveden je i stadijum D, koji označava udaljene metastaze (46).



**Slika 3. Klasifikacija stadijuma CRC prema Dukes-u.** Prikaz širenja tumora kroz zid creva i limfne čvorove.

Danas se prema vodiču Američkog udruženog komiteta za rak (eng. *American Joint Committee on Cancer, AJCC*) u kliničkoj praksi stepen uznapredovalosti tumora opisuje pomoću TNM sistema (eng. *tumor, node, metastasis, TNM*) koji je prikazan u Tabeli 1. Stadijum T predstavlja tumorski stadijum i opisuje veličinu i lokalnu proširenost primarnog tumora. Stadijum N je limfonodalni stadijum i odnosi se na prisustvo, odnosno odsustvo tumorskih ćelija u regionalnim limfnim čvorovima, a stadijum M ili metastatski stadijum se odnosi na širenje metastaza na udaljene organe (47).

**Tabela 1. TNM sistem klasifikacije**

Stadijum	Karakteristika
<b>T</b>	
TX	Prisustvo tumora ne može biti procenjeno
T0	Odsustvo primarnog tumora
Tis	Karcinom <i>in-situ</i> ; tumorske ćelije se nalaze u unutrašnjem sloju mukoze
T1	Tumor zahvata submukozu
T2	Tumor zahvata spoljašnji deo mišićnog sloja ( <i>muscularis propria</i> )
T3	Tumor prolazi kroz mišićni sloj i zahvata serozu ( <i>visceralni peritoneum</i> ) i okolno masno tkivo
T4a	Tumor prodire kroz <i>visceralni peritoneum</i>
T4b	Tumor prodire u obliženje organe
<b>N</b>	
Nx	Prisustvo metastaza u limfnim čvorovima ne može biti procenjeno
N0	Bez metastaza u regionalnim limfnim čvorovima
N1a	Metastaze u 1 regionalnom limfnom čvoru
N1b	Metastaze u 2–3 regionalna limfna čvora
N1c	Depoziti u mezenterijumu, nema metastaza u regionalnim limfnim čvorovima
N2a	Metastaze u 4-6 limfnih čvorova
N2b	Metastaze u više od 7 limfnih čvorova
<b>M</b>	
Mx	Prisustvo metastaza ne može biti procenjeno
M0	Bez udaljenih metastaza
M1a	Metastaza u 1 udaljenom organu
M1b	Metastaze u više udaljenih organa
M1c	Peritonealne metastaze sa ili bez metastaza u druge organe

TNM – tumor, node, metastasis

Ukupni TNM stadijum predstavlja ključni prognostički faktor nezavisno od primenjene terapije, i na osnovu njega se pacijenti svrstavaju u odgovarajuće kliničke i prognostičke kategorije (48). Prema TNM klasifikaciji, stadijumi bolesti se opisno definišu na sledeći način:

- Stadijum 0 (Tis N0 M0) – karcinom in situ, ograničen isključivo na sluznicu creva;
- Stadijum I (T1–T2 N0 M0) – tumor zahvata submukozu ili mišićni sloj crevnog zida, bez zahvaćenosti limfnih čvorova i bez udaljenih metastaza,
- Stadijum II – lokalno uznapredovala bolest bez metastaza u limfnim čvorovima:
  - IIA (T3 N0 M0) – tumor prodire kroz mišićni sloj u perikolorektalno tkivo
  - IIB (T4a N0 M0) – tumor zahvata serozu, odnosno peritoneum
  - IIC (T4b N0 M0) – tumor invadira susedne organe ili strukture,
- Stadijum III – prisustvo metastaza u regionalnim limfnim čvorovima, bez udaljenih metastaza:
  - IIIA (T1–T2 N1/N1c M0 ili T1 N2a M0) – površinski tumor sa ograničenim zahvatanjem limfnih čvorova;
  - IIIB (T3–T4a N1/N1c M0 ili T2–T3 N2a M0 ili T1–T2 N2b M0) – lokalno uznapredovali tumor sa većim brojem zahvaćenih limfnih čvorova;
  - IIIC (T4a N2a M0, T3–T4a N2b M0, T4b N1–N2 M0) – invazivan tumor uz značajno zahvaćenje limfnih čvorova, i
- Stadijum IV – prisustvo udaljenih metastaza:
  - IVA (Bilo koji T, bilo koji N, M1a) – metastaza u jednom udaljenom organu
  - IVB (Bilo koji T, bilo koji N, M1b) – metastaze u dva ili više udaljenih organa
  - IVC (Bilo koji T, bilo koji N, M1c) – peritonealne metastaze, sa ili bez metastaza u drugim organima.

Pored ukupnog stadijuma bolesti, nezavisni prognostički faktori koji daju dodatnu informaciju o ishodu bolesti uključuju rezidualni status tumora (R kategorija), prisustvo tumorskih depozita (TD), pupljenje tumora (eng. *tumor budding*), limfovaskularnu (L), vensku (V) i perineuralnu (PN) invaziju (49, 50).

### 1.1.6 Terapija CRC

Klinički tok CRC razlikuje se u zavisnosti od lokalizacije tumora, pri čemu je karcinom rektuma generalno povezan sa lošijim preživljavanjem bez relapsa u poređenju sa karcinomom kolona (51). Terapijska strategija CRC zavisi od stadijuma bolesti u trenutku dijagnoze, lokalizacije tumora, kao i od opšteg zdravstvenog stanja pacijenta. Osnovu lečenja čine hirurško odstranjivanje tumorskog tkiva i primena hemioraditerapije. Kod uznapredovalih tumora koji infiltriraju okolna tkiva, hirurška intervencija, ukoliko je izvodljiva, predstavlja poseban izazov, te se pacijenti pre operacije najčešće podvrgavaju zračenju i/ili hemioterapiji. Ovakav terapijski pristup pre hirurškog zahvata se naziva neoadjuvantna terapija i ima za cilj smanjenje stadijuma i veličine tumora pre operacije, odnosno, u slučajevima dobrog terapijskog odgovora, mogućnost potpunog izbegavanja hirurške intervencije. Terapija koja se primenjuje nakon operacije naziva se adjuvantna i ima za cilj eliminaciju preostalih tumorskih ćelija i prevenciju recidiva bolesti.

Hemioterapija se pre svega zasniva na primeni 5-fluorouracila (5-FU) u kombinaciji sa leukovorinom (folnom kiselinom). U ćeliji, se 5-FU metaboliše u više aktivnih metabolita koji ometaju metabolizam nukleotida, naročito sintezu timidina, putem inhibicije enzima timidilat sintaze. Pored toga, 5-FU može da se ugradi u RNK molekule, čime se narušava proces sinteze proteina. Leukovorin pojačava antitumorski efekat 5-FU (52). U standardnim terapijskim režimima takođe se koriste oksaliplatin i irinotekan, dok se kod metastatske bolesti primenjuju i odobreni biološki agensi, poput bevacizumaba i cetuksimaba (53-57). Oksaliplatin deluje tako što interferira sa strukturom DNK, dok irinotekan inhibira enzim topoizomerazu I, čime se remete procesi DNK replikacije i transkripcije, što na kraju dovodi do apoptoze ćelija (58, 59). Bevacizumab je monoklonsko antitelo koje se primenjuje u kombinaciji sa standardnim hemioterapijskim režimima. Vezuje se direktno za

vaskularni endotelni faktor rasta (eng. *vascular endothelial growth factor*, VEGF) čime inhibira angiogenezu u tumorskom tkivu, dok se cetiksumab vezuje za receptor za epidermalni faktor rasta (eng. *epithelial growth factor receptor*, EGFR) i proliferaciju i diferencijaciju ćelija (60).

Oko 30% svih slučajeva CRC su pacijenati sa karcinomom rektuma, a među njima 45% ima lokalno uznapredovalu bolest (61, 62). Tumori stadijuma II i III svrstavaju se u lokalno uznapredovali rektalni karcinom (eng. *locally advanced rectal cancer*, LARC) odnosno obuhvataju pacijente sa tumorima klasifikacije T3 ili T4 bez infiltracije u limfne čvorove, kao i pacijente sa bilo kojim T stadijumom uz prisutnu infiltraciju regionalnih limfnih čvorova, ali bez udaljenih metastaza. Za pacijente sa LARC visoko rizične karakteristike uključuju T3 tumore sa mezorektalnom invazijom od 5 mm ili više, zahvaćene karlične limfne čvorove, T4 stadijum bolesti, prisustvo ekstramuralne vaskularne invazije, kao i druge nepovoljne faktore (63). Dok se rani stadijum karcinoma rektuma često leči isključivo hirurškim putem, LARC najčešće zahteva multimodalni terapijski pristup, koji podrazumeva primenu neoadjuvantne hemioradioterapije (eng. *neoadjuvant chemoradiotherapy*, nCRT), nakon čega sledi hirurška resekcija tumorskog tkiva (64).

Za procenu odgovora na terapiju se koristi Mandardov sistem kojim se određuje stepen tumorske regresije (eng. *tumor regression grade*, TRG) i obuhvata 5 sledećih kategorija (65):

TRG 1 – kompletna regresija (odsustvo rezidualnog tumora),

TRG 2 – približno kompletna regresija (retke rezidue tumorskih ćelija),

TRG 3 – umerena regresija (znatne rezidue tumora),

TRG 4 – minimalna regresija (dominantne rezidue tumora), i

TRG 5 – bez regresije (bez vidljivih znakova regresije tumora).

Međutim, odgovor na neoadjuvantnu terapiju je izrazito varijabilan, pri čemu samo oko 20% pacijenata postiže potpun patohistološki odgovor (66). Pored toga, sistemska inflamacija ima značajnu ulogu u progresiji malignih bolesti i razvoju rezistencije na terapiju, što dodatno komplikuje ishode lečenja (4). U tom kontekstu, savremena istraživanja usmerena su na identifikaciju pouzdanih molekularnih biomarkera koji bi omogućili stratifikaciju pacijenata na one kod kojih bi nCRT bila efikasna i one kod kojih bi izostao adekvatan terapijski odgovor, čime bi se doprinelo optimalnom izboru terapijskog režima.

### **1.1.7 Biomarkeri u CRC**

Radna grupa nacionalnih instituta za zdravlje (eng. *NIH Biomarkers Working Group*) je 1998. godine definisala biomarkere kao “karakteristike koje se objektivno mere i procenjuju kao indikatori biološkog procesa, patološkog procesa ili farmakološkog odgovora na terapijsku intervenciju” (67). Do danas se ova definicija praktično nije menjala i oni jesu objektivni, merljivi pokazatelji metaboličkog stanja organizma. Idealan biomarker trebalo bi da bude osetljiv i specifičan, precizan i pouzdan, reproducibilan i jednostavan za izvođenje. Takođe, neinvazivne ili minimalno invazivne metode uzorkovanja uvek su prihvatljivije za pacijente.

Biomarkeri imaju važnu i sve značajniju ulogu u savremenom pristupu CRC, ali ipak ne predstavljaju najvažniji niti samostalan element dijagnostičkog sistema. Najviši dijagnostički značaj i dalje imaju klinička procena, endoskopske metode, histopatološka analiza i radiološke tehnike, dok se biomarkeri koriste kao snažan komplementarni alat koji unapređuje preciznost i personalizaciju lečenja. Iako njihova ograničena senzitivnost i specifičnost, naročito u ranim stadijumima bolesti, onemogućava njihovu upotrebu kao jedinog dijagnostičkog alata, biomarkeri su od izuzetnog značaja za procenu rizika od bolesti, skrining, ranu detekciju, postavljanje dijagnoze, određivanje stadijuma bolesti i procenu prognoze CRC i odgovora na terapiju (67). Mogu se grupisati na različite načine, od uloge u fiziološkom i/ili patofiziološkom procesu do vrste biološkog materijala iz kojih se mogu određivati (tumorsko tkivo, krv i stolica), a neretko se ove grupe i preklapaju.

Antecedentni biomarkeri podrazumevaju one koji se koriste za procenu rizika od nastanka bolesti, i to najčešće kod osoba sa pozitivnom porodičnom anamnezom. Za oko 2-8 % CRC odgovorni su nasledni sindromi, kao što su Lynch sindrom ili FAP, a kako se nasleđuju autozomno dominantno, mogu se utvrditi genetičkim testiranjem (68).

Osim biomarkera detektovanih u stolici, koji se već rutinski koriste u skriningu na CRC, testiranje se može vršiti i u krvi. Ovaj način testiranja je prihvatljiv za pacijente, ne zahteva posebnu pripremu, međutim metode su skupe, manje osetljive od vizuelnih metoda i nemaju dovoljan potencijal za detekciju adenoma i tumora u ranoj fazi. FDA je 2016. godine odobrila test za skrining na CRC, nazvan Epi proColon<sup>®</sup>, a zasniva se na detekciji metilovanog gena *SEPTIN9*. Ovaj gen kodira Septin-9, koji pripada familiji GTP-vezujućih proteina, ima ulogu u formiranju citoskeleta, učestvuje u mnogim ćelijskim procesima obezbeđujući stabilnost ćelijske membrane, kao i intracelularnih barijera (69). Istraživanja pokazuju da su epigenetičke promene *SEPTIN9* gena prisutne u malignom tkivu kolona i rektuma, što je i iskorišćeno za formiranje testa iz krvi. Meta-analiza iz 2019. godine, koja je obuhvatila 22 studije i ukupno 2271 pacijenta sa CRC, pokazala je prosečnu senzitivnost od 69%, a specifičnost od 92 %. Još jedan obećavajući rezultat ove analize bio je da se kombinovanjem ovog testa sa standardnim FOBT/FIT senzitivnost povećava na 89% (70). Desetak godina kasnije, tačnije u junu 2024., ista agencija odobrila je test nazvana Shield<sup>™</sup>, kao primarni test za skrining CRC. Odobrenje je dobijeno nakon istraživanja Chung i saradnika, u kome je testirana slobodna cirkulišuća DNK u plazmi prikupljenoj od 7861 ispitanika (71). Test je dizajniran da omogući analizu genetičkih mutacija u DNK, aberantnog statusa metilacije, kao i obrazaca fragmentacije DNK sa senzitivnošću od 83,1%, i specifičnošću od 89,6%. Nažalost, senzitivnost testa na premaligne lezije bila je mala i iznosila je svega 13,2%.

Opisani skrining biomarkeri mogli bi da posluže i u svrhu potvrđivanja dijagnoze CRC. Pored tog, veliki potencijal kao dijagnostički biomarkeri imaju cirkulišuće mikro-RNK (miRNK), kratki nekodirajući RNK molekuli dužine 18-25 nukleotida. MiRNK imaju značajnu ulogu u međućelijskoj komunikaciji, regulaciji imunskog odgovora, apoptozi, odgovoru na stres, regulaciji ćelijskog ciklusa i brojnim drugim procesima u ćeliji (72). Otkrivene su 90-ih godina prošlog veka, a do sada ih je opisano oko 40.000 (73). Brojne studije danas istražuju dijagnostički značaj miRNK, jedan od takvih je definisala profil od 6 miRNK (miR-18a-5p, miR21-5p, miR-29a-5p, miR-92a-5p, miR-143-5p and miR-378-5p) (74). Ipak, rezultati brojnih studija su nekompatibilni zbog nedostatka standardizacije metoda (75).

Procena stadijuma CRC je, uz patohistološku verifikaciju, najznačajniji podatak pre započinjanja bilo kakve terapijske intervencije. Prethodno opisana TNM klasifikacija je osnova prema kojoj se određuje izbor optimalnog lečenja, međutim kompleksnost same bolesti zahteva detaljniji pristup odabiru terapije i proceni prognoze lečenja. U ovi svrhu istraživanja pokazuju da bi serumski karcino-embrionalni antigen (eng. *carcinoembryonic antigen*, CEA) mogao imati veliki značaj kao dopunski nalaz postojećoj klasifikaciji. Istraživanja pokazuju da su pacijenti u stadijumu I sa visokim vrednostima CEA u većem riziku nego pacijenti u stadijumu II sa normalnim vrednostima ovog tumorskog markera, kao i da je prognoza stadijuma II sa visokim CEA slična ili gora od stadijuma III sa vrednostima CEA u granicama referentnog opsega (76). Odatle i predlog AJCC grupe za CRC (eng. *The AJCC Colorectal Working Group*) da se vrednosti CEA uključe kao stadijum C u postojeću TNM klasifikaciju (77). Ovaj predlog nije zaživeo zbog velike biološke varijabilnosti ovog biomarkera, a takođe povišen je kod pušača i nekih benignih stanja.

Studije su pokazale da povišen preoperativni CEA prognostički ukazuje na veći rizik od recidiva i lošije preživljavanje. Takođe povišen nivo karbohidratnog antigena 19-9 (eng. *carbohydrate antigen CA19-9*) pre nCRT je povezan sa lošijim preživljavanjem bez bolesti i ukupnim preživljavanjem. Međutim, studije ukazuju i da se oba tumor markera sve više koriste kao prediktivni biomarkeri odgovora na terapiju, a ne samo kao prognostički pokazatelji ishoda. Smanjenje koncentracija CEA i CA19-9 koreliše sa povoljnim terapijskim odgovorom (62). Dodatno, neki od prethodno opisanih antecedentnih, skrining i dijagnostičkih biomarkera, imaju i prediktivnu ulogu u

evaluaciji terapijskog odgovora. Naime, davanje adjuvantne terapije u stadijumu II i dalje nije jasno definisano, već se rizik procenjuje na osnovu drugih pokazatelja: T4 stadijuma, status dMMR/MSI, stepena patohistološke diferencijacije, i potencijalno vrednosti CEA. Prema važećim vodičima indikovano je testiranje tumorskog tkiva na dMMR/MSI status kod svih pacijenata sa novootkrivenim CRC. Pacijenti sa defektom MMR sistema, odnosno visokom mikrosatelitskom nestabilnošću su rezistentni na tretman 5-FU (78, 79). Mutacije u onkogenu *KRAS*, prisutne u oko 35-40% CRC slučajeva, povezane su sa rezistencijom na EGFR inhibitore, zbog čega je rutinsko testiranje *KRAS* statusa ključno za personalizovanu terapiju metastatskog CRC (80, 81). Takođe, dosadašnja istraživanja ukazuju na postojanje specifičnog miRNK „potpisa“ koji koreliše sa odgovorom na nCRT. Studija sprovedena u Kini na uzorku od 322 pacijenta pokazala je da povišeni nivoi četiri miRNA (miR-652-3p, miR-342-3p, miR-501-3p i miR-328-3p) korelišu sa lošim odgovorom na primenjenu terapiju (82). Neinvazivno testiranje cirkulišućih molekula DNK poreklom iz tumora, ima za cilj detekciju minimalne rezidualne bolesti, što predstavlja ključnu informaciju za donošenje terapijskih odluka nakon nCRT (83).

## 1.2 Sfingolipidi

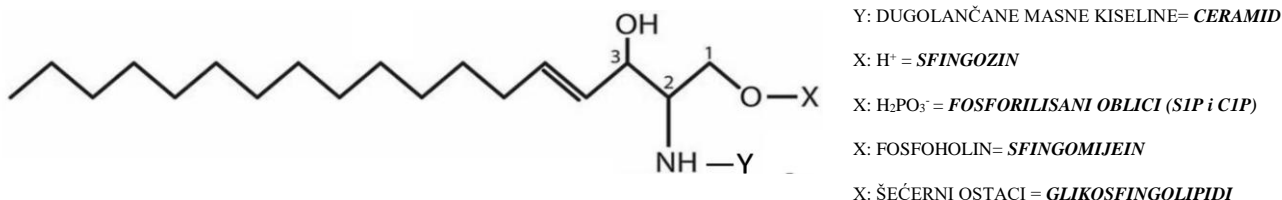
### 1.2.1 Struktura i funkcija sfingolipida

U odnosu na proteine, ugljene hidrate i nukleinske kiseline, lipidi su dugo vremena bili nepravedno zapostavljeni kao inertni molekuli, čija je uloga bila isključivo vezana za građu ćelijske membrane i za skladištenje energije. Savremena saznanja, međutim, ukazuju na to da su lipidi esencijalni i kompleksni regulatori homeostaze ljudskog organizma (84, 85). Strukturna i hemijska kompleksnost lipida omogućava im vršenje širokog spektra vitalnih funkcija. Tradicionalno, lipidi se dele na nepolarne (holesterol i trigliceridi) i polarne (fosfolipidi i njihovi derivati), uz podelu na četiri osnovne klase: holesterol i estre, trigliceride, fosfolipide i masne kiseline. Ipak, od 2005. godine standard u naučnoj zajednici predstavlja LIPID MAPS klasifikacija (eng. *LIPID Metabolites And Pathways Strategy*) i prema ovom sistemu, lipidi se na osnovu svojih hemijskih i biofizičkih svojstava dele u osam grupa: masne kiseline, glicerolipidi, glicerofosfolipidi, sfingolipidi, steroli, prenoli, saharolipidi i poliketidi (86).

Sfingolipidi obuhvataju zaista veliku klasu lipida. Otkrio ih je nemački lekar Johann Ludwig Wilhelm Thudichum (1829-1901), koji se danas smatra „ocem neurohemije“ zbog izolacije ovih biomolekula iz moždanog tkiva (85, 87). Tada je uveo u terminologiju pojam „sfingozin“, po grčkom mitološkom biću Sfingi. Mnogo godina kasnije misterije sfingolipida otkrivaju njihove mnogobrojne fiziološke i patofiziološke uloge u skoro svim ćelijskim procesim.

Početak XX veka je doneo saznanja o strukturi sfingozina, koji predstavlja osnovnu jedinicu građe svih sfingolipida, a razvoj savremenih analitičkih metoda za detekciju i kvantifikaciju, posebno tačne hromatografije u kombinaciji sa masenom spektrometrijom (eng. *liquid chromatography–mass spectrometry*, LC/MS-MS), u velikoj meri je unapredio razumevanje uloge sfingolipida. Delujući kao signalni molekuli, sfingolipidi određuju sudbinu ćelije tako što regulišu njen rast, diferencijaciju i programiranu ćelijsku smrt, a istovremeno učestvuju u koordinaciji inflamatornog odgovora organizma.

Sfingozin (2-amino-4-oktadecen-1,3-diol) je dugolančani aminoalkohol sa mononezasićenim ugljovodoničnim lancem dužine 18 ugljenikovih atoma, hemijske formule C<sub>18</sub>H<sub>37</sub>NO<sub>2</sub> (Slika 4).

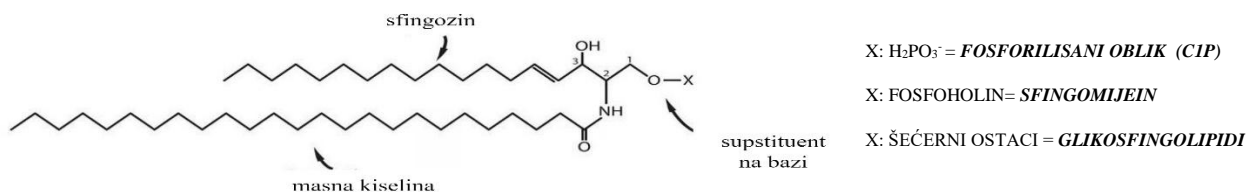


**Slika 4. Struktura sfingozina.** Supstitucijom H<sup>+</sup> na poziciji X sa H<sub>2</sub>PO<sub>3</sub><sup>-</sup> nastaje fosforilisana forma sfingozina. Supstitucijom H<sup>+</sup> na poziciji Y dugolančanim masnim kiselinama nastaje ceramid, pri čemu dodatna supstitucija na poziciji X određuje druge lipidne forme: fosforilisani ceramid ili kompleksne sfingolipide.

Kao bioaktivni lipid, sfingozin moduliše fundamentalne biološke procese poput ćelijske diferencijacije i proliferacije. Zbog njegove značajne uloge u signalnim putevima, promene u nivou sfingozina direktno su povezane sa etiopatogenezom različitih stanja, uključujući neurodegenerativna oboljenja, onkogenezu, kardiovaskularne poremećaje i hronične inflamatorne procese (88). Mehanizam njegovog delovanja primarno se ostvaruje kroz interakciju sa protein kinazom C, čiju aktivnost reguliše kao specifični efektor (89), kao i kroz direktnu modulaciju biofizičkih svojstava i provodljivosti selektivnih jonskih kanala na ćelijskoj membrani.

U odnosu na sfingozin, njegova fosforilisana forma sfingozin-1-fosfat (eng. *sphingosine-1-phosphate*, S1P) pokazuje veću raznolikost. Distribucija S1P je strogo kontrolisana i važna je kako za urođeni, tako i za stečeni imunitet. Poseban klinički značaj pridaje se njegovoj ulozi u onkogenezi, etiopatogenezi ateroskleroze, dijabetes melitusa i osteoporoze (90). Eksperimenti su pokazali da je jedna od njegovih funkcija vezana za skeletne mišiće. Naime, S1P ima značajnu ulogu u aktivaciji i diferencijaciji malih, multipotentnih matičnih ćelija u skeletnim mišićima (eng. *muscle satellite cells*), olakšavajući im ulazak u ćelijski ciklus. Pretpostavlja se da S1P ima značajnu ulogu u brzom odgovoru mišića na povredu (91).

Formiranjem amidske veze dugolančanih masnih kiselina i sfingozina nastaju ceramidi, a supstitucijom vodonikovog atoma u sklopu hidroksilne grupe na C1 atomu sfingozina polarnim grupama nastaju kompleksni sfingolipidi (Slika 5). U zavisnosti od vrste supstituenta, nastaju sfingomijelini (ako se veže fosfoholin) ili glikosfingolipidi (ako se vežu šećerne jedinice) (92). Polarnost samog supstituenta, takođe, determiniše i prirodu pojedinačnog sfingolipida: ceramid i sfingomijelin su hidrofobniji od nekih kompleksnih glikosfingolipida, a u ćeliji se ovi molekuli transportuju preko specifičnih proteina nosača. Ceramid, kao neutralni sfingolipid, se na ovaj način lako translocira kroz ćeliju i učestvuje u reakcijama metabolizma sfingolipida (93). Fosforilacijom ceramida na istom mestu nastaje ceramid-1-fosfat (eng. *ceramide-1-phosphate*, C1P).

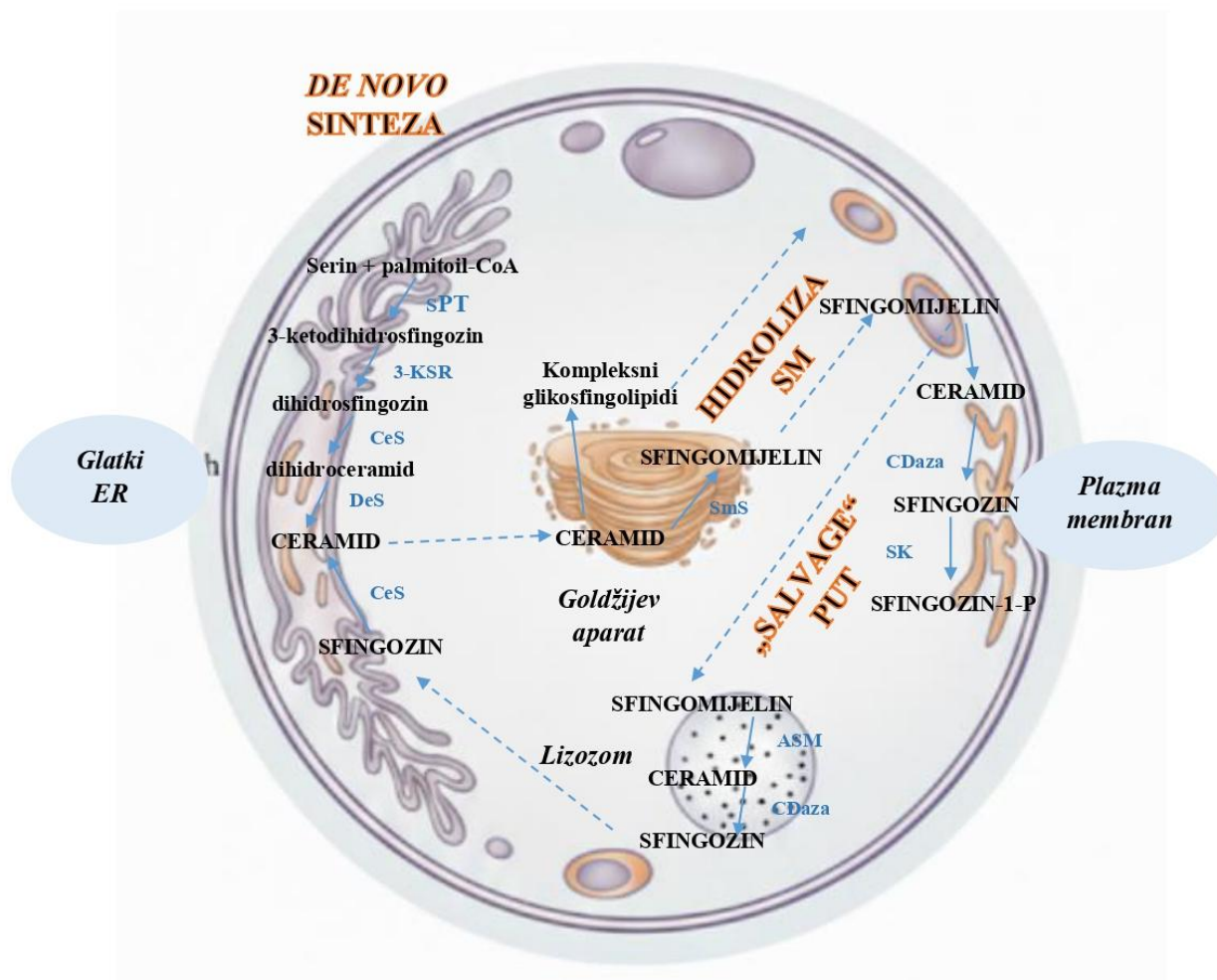


**Slika 5. Struktura ceramida.** Supstitucijom H<sup>+</sup> na poziciji X nastaje fosforilisana forma ceramida, sfingomijelin ili glikosfingolipid. Preuzeto i modifikovano <https://www.seppic.com/>.

### 1.2.2 Metabolizam sfingolipida

Metabolizam sfingolipida predstavlja složen proces koji se odvija na različitim mestima unutar ćelije, pri čemu ceramidi imaju ključnu ulogu u svim metaboličkim putevima (Slika 6). Proizvodnja ceramida uglavnom se odvija kroz katabolički put hidrolize sfingomijelina, posredstvom aktivnosti sfingomijelinaza. Nasuprot ovom brzom mehanizmu, *de novo* sinteza putem ceramid sintaze predstavlja sekundarni metabolički put, koji karakteriše sporija kinetika enzimskih reakcija i postepena akumulacija produkta u endoplazmatičnom retikulumu (94). Treći, alternativni put je lizozomski put, put regeneracije sfingozina nakon degradacije sfingomijelina u plazma membrani i izlaska sfingomijelina u citosol (95).

*De novo* sinteza započinje u glatkom endoplazmatičnom retikulumu, gde kondenzacijom serina i palmitoil-CoA nastaje 3-ketodihidrosfingozin pod katalitičkim dejstvom enzima serin-palmitoil transferaze, a redukcijom ovog molekula nastaje dihidrosfingozin. Dejstvom enzima ceramid sintaze u daljoj reakciji nastaje dihidroceramid, koji se delovanjem enzima desaturaze prevodi u ceramid. Ovako nastali ceramid transportuje se iz glatkog endoplazmatičnog retikuluma u Goldžijev aparat i formira kompleksne sfingolipide, a najznačajniji je sfingomijelin, koji sa ostalim, najčešće glikoziliranim formama bivaju transportovani u plazma membranu. U plazma membrani hidrolizom neutralnim i kiselim sfingomijelinazama obnavlja se ceramid, a dejstvom kinaza prevodi se u svoju fosforilisanu formu, SIP (96, 97). Na dalje, uglavnom hidrolizom u lizozomima („salvage“ put) sfingozin se dejstvom enzima ceramid sintaze reciklira do ceramida, gde se može uključiti u nove cikluse i koristiti za važne uloge u ćeliji.



**Slika 6. Metabolizam sfingolipida.** Prikaz puteva sinteze ceramida kao centralnog metabolita sfingolipidnog metabolizma, sa naznačenim ključnim enzimima. SPT – serin-palmitoil transferaza; 3-KSR – 3-ketodihidrosfingozin; CeS – ceramid sintaza; DeS – desaturaza; Smaza – sfingomijelinaza; Cdaza –ceramidaza; SK – sfingozin kinaza; ASM – kisela sfingomijelinaza; SmS – sfingomijelin sintaza; CerGT – ceramid glikoziltransferaza; ER – endoplazmatični retikulum; SM – sfingomijelin.

### 1.2.3 Ceramidi

Ceramidi obuhvataju familiju koja čini više od 200 strukturno različitih molekula, koji su proizvod metabolizma više od 28 enzimskih reakcija (98). Ceramidi se između sebe razlikuju po strukturi baze i dužini lanca masne kiseline (94). Dugolančane masne kiseline u molekuli ceramida su raznovrsne, variraju u broju ugljenikovih atoma i nezasićenih veza, a najčešće su dužine od 16 do 24 C atoma (99). U Tabeli 2 su prikazani specifični humani ceramidi i njihova uloga u različitim fiziološkim i patološkim stanjima.

**Tabela 2. Biološki i klinički značaj promena koncentracije ceramida**

Specifični ceramid	Patofiziološki procesi i stanja
C18:0 ↑, C24:0 ↑	Alchajmerova bolest
C18:0 ↑, C16:0 ↑	Cistična fibroza
C24:1 ↑, C24:2 ↑	Sindrom iritabilnog creva
C24:1 ↑, C24:0 ↑, C16:0 ↑	Karcinom dojke
C24:1 ↑, C24:0 ↑, C16:0 ↑, C18:0 ↓	Karcinom glave i vrata
C22:0 ↓, C24:0 ↓, C16:0 ↑	Defekti mijelinskog omotača
C24:1 ↓, C24:0 ↓, C16:0 ↑	Hepatocelularna hiperplazija
C24:1 ↓, C24:0 ↓, C16:0 ↑, C14:0 ↑, dhC24:1 ↑, dhC24:0 ↑, dhC16:0 ↑	Autofagija
C24:0 ↑, C24:1 ↑	Proproliferativno dejstvo
C18:0 ↑, C16:0 ↑, C22:0 ↑	Antiproliferativno dejstvo
C18:0 ↑, C16:0 ↑	Apoptoza
C16:0 ↑, C24:0 ↓, C24:1 ↓, C22:0 ↓	Fluidnost membrane

Strelice označavaju povećanje (↑), i smanjenje (↓) koncentracije ceramida u odnosu na referentno stanje. Oznake Cx:y označavaju dužinu i stepen zasićenosti acilnog lanca, gde x predstavlja broj ugljenikovih atoma, a y broj dvostrukih veza u masnoj kiselini. Prefiks „dh“ označava dihidroceramid, odnosno ceramid bez dvostruke veze u sfingoidnoj bazi.

Povećana sinteza ceramida predstavlja konzervirani ćelijski odgovor na stres izazvan različitim fizičkim, hemijskim i biološkim stimulusima, uključujući proinflamatornu signalnu kaskadu posredovanu TNF- $\alpha$  (eng. *tumor necrosis factor alpha*), UV i jonizujuće zračenje, infekcije bakterijama i virusima, kao i izlaganje citotoksičnim hemioterapeuticima. Intracelularno

nagomilavanje ceramida indukuje apoptozu, koordinisan i aktivan proces programirane ćelijske smrti. Proces uključuje aktivaciju cistein proteaza, kaspaza, i kaskadu intracelularnih događaja koji dovodi do smrti ćelije (100). Početni porast ceramida u ćeliji prethodi mitohondrijalnoj fazi apoptoze i udružen je sa oslobađanjem proteina iz unutrašnje membrane mitohondrija i sinteze reaktivnih kiseoničnih vrsta u mitohondrijama, što za posledicu ima kolaps membrane. Ovaj proces se dešava kroz dva mehanizma, formiranjem ceramidskih kanala u membrani i interakcijom sa proteinima iz BCL2 familije (eng. *apoptosis regulator BCL2*), koji su ključni regulatori ovih procesa (101). Ceramidski kanali su pore veličine oko 10 nm, direktno su ili inhibirani antiapoptotskim BCL2 proteinom ili stimulisani proapoptotskim BAX proteinom (eng. *BCL2-associated X protein*) (102, 103).

#### 1.2.4 Sfingomijelini

Sfingomijelini čine oko 85 % svih sfingolipida i 10-20 % ukupnih lipida u plazmi. Nastaju u Goldžijevom aparatu transferom fosfololina sa kompleksnog fosfatidilholina na ceramid i kao takvi predstavljaju međuproizvod fosfolipida i sfingolipida. Ovakav makromolekul mogao bi biti spona koja povezuje i omogućava transformaciju velikih grupa lipida. Slično ceramidima, i sfingomijelini sadrže amidsku vezu sa dugolančanim masnim kiselinama (C16 do C24) (104).

Dugo se smatralo da su sfingomijelini samo izvor bioaktivnih metabolita ceramida i S1P. Međutim, pored toga što su veliki rezervoar ovih bioaktivnih molekula, sfingomijelini imaju i druge funkcije. Najviše su zastupljeni u plazma membranama, gde imaju ulogu kako u ćelijskoj signalizaciji, tako i u kreiranju mikrodomena, poznatih kao lipidni „splavovi“ (eng. *lipid rafts*), koji su važni za vezivanje i regulaciju transmembranskih proteina (105). Pored toga, kao aktivni molekuli se dovode u vezu sa metabolizmom holesterola. Naime, smatra se da pozitivno korelišu sa stepenom ateroskleroze u čiji prilog govori činjenica da su zastupljeni preko 70 % u lipoproteinima veoma niske (eng. *very low-density lipoprotein, VDL*) i niske gustine (eng. *low-density lipoprotein, LDL*) (106). Takođe, oksidovani LDL, može biti značajan izvor oksisterola, koji stimulišu sintezu sfingomijelina i dovode do njegovog nakupljanja u aterosklerotskom zidu. Poremećaji metabolizma sfingomijelina opisani su i u retkoj autozomalno recesivnoj bolesti, Nijman-Pikovom sindromu, koja nastaje usled nedostatka enzima kisele sfingomijelinaze. Ovu bolest karakteriše nagomilavanje sfingomijelina u lizozomima, najviše u makrofagama, koji se onda deponuju u jetri, slezini, plućima, kao i u mozgu, gde dovode do ireverzibilne neurodegeneracije usled narušavanja lipidne homeostaze u centralnom nervnom sistemu (107).

#### 1.2.5 Enzimi sfingolipidnog metabolizma

Savremena medicinska biohemija prepoznaje metabolizam sfingolipida kao jedan od najsloženijih lipidnih sistema u eukariotskim ćelijama. Prevazilazeći svoju osnovnu ulogu u strukturi ćelijskih membrana, sfingolipidni metabolizam funkcioniše kao složen i visoko regulisan biohemijski mehanizam. Uključivanjem velikog broja enzima, kao što su sfingomijelinaze, ceramidaze i kinaze, ovaj sistem formira mrežu, a složenost ovog puta ne leži samo u broju uključenih enzima, već i u njihovoj kompartmentalizaciji i sposobnosti da integrišu različite signalne puteve (108-112).

Koordinisano delovanje različitih enzima omogućava stalnu modifikaciju sfingolipidnih biomolekula i prilagođavanje metaboličkih puteva trenutnim potrebama ćelije. U Tabeli 3 su prikazani ključni enzimi koji učestvuju u metabolizmu sfingolipida i pomažu u održavanju njihove ravnoteže i funkcionalne stabilnosti u ćeliji.

**Tabela 3. Enzimi sfingolipidnog metabolizma**

Lokalizacija	Enzim	Uloga
Endoplazmatski retikulum	Serin palmitoiltransferaza	<i>de novo</i> sinteza ceramida
	3-keto-sfinganin reduktaza	
	Ceramid sintaze 1–6	
	Dihidroceramid desaturaza	
	Sfingozin kinaza 2	fosforilacija sfingozina
	Sfingozin-1-fosfat lijaza	razgradnja sfingozin-1-fosfata
Goldžijev aparat	Sfingomijelin sintaza 1	Sinteza sfingomijelina
	Glukoilceramid sintaza	Početak sinteze glikofingolipida (cerebrozida)
	Ceramid kinaza	Fosforilacija ceramida
Lizozomi	Kisela sfingomijelinaza	Razgradnja sfingomijelina iz endocitoze
	Kisela ceramidaza	Razgradnja ceramida u sfingozin
	$\alpha$ -galaktozidaza A	Razgradnja glikolipida i galaktolipida
	$\beta$ -glukocerebrozidaza	
Plazma membrana	Sfingomijelin sintaza 2	Regulacija nivoa ceramida na samoj površini ćelije

	Neutralna sfingomijelinaza	Brzo generisanje ceramida
	Neutralna ceramidaza	Konverzija ceramida u sfingozin
Citosol	Sfingozin kinaza 1	Fosforilacija sfingozina
Mitohondrije	Ceramid sintaza	Specifične izoforme koji regulišu mitohondrijalnu apoptozu
	Neutralna sfingomijelinaza	
	Ceramidaza	

Kao jedan od ključnih regulatornih enzima u katabolizmu ceramida i održavanju sfingolipidne homeostaze, kisela ceramidaza (eng. *acid ceramidase*, AC) ima značajnu ulogu u kontroli intracelularnih nivoa ceramida i sfingozina. Identifikacija ovog enzima datira iz 1963. godine, kada su Gatt i saradnici prvi opisali njenu enzimsku aktivnost u moždanom tkivu pacova, dok je izolacija humanog enzima iz urina dokumentovana više od tri decenije kasnije. AC je lizozomni enzim koji se inicijalno sintetise kao prekursorski polipeptid od približno 55 kDa i 395 aminokiselina. Unutar lizozoma, ovaj prekursor se proteolitički obrađuje u zreli heterodimer molekulske mase približno 50 kDa, sastavljen od  $\alpha$ -subjedinice (13 kDa) i  $\beta$ -subjedinice (40 kDa). Gen koji kodira ovaj enzim, lokalizovan je na hromozomskom lokusu 8p21.3–p22, obuhvata približno 30 kb genomske DNK i sadrži 14 egzona i 13 introna (113). Prema nomenklaturi IUPAC i HUGO Gene Nomenclature Committee (HGNC), gen je označen kao *ASAH1*, a kodirani protein je N-acilsfingozin amidohidrolaza 1 (eng. *N-acylsphingosine amidohydrolase 1*) (GeneCards, <https://www.genecards.org/>; pristupljeno 17.2.2026.).

### 1.2.6 Uloga sfingolipida u CRC

Maligni procesi često preusmeravaju metabolizam sfingolipida ka produkciji S1P, što vodi sistemskoj inflamaciji koja podržava rast tumora (114, 115). U tumorskom tkivu, ceramidi imaju supresivnu ulogu, podstičući apoptozu, dok fosforilisane forme ceramida i sfingozina, C1P i S1P i, deluju antiapoptotski i promovišu preživljavanje tumorskih ćelija. Promene u ravnoteži između ovih molekula mogu odlučiti sudbinu ćelije. Metabolički putevi su brzi i selektivni, a ravnoteža između ceramida i S1P oblikuje sfingolipidni reostat (Slika 7) (116). U tumorima dolazi do narušavanje ove ravnoteže.



**Slika 7. Sfingolipidni reostat.** Prikaz ravnoteže između sfingozin-1-fosfata i ceramida. Odnos koncentracija ovih bioaktivnih lipida određuje sudbinu ćelije: preživljavanje ili smrt.

Dosadašnja istraživanja sfingolipidnog metabolizma u CRC su pretežno bila fokusirana na kolon ili su koristila mešane uzorke kolona i rektuma. Povišeni serumski nivoi specifičnih ceramida i sfingozina su uočeni kod pacijenata sa CRC u poređenju sa zdravom kontrolnom grupom (117). Varijacije u koncentraciji ceramida kod adenokarcinoma kolona primarno se pripisuju alteracijama u ekspresiji ili katalitičkoj aktivnosti ceramid sintaza (118). Utvrđena je pozitivna korelacija između tkivne koncentracije ceramida i uznapredovalih stadijuma maligniteta, dok se prisustvo dugolančanih ceramida dovodi u direktnu vezu sa zahvaćenošću regionalnih limfnih nodusa (118, 119). Dodatno, uočen je značajan porast nivoa ceramid sintaza i sfingozin kinaze 1 u tumorskom tkivu u odnosu na histološki zdravu mukožu (118).

Istraživanja sugerišu da *de novo* sinteza ceramida predstavlja ključni mehanizam u indukciji apoptoze posredovane nCRT (7). Generisanje i sukcesivna akumulacija ceramida kao odgovor na terapijski agens potenciraju programiranu smrt tumorskih ćelija. Konkretno, uočena je korelacija između povišene ekspresije ceramida C6 i pojačane senzitivnosti ćelija adenokarcinoma kolona na citostatsko dejstvo 5-FU (66). Nadalje, nivo ceramida u plazmi kod pacijenata sa metastatskim CRC identifikovan je kao relevantan prediktor terapijskog odgovora na kombinovani tretman irinotekanom i radioterapijom (118).

Uprkos ulozi ceramida kao tumorskih supresora, maligne ćelije često mogu izmeniti njihov metabolizam sa ciljem razvoja terapijske rezistencije i progresije bolesti (66, 120). Hipoteza o rezistenciji na nCRT zasniva se na ubrzanoj konverziji akumuliranih ceramida u kompleksne sfingolipide i inertne biomolekule, čime se neutrališe njihov proapoptotički potencijal (121). Takođe, pojačana degradacija ceramida se dovodi u vezu sa razvojem rezistencije na hemioterapeutike. Shodno tome, AC predstavlja značajnu ciljnu metu za nove terapijske strategije. Aktuelna istraživanja na ćelijskim linijama i organoidima ukazuju da AC moduliše radiosenzitivnost, čime direktno utiče na terapijski odgovor na nCRT (122, 123). Takođe, akumulacija S1P pod dejstvom AC ne samo da inhibira puteve programirane ćelijske smrti, već aktivira signalne kaskade koje pospešuju metastatski potencijal i remodelovanje tumorske mikrosredine. Inhibitori AC ispituju se danas kao terapeutska sredstva koja mogu nadvladati rezistenciju tumora na hemioterapiju i radioterapiju kroz reaktivaciju apoptoskih puteva. Ipak, studije fokusirane na ulogu AC specifično kod karcinoma rektuma i dalje su malobrojne (122-124).

## 2. CILJEVI

Ciljevi istraživanja ove doktorske disertacije su bili sledeći:

1. Određivanje koncentracija ceramida i sfingomijelina u serumu pacijenata sa LARC pre i nakon primene nCRT, kao i u serumu zdravih ispitanika, i međusobno poređenje dobijenih rezultata.
2. Određivanje koncentracije AC u serumu pacijenata sa LARC i analiza nivoa ekspresije gena *ASAH1* u rektalnom tkivu, uz utvrđivanje razlika u ekspresiji između tumorskog tkiva i okolne zdrave crevne sluznice.
3. Analiza apoptotskog statusa tumorskog tkiva i korelacija dobijenih rezultata sa nivoima ceramida, sfingomijelina i AC u serumu pacijenata sa LARC.
4. Analiza povezanosti učesnika sfingolipidnog metabolizma sa kliničkim karaktersitikama pacijenata sa LARC, kao i sa ishodima bolesti i lečenja.

### 3. MATERIJAL I METODE

#### 3.1 Ispitanici

Ova studija je obuhvatila dve grupe ispitanika: a) grupu od 30 pacijenata sa LARC (starosti 34–83 godine, 63,3% muškaraca), koji su regrutovani na Klinici za digestivnu hirurgiju – Prvoj hirurškoj klinici Univerzitetskog kliničkog centra Srbije u periodu od aprila 2019. do februara 2022. godine; i b) kontrolnu grupu od 25 zdravih dobrovoljaca (starosti 26-64 godine, 40,0% muškaraca) koji su uključeni u studiju u periodu od avgusta 2019. do januara 2020. godine.

Studija je sprovedena kao deo strateškog projekta MOHERATEKA (broj granta F–69) u okviru kog je za prikupljanje uzoraka dobijena etička saglasnost Etičkog odbora Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu (odobrenje br. 1550/V–2; 31. maj 2019. godine). Iako je regrutacija pacijenata započela u aprilu 2019. godine, prikupljanje uzoraka i podataka sprovedeno je tek nakon dobijanja saglasnosti. Analize sprovedene konkretno u ovoj studiji su odobrene od strane Etičkog odbora Univerzitetskog kliničkog centra Srbije (odobrenje br. 447/6; 19. oktobar 2021. godine) i Etičkog odbora Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu (odobrenje br. 17/VI–7; 29. jun 2023. godine), u skladu sa Helsinškom deklaracijom. Pisani informisani pristanak pribavljen je od svih učesnika.

Kriterijumi za uključivanje pacijenata u studiju bili su sledeći: histološki potvrđen adenokarcinom rektuma, stadijum T3 ili T4 ukoliko nisu infiltrisani limfni čvorovi ili bilo koji stadijum T ukoliko jesu, odsustvo udaljenih metastaza (M0 status) i izostanak preoperativnog lečenja. Kriterijumi za uključivanje zdravih osoba su bili: odsustvo istorije malignih oboljenja, odsustvo bilo kakvih hroničnih oboljenja, i neprimanje akutne terapije u trenutku regrutacije. Ispitanici koji su odbili da daju informisani pristanak su bili isključeni iz studije.

Početni klinički stadijum bolesti kod pacijenata određen je ERUS metodom i MRI male karlice. Prisustvo ili odsustvo metastaza procenjivano je pomoću metoda CT i/ili MRI. U proseku pet nedelja nakon dijagnoze, pacijenti su podvrgnuti kliničkoj reevaluaciji pre započinjanja bilo kakvog lečenja. Od ukupno 30 pacijenata, 26 je podvrgnuto nCRT koja je obuhvatala ukupnu dozu zračenja od 50,4 Gy, podeljenu u 28 frakcija, u kombinaciji sa dva ili tri ciklusa hemioterapije (5-fluorouracil 425 mg/m<sup>2</sup> i Leucovorin 20 mg/m<sup>2</sup>). Nakon 8 – 12 nedelja, ovi pacijenti su podvrgnuti hirurškoj resekciji, a stepen regresije tumora (TRG) određen je histopatološkom analizom radi procene odgovora na nCRT. Na osnovu patološkog odgovora na nCRT, pacijenti su dalje stratifikovani u tri kategorije: na one sa dobrim odgovorom (kompletna i približno kompletna regresija tumora – TRG1+TRG2); sa umerenim odgovorom (umerena regresija tumora – TRG3); i lošim odgovorom (minimalna regresija tumora ili bez regresije – TRG4+TRG5). Četiri pacijenta su lečena isključivo sistemskom hemioterapijom zbog lošeg opšteg stanja i/ili novootkrivenih sekundarnih depozita u plućima i/ili jetri. S obzirom na odstupanje od planiranog terapijskog protokola i stadijum bolesti koji je prevazilazio lokalno uznapredovali karcinom, ovi pacijenti su isključeni iz evaluativne analize terapijskog odgovora. Ishodi lečenja pacijenata procenjivani su na osnovu ukupnog preživljavanja, uz praćenje do novembra 2024. godine.

#### 3.2 Uzorkovanje biološkog materijala

Uzorci tkiva su prikupljeni od pacijenata u dve vremenske tačke. Prvo uzorkovanje tkiva je vršeno u trenutku postavljanja dijagnoze kada su od svih pacijenata biopsijom uzeti uzorci primarnog tumorskog tkiva i okolne zdrave sluzokože. Drugo uzorkovanje parova tkiva je vršeno tokom operacije isecanjem sa resektovanog preparata samo kod pacijenata koji su bili prethodno podvrgnuti nCRT. Sva tkiva su adekvatno obrađena nakon uzorkovanja i čuvana na -80°C do dalje upotrebe.

Uzorci krvi su prikupljeni od pacijenata i zdravih ispitanika. Od pacijenta krv je uzorkovana takođe u dve vremenske tačke, tokom rutinskih ispitivanja pre biopsije i najkasnije 48h pre hirurške

intervencije, dok je od zdravih ispitanika uzorkovana samo jednom. Prikupljeni uzorci krvi iz obe grupe su bili podvrgnuti istim analizama.

### 3.3 Laboratorijske analize krvi

Za hematološke analize periferna krv je uzorkovana u vakutejneru u zapremini od 2 mL pri čemu je etilendiamintetrasirćetna kiselina (eng. *ethylenediaminetetraacetic acid*, EDTA) korišćena kao antikoagulans. Metodama protočne citometrije i spektrofotometrije na automatskom hematološkom analizatoru Cell-Dyn Sapphire (Abbott Diagnostics, SAD) iz pune krvi su analizirani sledeći hematološki parametri: leukociti, trombociti, eritorciti i hemoglobin.

Za ispitivanje hemostaze krv je uzorkovana u vakutejnerima sa natrijum-citratom u zapremini od 2,7 mL. Nakon uzorkovanja, citratna plazma je izolovana centrifugiranjem pri brzini od 3000 rpm (obrta u minuti) u trajanju od 15 minuta. U plazmi su određivani parametri hemostaze: protrombinsko vreme (eng. *prothrombin time*, PT) i aktivirano parcijalno tromboplastinsko vreme (eng. *activated partial thromboplastin time*, aPTT) metodom fotooptičke koagulometrije, koncentracija fibrinogena metodom po Clauss-u, koncentracija D-dimera metodom imunoturbidimetrije. Sve analize su izvođene na automatskom koagulometru BCS XP (Siemens, Nemačka).

Za biohemijske analize krv je uzorkovana u vakutejnerima zapremine 6 mL ili 10 mL bez aditiva. Nakon koagulacije, serum je izdvojen centrifugiranjem pri brzini od 3000 rpm u trajanju od 10 minuta. Metodom spektrofotometrije na automatskom biohemijskom analizatoru Architect c4000 (Abbott Diagnostics, SAD) određivani su sledeći biohemijski parametri: glukoza, urea, kreatinin, ukupni bilirubin, ukupni proteini, albumin, ukupni holesterol, HDL-holesterol (eng. *high-density lipoprotein*, HDL), LDL-holesterol, trigliceridi, gvožđe, ukupni kapacitet vezivanja gvožđa (eng. *total iron-binding capacity*, TIBC), kao i enzimi aspartat-aminotransferaza (AST), alanin-aminotransferaza (ALT), alkalna fosfataza (eng. *alkaline phosphatase*, ALP) i gama-glutamilttransferaza ( $\gamma$ -GT). Koncentracije C-reaktivnog proteina (CRP) i feritina određivane su metodom imunoturbidimetrije.

U serumu su takođe određivane koncentracije tumorskih markera CEA, CA 19-9 i karcinomskog antigena 15-3 (eng. CA 15-3) metodom hemiluminiscentne imunoanalize na mikročesticama (eng. *chemiluminescent microparticle immunoassay*, CMIA) na analizatoru Architect i2000 (Abbott Diagnostics, SAD), dok je koncentracija karcinomskog antigena 72-4 (eng. *cancer antigen 72-4*, CA 72-4) određivana elektrohemiiluminiscentnom imunoanalizom (eng. *electrochemiluminescence immunoassay*, ECLIA) na aparatu Cobas e600 (Roche, Švajcarska). Alikvoti seruma zapremine 500  $\mu$ L zamrzavani su na temperaturi od  $-80$  °C za dalju analizu sfingolipidnih molekula.

### 3.4 Merenje nivoa sfingolipida u uzorcima seruma

Analiza nivoa sfingolipidnih molekula je urađena u saradnji sa Odeljenjem za biohemiju, Medicinskog fakulteta Univerziteta Akdeniz u Antaliji, Turska. Nivo sfingomijelina i ceramida u uzorcima seruma su određivani ultrabrzom LC/MS-MS metodom korišćenjem LC-20AD UFLC XR sistema u kombinaciji sa LCMS-8040 tandem masenim spektrometrom (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) kako je ranije opisano (125). Standardi za N-palmitoil-D-eritro-sfingozilfosforilholin (SM C16), N-stearoil-D-eritro-sfingozilfosforilholin (SM C18), N-lignoceroil-D-eritro-sfingozilfosforilholin (SM C24), N-palmitoil-D-eritro-sfingozin (CER C16), N-stearoil-D-eritro-sfingozin (CER C18), N-arahidoil-D-eritro-sfingozin (CER C20), N-behenoil-D-eritro-sfingozin (CER C22) i N-lignoceroil-D-eritro-sfingozin (CER C24) nabavljeni su od kompanije Avanti Polar Lipids (Alabaster, SAD). Obeleženi unutrašnji standard C16 CER d18:1/16:0 (palmitoil-U- $^{13}$ C<sub>16</sub>) dobijen je od kompanije Cambridge Isotope Laboratories (Andover, SAD). Signali analiziranih sfingolipida optimizovani su u okviru linearnog kalibracionog opsega, pri čemu je vreme analize

uzorka iznosilo 35 minuta. Uzorci seruma su pripremljeni za LC/MS-MS analizu kako je ranije opisano (126).

### 3.5 Merenje kisle ceramidaze (AC) u uzorcima seruma

Kvantifikacija nivoa AC u uzorcima seruma sprovedena je pomoću ELISA testa (eng. *enzyme-linked immunosorbent assay*) korišćenjem komercijalnog kita *Human ASAHI ELISA kit* (Assay Genie, Irska), u skladu sa uputstvima proizvođača. Uzorci seruma inkubirani su sa biotin-konjugovanim monoklonskim antitelom specifičnim za AC, nakon čega je dodat enzim peroksidaza iz rena (eng. *horseradish peroxidase*) konjugovana sa streptavidinom. Nakon višestrukih ispiranja, dodat je supstrat 3,3',5,5'-tetrametilbenzidin, što je dovelo do razvoja plave boje. Reakcija je zaustavljena dodatkom stop rastvora (sumporna kiselina), čime rastvor dobija žutu boju. Apsorbanca je merena na 450 nm pomoću čitača mikrotitarskih ploča, a intenzitet kolorimetrijskog signala bio je direktno proporcionalan koncentraciji AC u uzorcima. Kalibracioni opseg testa je bio 0,156–5 ng/mL, granica detekcije 0,094 ng/mL, granica kvantifikacije 0,156 ng/mL, nepreciznost u seriji je < 8%, dok je nepreciznost između serija iznosila < 10%. Primenjen je faktor razblaženja od 2. Svi uzorci su mereni u duplikatu, u skladu sa dobrom laboratorijskom praksom.

### 3.6 Analiza ekspresije gena metodom kvantitativne reakcije lančanog umnožavanja u realnom vremenu

Relativna kvantifikacija nivoa ekspresije gena metodom kvantitativne lančane reakcije polimeraze u realnom vremenu (eng. *quantitative real time polymerase chain reaction* – qRT-PCR) je urađena u saradnji sa Grupom za gensku regulaciju u tumorima, Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo Univerziteta u Beogradu.

Kako bi se analizirala ekspresija ciljnih gena (*ASAHI*, *BCL2* i *BAX*), ukupna iRNK je prvo izolovana iz uzoraka tkiva korišćenjem *TRI Reagent Solution* (Thermo Fisher Scientific, SAD) prema uputstvu proizvođača. Koncentracija i čistoća RNK su procenjivane merenjem apsorbance na 260 nm i 280 nm pomoću BioSpec-nano spektrofotometra (Shimadzu Corporation, Japan). Koncentracije RNK su bile u opsegu 23 – 2752 ng/μl, a za optimalno čiste uzorke su smatrani oni sa odnosom A260/280 u opsegu 1,8 – 2,1.

Prevođenje iRNK (2μg) u komplementarnu DNK (cDNK) je izvršeno pomoću nasumičnih prajmera i reverzne transkriptaze korišćenjem komercijalnog kita High-capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, SAD) prema protokolu proizvođača. Sinteza cDNK na osnovu iRNK matrice izvršena je u reakcionoj smeši ukupnog volumena od 20 μL pri sledećim temperaturnim uslovima: 10 minuta na 25 °C, 120 minuta na 37 °C i 5 minuta na 85 °C.

Relativna kvantifikacija je vršena u triplicatu na aparatu 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, SAD) korišćenjem komercijalnog kita *Power SYBR™ Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems, SAD) prema uputstvu proizvođača. Sekvence prajmera kao i dužine dobijenih produkata reakcije su dati u Tabeli 4. Za reakciju umnožavanja korišćen je sledeći program: 2 minuta na 50°C, 10 minuta na 95°C, nakon čega je sledilo 40 ciklusa od 15 sekundi na 95°C i 1 minuta na 60°C. Nakon svakog merenja je određena kriva topljenja fragmenta kako bi se potvrdila specifičnost reakcije.

**Tabela 4 Sekvence prajmera**

Gen	Sekvenca	Dužina fragmenta (bp)
<i>ASAHI</i>	Forward 5'-TCCTTGATGATCGCAGAACGCC-3'	121
	Reverse 5'-ACGGTCAGCTTGTTGAGGAC-3'	
<i>BCL2</i>	Forward 5'-TCGCCCTGTGGATGACTGA-3'	134
	Reverse 5'- CAGAGACAGCCAGGAGAAATC-3'	
<i>BAX</i>	Forward 5'- TGGCAGCTGACATGTTTTCTGAC-3'	195
	Reverse 5'-TCACCCAACCACCCTGGTCTT-3'	
<i>ACTB</i>	Forward 5'-GGACTTCGAGCAAGAGATGG-3'	138
	Reverse 5'-AGGAAGGAAGGCTGGAAGAG-3'	

bp – bazni par; *ASAHI* – N-acylsphingosine amidohydrolase 1; *BCL2* – BCL2 apoptosis regulator; *BAX* – BCL2 associated X, apoptosis regulator; *ACTB* – actin beta

Dobijeni podaci su prikupljeni i obrađeni pomoću softvera 7500 System Software (Applied Biosystems, SAD). Za izračunavanje relativne ekspresije gena korišćena je komparativna dCt metoda pri čemu je ekspresija ciljnog gena normalizovana u odnosu na endogenu kontrolu odnosno ekspresiju gena aktin beta (eng. *actin beta*, *ACTB*), a prema sledećoj formuli:  $dCt = Ct_{target, uzorak} - Ct_{endogena kontrola, uzorak}$ . Relativan nivo ekspresije gena je izražen kao  $2^{-dCt}$  i tako dalje korišćen u statističkoj analizi.

### 3.7 Analiza javno dostupnih transkriptomskih podataka

Kako *UCSC Xena Browser* omogućava pristup podacima iz projekta *The Cancer Genome Atlas (TCGA)*, sa ove platforme preuzeti su transkriptomski podaci za karcinom rektuma (*Rectum Adenocarcinoma, READ*) (<https://xenabrowser.net>; pristupljeno 12. juna 2025. godine). Ekspresija gena od interesa u primarnim tumorskim i netumorskim tkivima procenjena je na osnovu transkriptomskih podataka iz 92 primarna tumora i 10 netumorskih uzoraka pacijenata sa karcinomom rektuma.

### 3.8 Statistička obrada podataka

Statistička obrada podataka izvršena je korišćenjem programa *Statistical Package for Social Sciences (SPSS)*, verzija 20.0 (SPSS Inc., SAD), dok je za grafički prikaz rezultata korišćen program *GraphPad Prism*, verzija 9.0 (GraphPad Software LLC, SAD). Kategorijske varijable su prikazane kao brojevi i procenti, dok su kontinuirane varijable izražene kao srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija (SD). Normalnost raspodele kontinuiranih podataka ispitivana je pomoću *Shapiro-Wilk* testa. U zavisnosti od distribucije podataka, razlike između uzoraka analizirane su primenom parametrijskih ili neparametrijskih testova. Za poređenje nezavisnih uzoraka su korišćeni *Independent-Sample t test*, *Mann-Whitney U test* i *Kruskal-Wallis test*, dok su za poređenje uparenih uzoraka korišćeni *Paired Sample t test* i *Related Samples Wilcoxon signed-rank test*. Stepen povezanosti između kontinuiranih varijabli je analiziran primenom odgovarajućih testova korelacije: *Pearson's correlation coefficient* ili *Spearman's rank correlation coefficient*. Diskriminatorska sposobnost parametara procenjivana je analizom ROC krive (eng. *receiver operating characteristic*), pri čemu je izračunavana površina ispod krive (eng. *area under the curve*, AUC), dok su granične vrednosti (eng. *cut-off*) određene na osnovu maksimalnog Youden-ovog indeksa. Vrednosti  $AUC < 0,6$  ukazuju na slabu diskriminatorsku moć nekog parametra, na umerenu AUC vrednosti  $0,6 - 0,7$ , na dobru vrednosti  $0,7 - 0,8$ , na vrlo dobru vrednosti  $0,8 - 0,9$ , dok na odličnu diskriminatorsku moć ukazuju vrednosti  $AUC \geq 0,9$ . Analiza preživljavanja je sprovedena primenom Cox proporcionalnog

hazardnog regresionog modela, a rezultati su prikazani kao odnosi hazarda (eng. *hazard ratio*, HR) sa pripadajućim 95% intervalima poverenja (eng. *confidence interval*, IC), koji predstavljaju relativni rizik od nastanka ispitivanog događaja u odnosu na referentnu kategoriju (vrednosti  $HR > 1$  ukazuju na povećan,  $HR < 1$  na smanjen rizik, a  $HR = 1$  na odsustvo razlike u riziku u odnosu na referentnu kategoriju). U svim analizama dobijene p vrednosti manje od 0,05 su smatrane statistički značajnim.

## 4. REZULTATI

### 4.1 Osnovne karakteristike ispitanika

Ova studija je obuhvatila grupu pacijenta sa LARC, prosečne starosti  $63,5 \pm 11,0$  godina, u kojoj su muškarci činili 63,6% (19 pacijenata od ukupno 30). Kod svih pacijenata je u trenutku postavljanja dijagnoze određen klinički TNM stadijum III (Tabela 5). Kontrolnu grupu su činili zdravi ispitanici, prosečne starosti  $45,9 \pm 11,1$ , od kojih je 44,0% bilo muškog pola (11 od ukupno 25 učesnika). Grupe se po polnoj strukturi nisu razlikovale ( $p=0,125$ ), dok je razlika u starosnoj strukturi bila statistički značajna ( $p<0,001$ ).

**Tabela 5. Klinički TNM stadijum bolesti kod pacijenata sa LARC**

Pacijenti sa LARC	
T stadijum, n (%)	
T2	1(3,3)
T3	21(70,0)
T4	8(26,7)
N stadijum, n (%)	
N1	7(23,3)
N2	23(76,7)
Ukupni stadijum, n (%)	
IIIA	1(3,3)
IIIB	7(23,3)
IIIC	22(73,4)

TNM – tumor, node, metastasis; LARC – locally advanced rectal cancer.

Svi ispitanici su bili podvrgnuti istim analizama krvi, a dobijeni rezultati su prikazani u Tabeli 6. U grupi pacijenata u odnosu na kontrolnu grupu su zabeležene značajno više vrednosti za sledeće parametre: leukocite, eritrocite, trombocite, fibrinogen, D-dimer, glukozu, kreatinin, LDL-holesterol, feritin, ALT, gvožđe, CRP, CEA i CA 19-9 ( $p<0,05$ ). U vrednostima ostalih laboratorijskih parametara nije uočena značajna razlika ( $p>0,05$ ).

**Tabela 6. Uporedni prikaz hematoloških, hemostaznih i biohemijskih parametara krvi ispitivanih grupa**

	Pacijenti sa LARC		Zdravi ispitanici
	Pre terapije	Posle terapije	
Hematološki parametri, srednja vrednost±SD			
Leukociti ( $\times 10^9/L$ )*	7,3±1,8	5,5±2,1	6,7±1,3
Limfociti ( $\times 10^9/L$ )	2,1±0,8	0,8±0,3	2,3±0,4
Neutrofili ( $\times 10^9/L$ )	4,4±1,4	2,4±1,9	3,6±1,1
Eritrociti ( $\times 10^{12}/L$ )*	4,7±0,5	4,4±0,5	4,5±0,4
Hemoglobin (g/L)	135,0±13,2	126,1±16,0	138,2±10,8
Trombociti ( $\times 10^9/L$ )*	265,4±79,4	237,6±92,5	233,2±10,8
Hemostazni parametri, srednja vrednost±SD			
PT (s)	11,5±0,6	11,5±0,6	11,8±0,6
aPTT(s)	29,3±3,6	29,6±3,7	29,6±2,9
Fibrinogen (g/L)*	4,2±0,8	4,3±1,2	3,4±0,8
D-dimer (mg/L FEU)*	0,7±0,6	1,0±1,0	0,4±0,2
Biohemijski parametri, srednja vrednost±SD			
Glukoza (mmol/L)*	6,4±1,5	6,2±2,6	4,9±0,3
Urea (mmol/L)	4,6±1,5	4,7±1,3	4,8±1,4
Kreatinin ( $\mu\text{mol}/L$ )*	77,2±13,4	72,4±13,3	69,1±9,2
Bilirubin ( $\mu\text{mol}/L$ )	12,3±5,3	13,5±8,9	12,6±7,2
Ukupni proteini (g/L)	72,5±3,7	70,5±6,6	73,1±4,6
Albumin (g/L)	44,1±2,3	41,8±3,9	44,5±2,6
Holesterol (mmol/L)	5,7±1,3	5,26±1,41	5,0±0,9
HDL-Holesterol (mmol/L)	1,4±0,3	1,37±0,43	1,3±0,3
LDL-Holesterol (mmol/L)*	3,7±1,1	3,23±1,15	3,4±0,9
Trigliceridi (mmol/L)	1,5±0,5	1,44±0,94	1,4±0,6
TIBC ( $\mu\text{mol}/L$ )	59,2±11,6	59,3±13,9	56,2±10,1
Gvožđe ( $\mu\text{mol}/L$ )*	12,2±6,1	10,9±6,4	14,8±5,2
Feritin ( $\mu\text{g}/L$ )*	68,4±49,5	94,4±108,1	90,5±56,3
AST (U/L)	17,6±3,5	21,3±14,2	20,6±6,1
ALT (U/L)*	21,4±29,3	20,0±22,0	22,8±10,8
ALP (U/L)	71,0±15,5	71,7±14,9	75,7±18,1

$\gamma$ -GT (U/L)	19,7 $\pm$ 5,7	27,7 $\pm$ 30,6	21,2 $\pm$ 12,5
CRP (mg/L)*	5,5 $\pm$ 5,9	26,7 $\pm$ 70,9	3,1 $\pm$ 3,9
CEA ( $\mu$ g/L)*	17,1 $\pm$ 47,6	4,74 $\pm$ 4,61	2,6 $\pm$ 0,6
CA 19-9 (U/mL)*	11,9 $\pm$ 15,3	11,6 $\pm$ 9,8	5,6 $\pm$ 5,2
CA 15-3 (IU/mL)	13,9 $\pm$ 5,1	12,5 $\pm$ 5,1	15,5 $\pm$ 6,3
CA 72-4 (IU/mL)	4,9 $\pm$ 5,7	4,0 $\pm$ 6,7	3,9 $\pm$ 6,4

\*Parametri za koje je pokazana statistički značajna razlika između izmerenih vrednosti kod pacijenata pre terapije i zdravih ispitanika ( $p < 0,05$ ). LARC – locally advanced rectal cancer; SD – standardna devijacija; PT – prothrombin time; aPTT – activated partial thromboplastin time; HDL – high-density lipoprotein; LDL – low-density lipoprotein; TIBC – total iron-binding capacity; AST – aspartat-aminotransferaza; ALT – alanin-aminotransferaza; ALP – alkaline phosphatase;  $\gamma$ -GT – gama-glutamilttransferaza; CRP – C-reaktivni protein; CEA – carcinoembryonic antigen; CA 19-9 – carbohydrate antigen 19-9; CA 15-3 – cancer antigen 15-3; CA 72-4 – cancer antigen 72-4.

Od ukupnog broja pacijenata, 26 je podvrgnuto nCRT i dalje evaluirano, dok su 4 pacijenta primili samo hemioterapiju i bili isključeni iz svih analiza nakon terapije. Rezultati parametara krvi pacijenta nakon nCRT takođe su prikazani u Tabeli 6. Rezultati patohistološke analize resektovanog tumora, kao i ishodi bolesti i lečenja pacijenata su prikazani u Tabeli 7.

**Tabela 7. Patohistološke karakteristike tumora i ishodi pacijenata sa LARC nakon nCRT<sup>#</sup>**

	Pacijenti
T stadijum, n (%)	
T0	3(11,5)
T1	3(11,5)
T2	5(19,2)
T3	13(50,0)
T4	2(7,8)
N stadijum, n (%)	
N0	16(61,5)
N1	9(34,6)
N2	1(3,9)
Invazija limfnih sudova, n (%)	
Lx	2(7,7)
L0	13(50,0)
L1	11(42,3)
Vaskularna invazija, n (%)	

Vx	2(7,7)
V0	16(61,5)
V1	8(30,8)
Perineuralna invazija, n (%)	
PN0	19(73,1)
PN1	7(26,9)
Rezidualni status, n (%)	
R0	20(76,9)
R1	6(23,1)
Odgovor na nCRT, n (%)	
Dobar (TRG1+ TRG2)	5(19,2)
Umeren (TRG3)	9(34,6)
Loš (TRG4+TRG5)	12(46,2)
Status preživljavanja, n(%)	
Živ	25(83,3)
Preminuo	5(16,7)

#Četiri pacijenta su primila samo hemioterapiju i nisu analizirana u odnosu na terapijski odgovor, LARC – locally advanced rectal cancer; nCRT – neoadjuvant chemoradiotherapy; TRG – tumor regression grade.

## 4.2 Analiza ceramida i sfingomijelina u serumu ispitanika

### 4.2.1 Određivanje koncentracija ceramida i sfingomijelina u grupama ispitanika

Nivoi ceramida i sfingomijelina su analizirani u uzorcima seruma svih ispitanika pomoću LC-MS/MS metode. Rezultati su predstavljeni u Tabeli 8. Među ceramidima, najviše vrednosti zabeležene su za CER C24, zatim CER C22 i CER C16 u obe grupe. Nivo CER C20 je bio viši od CER C18 kod pacijenata, dok je u kontrolnoj grupi bilo obrnuto. Najzastupljeniji sfingomijelin u serumu pacijenata i zdravih ispitanika je bio SM C16, zatim SM C18 i SM C24.

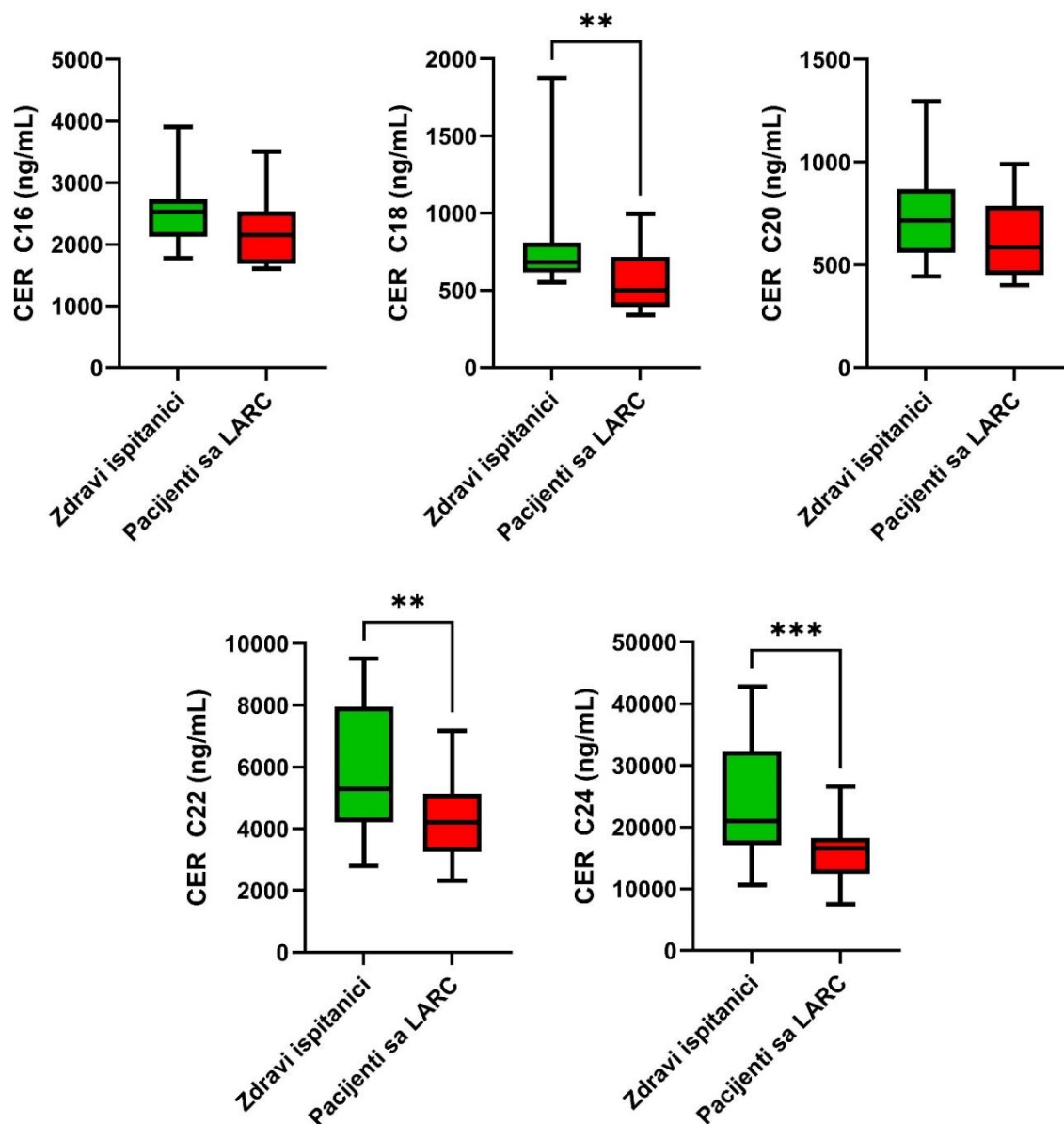
**Tabela 8. Nivo ceramida i sfingomijelina u serumu ispitanika**

	Pacijenti sa LARC		Zdravi ispitanici
	Pre terapije	Posle terapije <sup>#</sup>	
Ceramidi (ng/mL), srednja vrednost±SD			
CER C16	2204,8±531,2	1976,6±403,3	2530,3±516,9
CER C18	573,1±216,4	443,9±102,7	766,9±275,6
CER C20	619,2±185,1	580,9±151,9	744,1±208,3
CER C22	4322,3±1284,3	4700,6±2353,2	5968,7±2105,9
CER C24	15601,3±4774,7	17552,5±9192,9	24595,4±9383,7
Sfingomijelini (µg/mL), srednja vrednost±SD			
SM C16	335,9±78,2	317,6±60,2	377,7±85,7
SM C18	109,7±27,7	106,2±20,1	133,4±439,8
SM C24	70,7±25,7	90,5±40,2	113,4±37,6

# Rezultati nakon terapije su prikazani samo za pacijente koji su bili podvrgnuti nCRT. LARC – locally advanced rectal cancer; SD – standardna devijacija; CER – ceramid; SM – sfingomijelin; nCRT – neoadjuvant chemoradiotherapy.

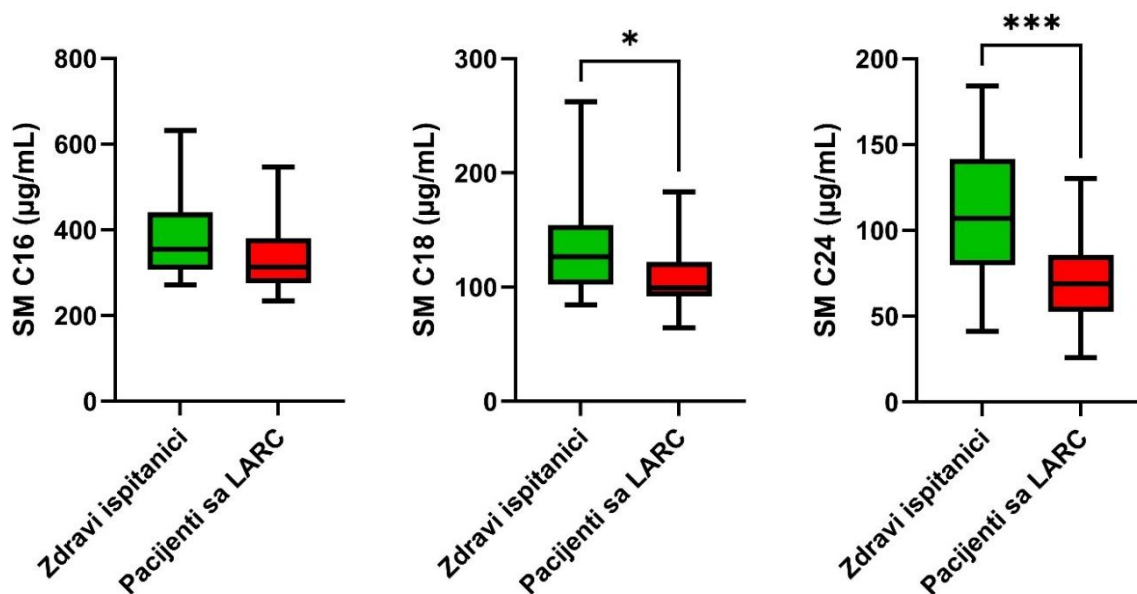
#### 4.2.2 Poređenje serumskih profila ceramida i sfingomijelna između grupa pacijenata i kontrola

Kako bi se analizirala povezanost sfingolipida sa karcinomom rektuma, nivoi ceramida i sfingomijelina su upoređeni između grupa pacijenata i kontrola (Slike 8 i 9). Od analiziranih ceramida, statistički značajna razlika utvrđena je za CER C18 ( $p=0,005$ ), CER C22 ( $p=0,005$ ) i CER C24 ( $p<0,0005$ ). Niži serumski nivoi ovih sfingolipida uočeni su kod pacijenata u poređenju sa kontrolnom grupom. Iako je sličan trend primećen za CER C16 i CER C20, statistička značajnost nije postignuta ( $p=0,056$  i  $p=0,061$ , redom).



**Slika 8. Nivoi ceramida u serumu pacijenata sa LARC u poređenju sa zdravim ispitanicima.** Koncentracije sfingolipida prikazane su pomoću box plotova, pri čemu horizontalna linija unutar box-a predstavlja medijanu, dok donji i gornji kraci predstavljaju minimalne i maksimalne vrednosti. CER – ceramid; LARC – locally advanced rectal cancer. \* $p < 0,010$ ; \*\*\* $p < 0,001$

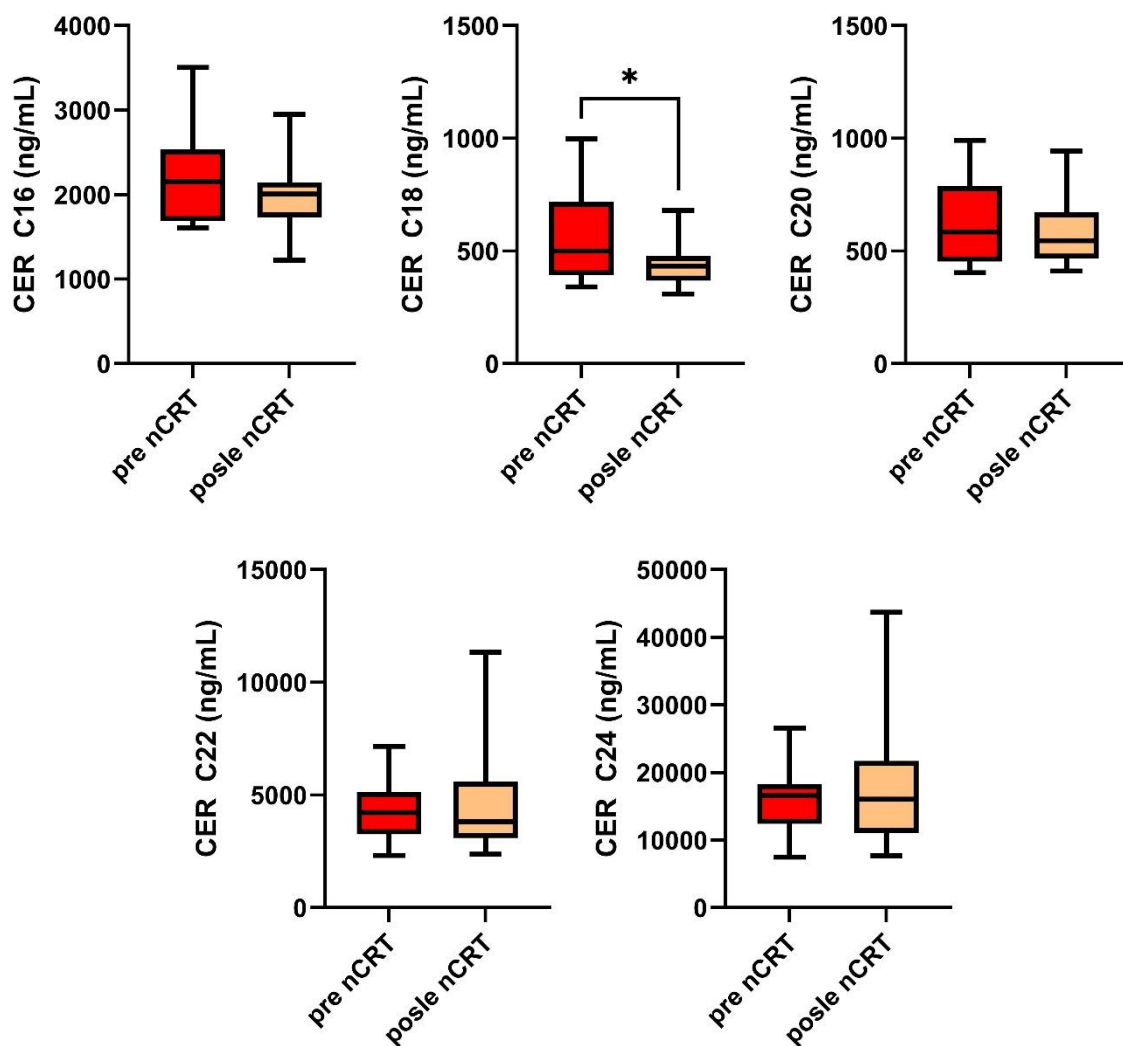
Svi analizirani sfingomijelini bili su sniženi kod pacijenata u odnosu na zdrave ispitanike, pri čemu je statistički značajna razlika utvrđena samo za SM C18 i SM C24 ( $p = 0,036$  i  $p < 0,001$ , redom).



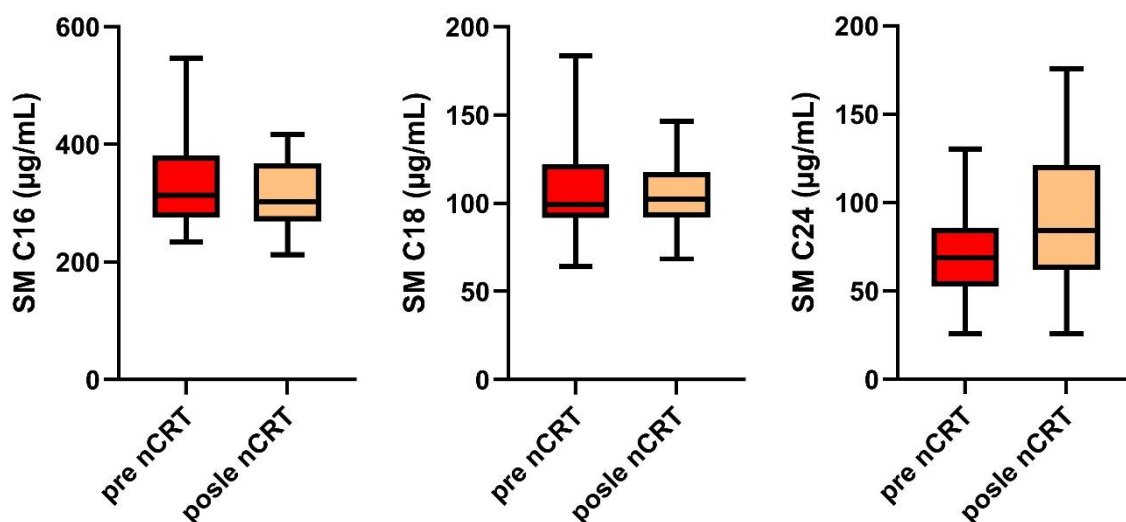
**Slika 9. Nivoi sfingomijelina u serumu pacijenata sa LARC u poređenju sa zdravim ispitanicima.** Koncentracije sfingolipida prikazane su pomoću box plotova, pri čemu horizontalna linija unutar box-a predstavlja medijanu, dok donji i gornji kraci predstavljaju minimalne i maksimalne vrednosti. SM – sfingomijelin; LARC – locally advanced rectal cancer. \* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$

#### 4.2.3 Promene u nivou serumskih ceramida i sfingomijelina u grupi pacijenata nakon neoadjuvantne hemioradioterapije (nCRT)

Za pacijente koji su primili nCRT izmereni sfingolipidi u serumu prikupljenom pre i nakon terapije su međusobno upoređeni, kako bi se ispitaio uticaj nCRT na njihove nivoe. Među analiziranim ceramidima, jedino je nivo CER C18 bio značajno smanjen u serumu nakon nCRT ( $p = 0,031$ ; Slika 10), dok se nivoi sfingomijelina nisu razlikovali, iako je blago povećanje uočeno za SM C24 ( $p > 0,05$ ; Slika 11).



**Slika 10. Nivoi ceramida u serumu pacijenata sa LARC pre i posle nCRT.** Koncentracije sfingolipida prikazane su pomoću box plotova, pri čemu horizontalna linija unutar box-a predstavlja medijanu, dok donji i gornji kraci označavaju minimalne i maksimalne vrednosti. CER – ceramid; LARC – locally advanced rectal cancer; nCRT – neoadjuvant chemoradiotherapy. \* $p < 0,05$



**Slika 11. Nivoi sfingomijelina u serumu pacijenata sa LARC pre i posle nCRT.** Koncentracije sfingolipida prikazane su pomoću box plotova, pri čemu horizontalna linija unutar box-a predstavlja medijanu, dok donji i gornji kraci označavaju minimalne i maksimalne vrednosti. SM – sfingomijelin; LARC – locally advanced rectal cancer; nCRT – neoadjuvant chemoradiotherapy.

### 4.3 Analiza AC u serumu pacijenata

#### 4.3.1 Određivanje koncentracije AC u serumu pacijenata

Od enzima uključenih u sfingolipidni metabolizam, analiziran je nivo AC metodom ELISA u serumu pacijenta sa LARC prikupljenom pre primene terapije. Dobijene koncentracije su bile u opsegu od 2,9 do 8,34 ng/mL.

#### 4.3.2 Povezanost nivoa AC sa nivoom ceramida u serumu pacijenata

Ispitana je korelacija između nivoa AC i ceramida izmerenih u serumu pacijenata pre primene terapije, pri čemu nije uočena značajna povezanost ( $r=-0,103$ ,  $p=0,704$  za CER C16;  $r=0,053$ ,  $p=0,846$  za CER C18,  $r=-0,079$ ,  $p=0,770$  za CER C20;  $r=-0,206$ ,  $p=0,444$  za CER C22 i  $r=-0,188$ ,  $p=0,485$  za CER C24).

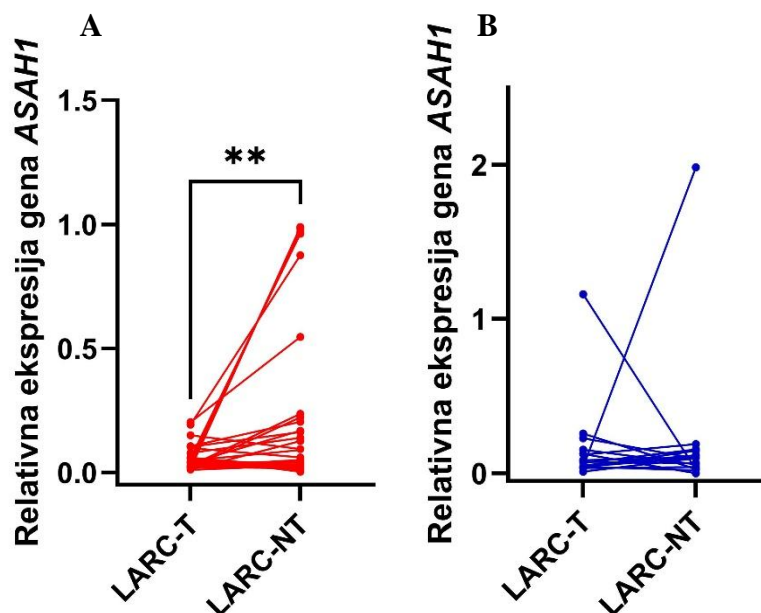
### 4.4 Analiza ekspresije gena *ASAH1* u tkivu pacijenata

#### 4.4.1 Određivanje nivoa ekspresije gena *ASAH1* u tkivima pacijanata

Relativna ekspresija gena *ASAH1* je analizirana u uparenim uzorcima tumorskog i netumorskog tkiva prikupljenih od pacijenata sa LARC.

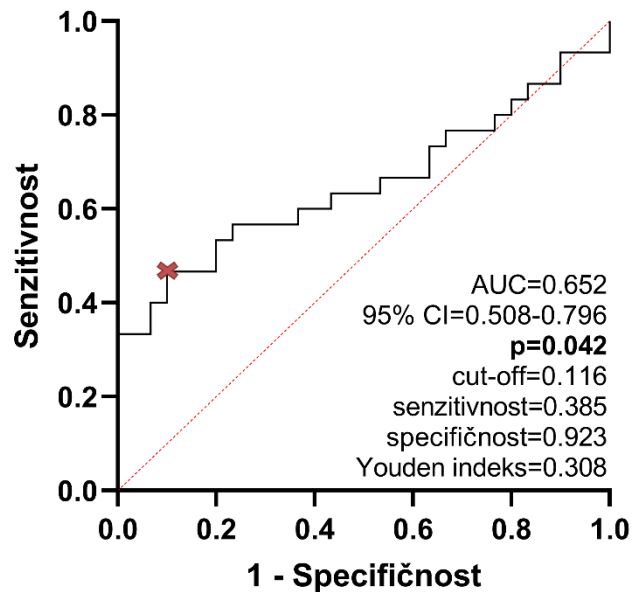
Rezultati analize uzoraka prikupljenih pre terapije su pokazali statistički značajnu razliku u ekspresiji gena *ASAH1* u tumorskom u odnosu na okolno netumorsko tkivo ( $p=0,004$ ) (Slika 12A). Kod 70% pacijenata uočena je 1,1 do 65 puta smanjena ekspresija gena u tumorskom tkivu u odnosu na netumorsko, dok je kod preostalih 30% pacijenata ona bila povećana 1,3 do 24 puta. Nezavisna analiza RNA-seq podataka preuzetih iz TCGA baze, sprovedena pomoću UCSC Xena Browsera, potvrdila je značajno nižu ekspresiju gena *ASAH1* u primarnim tumorskim u poređenju sa normalnim rektalnim tkivima ( $p<0.001$ ).

Sa druge strane nije uočena razlika u ekspresiji gena *ASAH1* u uparenim uzorcima tkiva prikupljenih nakon nCRT ( $p=0,939$ ; Slika 12B).



**Slika 12. Relativna ekspresija gena *ASAH1* u uzorcima tumorskih i odgovarajućih netumorskih tkiva prikupljenih od pacijenata sa LARC. Pod A: svi pacijenti – poređenje pre terapije. Pod B: samo pacijenti podvrgnuti nCRT – poređenje nakon terapije. Svaki pojedinačni simbol na grafiku (●) predstavlja relativnu vrednost ekspresije gena ( $2^{-dCt}$ ), dok horizontalna linija povezuje uparene uzorke tumorskog i netumorskog tkiva poreklom od istog ispitanika. *ASAH1* – N-acylsphingosine amidohydrolase 1; LARC – locally advanced rectal cancer; LARC-T – tumorsko tkivo pacijenata sa LARC; LARC-NT – netumorsko tkivo pacijenata sa LARC. nCRT – neoadjuvant chemoradiotherapy. \*\* $p < 0,010$**

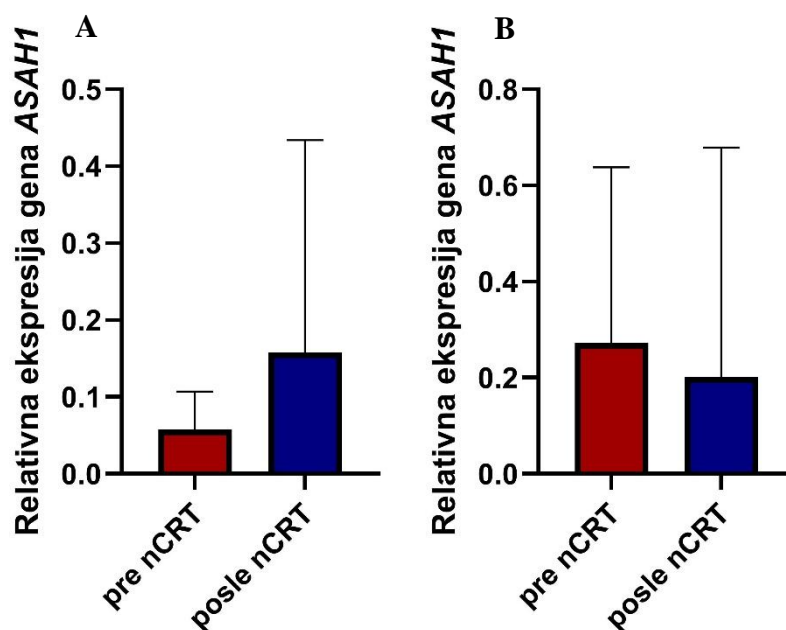
Na Slici 13 je predstavljen rezultat ROC analize koja je sprovedena na uzorcima prikupljenim pre nCRT. Pokazano je da ekspresija gena *ASAH1* ima umerenu sposobnost razlikovanja tumorskog od netumorskog tkiva (AUC=0,652; 95% CI=0,508–0,796;  $p=0,042$ ). Optimalna granična vrednost, određena primenom Youdenov-og indeksa, iznosila je 0,116 uz ostvarenu osetljivost od 38,5% i specifičnost od 92,3%.



**Slika 13. ROC kriva za razlikovanje tumorskog i netumorskog rektalnog tkiva na osnovu ekspresije gena *ASAH1*.** Biomarkerska efikasnost procenjena je na osnovu vrednosti AUC, koja predstavlja površinu ispod ROC krive. Optimalna granična vrednost (*cut-off* vrednost), označena crvenim simbolom i određena primenom Youdenovog indeksa, iznosila je 0,116, uz ostvarenu osetljivost od 38,5% i specifičnost od 92,3%. ROC – receiver operating characteristic; *ASAH1* – N-acylsphingosine amidohydrolase 1; AUC – area under the curve; CI – confidence interval.

#### 4.4.2 Promene u nivou ekspresije gena *ASAH1* u tkivima pacijenata nakon nCRT

Kako bi se ispitaio uticaj nCRT na ekspresiju gena *ASAH1* u tkivu, izmerene ekspresije u uzorcima tumorskog tkiva, kao i u odgovarajućim uzorcima netumorskog tkiva pre i posle nCRT su međusobno upoređene. Na Slici 14 su prikazani dobijeni rezultati. Nisu uočene značajne razlike u ekspresiji gena *ASAH1* u analiziranim tkivima ( $p=0,059$  za tumorska tkiva i  $p=0,348$  za netumorska tkiva).



**Slika 14. Relativna ekspresija gena *ASAH1* u uzorcima tumorskih (A) i netumorskih tkiva (B) pacijenata sa LARC upoređenim pre i posle nCRT.** Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost relativne ekspresije gena ( $2^{-dCt}$ ) + standardna devijacija. *ASAH1* – N-acylsphingosine amidohydrolase 1; LARC – locally advanced rectal cancer; nCRT – neoadjuvant chemoradiotherapy.

#### 4.4.3 Povezanost ekspresije gena *ASAH1* u tumorskom tkivu pacijenata sa nivoom AC u serumu

Analiza korelacije je sprovedena kako bi se ispitala moguća povezanost između ekspresije gena *ASAH1* u tumorskom tkivu i nivoa AC u serumu kod pacijenata pre primene terapije. Rezultati nisu pokazali značajnu korelaciju između ova dva parametra ( $r=-0,013$ ;  $p=0,945$ ).

#### 4.5 Analiza povezanosti učesnika sfingolipidnog metabolizma sa kliničko-patološkim karakteristikama pacijenata

##### 4.5.1 Povezanost učesnika sfingolipidnog metabolizma sa tumor-markerima i inflamatornim parametrima pre terapije

Povezanost serumskih ceramida i sfingomijelina, kao i nivoa serumskog AC i ekspresije gena *ASAH1* u tumorskom tkivu, sa tumor-markerima i inflamatornim parametrima analizirana je kod pacijenata sa LARC pre primene terapije. Inflamatorni status procenjen je pomoću dobijenih CRP vrednosti i CALLY indeksa, pri čemu je CALLY indeks izračunat prema formuli: albumin (g/L)  $\times$  apsolutni broj limfocita ( $\times 10^9/L$ ) / CRP (mg/L)  $\times$  10, kako bi se odrazio nutritivni, imunološki i inflamatorni status pacijenata. Rezultati korelacionih analiza su dati u Tabeli 9. Pozitivna korelacija je uočena između SM C18 i CRP ( $r=0,574$ ,  $p=0,032$ ), dok je sličan trend korelacije primećen između SM C24 i CA19-9, ali bez statističke značajnosti ( $r=0,484$ ,  $p=0,057$ ).

**Tabela 9. Povezanost učesnika sfingolipidnog metabolizma sa tumor markerima i inflamatornim parametirma pacijenata sa LARC pre terapije**

	CEA ( $\mu\text{g/L}$ )	CA19-9 (U/mL)	CA15-3 (IU/mL)	CA72-4 (IU/mL)	CRP (mg/L)	CALLY indeks		
Serum	Ceramidi (ng/mL)							
	CER C16	r=0,059 p=0,834	r=-0,031 p=0,910	r=0,019 p=0,956	r=0,399 p=0,199	r=0,174 p=0,553	r=-0,036 p=0,899	
	CER C18	r=0,109 p=0,457	r=0,209 p=0,436	r=0,097 p=0,778	r=0,336 p=0,286	r=0,377 p=0,253	r=-0,129 p=0,648	
	CER C20	r=0,116 p=0,680	r=0,332 p=0,209	r=-0,104 p=0,761	r=0,266 p=0,404	r=0,152 p=0,605	r=-0,121 p=0,666	
	CER C22	r=-0,029 p=0,919	r=0,225 p=0,403	r=-0,056 p=0,871	r=0,140 p=0,665	r=0,029 p=0,923	r=-0,086 p=0,761	
	CER C24	r=-0,045 p=0,874	r=0,180 p=0,505	r=-0,085 p=0,804	r=-0,028 p=0,931	r=-0,248 p=0,392	r=-0,157 p=0,576	
	Sfingomijelini ( $\mu\text{g/mL}$ )							
	SM C16	r=0,333 p=0,225	r=0,079 p=0,770	r=-0,065 p=0,850	r=0,399 p=0,199	r=0,288 p=0,318	r=-0,286 p=0,302	
	SM C18	r=0,487 p=0,066	r=0,126 p=0,642	r=0,103 p=0,764	r=0,483 p=0,112	r=0,574 <b>p=0,032*</b>	r=-0,346 p=0,206	
	SM C24	r=0,365 p=0,181	r=0,484 p=0,057	r=0,410 p=0,210	r=0,182 p=0,572	r=-0,007 p=0,982	r=-0,250 p=0,369	
	Enzimi (ng/mL)							
	AC	r=0,013 p=0,945	r=0,026 p=0,890	r=0,418 p=0,085	r=0,135 p=0,581	r=0,229 p=0,224	r=-0,213 p=0,259	
	Ekspresija gena ( $2^{-\text{dCt}}$ )							
	Tumorsko tkivo	ASAHI	r=0,128 p=0,500	r=0,215 p=0,253	r=0,077 p=0,762	r=0,102 p=0,678	r=0,119 p=0,530	r=-0,164 p=0,388

LARC – locally advanced rectal cancer; nCRT – neoadjuvant chemoradiotherapy; CEA – carcinoembryonic antigen; CA 19-9 – carbohydrate antigen 19-9; CA 15-3 – cancer antigen 15-3; CA 72-4 – cancer antigen 72-4; CRP – C-reaktivni protein; CALLY – C-reactive protein-albumin-lymphocyte index; CER – ceramid; SM – sfingomijelin; AC – acid ceramidase; ASAHI – N-acylsphingosine amidohydrolase 1; r – koeficijent korelacije. \*p<0,05

#### 4.5.2 Povezanost učesnika sfingolipidnog metabolizma sa karaktersitkama tumora nakon nCRT

Učesnici sfingolipidnog metabolizma su analizirani kao potencijalni prediktori patoloških osobina tumora nakon nCRT. U tu svrhu je analizirana povezanost serumskih ceramida, sfingomijelina, AC i ekspresije gena *ASAHI* u tumorskom tkivu, izmerenih pre nCRT, sa sledećim karaktersitikama tumora: stadijum tumora (T), stadijum limfnih čvorova (N), limfatična invazija (L), vaskularna invazija (V), perineuralna invazija (PN) i rezidualni status (R).

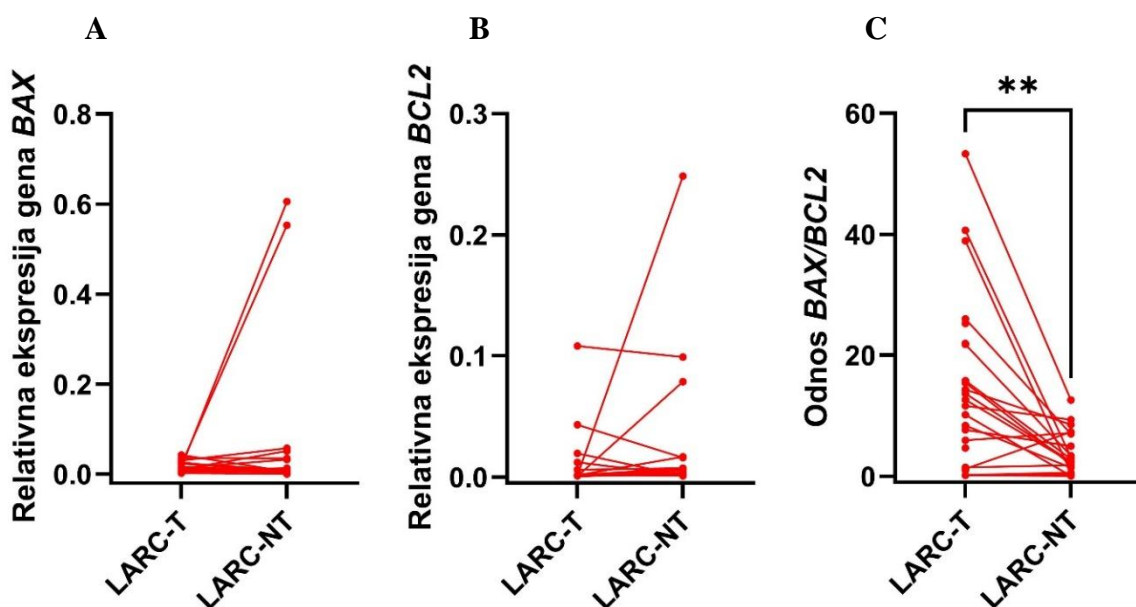
Među analiziranim parametrima, rezultati su pokazali da su manje vrednosti CER C16 i SM C16 povezane sa limfatičnom invazijom (L0=2166,4±402,8 ng/mL vs L1=1891,4±302,4 ng/mL za, p=0,046 za CER C16; L0=333,1±49,1µg/mL vs L1=280,5±32,2 µg/mL, p=0,024 za SM C16). Za ostale učesnike sfingolipidnog metabolizma nije nađena povezanost sa patološkim karakteristikama tumora (p>0,05).

#### 4.6 Analiza apoptotskog statusa tkiva pacijenata

##### 4.6.1 Određivanje nivoa ekspresije gena *BAX*, *BCL2* i određivanje njihovog odnosa u tkivima pacijenata

Relativna ekspresija proapoptotskog gena *BAX* i antiapoptotskog gena *BCL2* je analizirana u uzorcima tkiva prikupljenih od pacijenata pre i posle terapije. Dalje je izračunat odnos *BAX/BCL2* kako bi se procenio apoptotski status tkiva, pri čemu su vrednosti ovog odnosa >1 ukazivale na proapoptotski, a vrednosti <1 na antiapoptotski status.

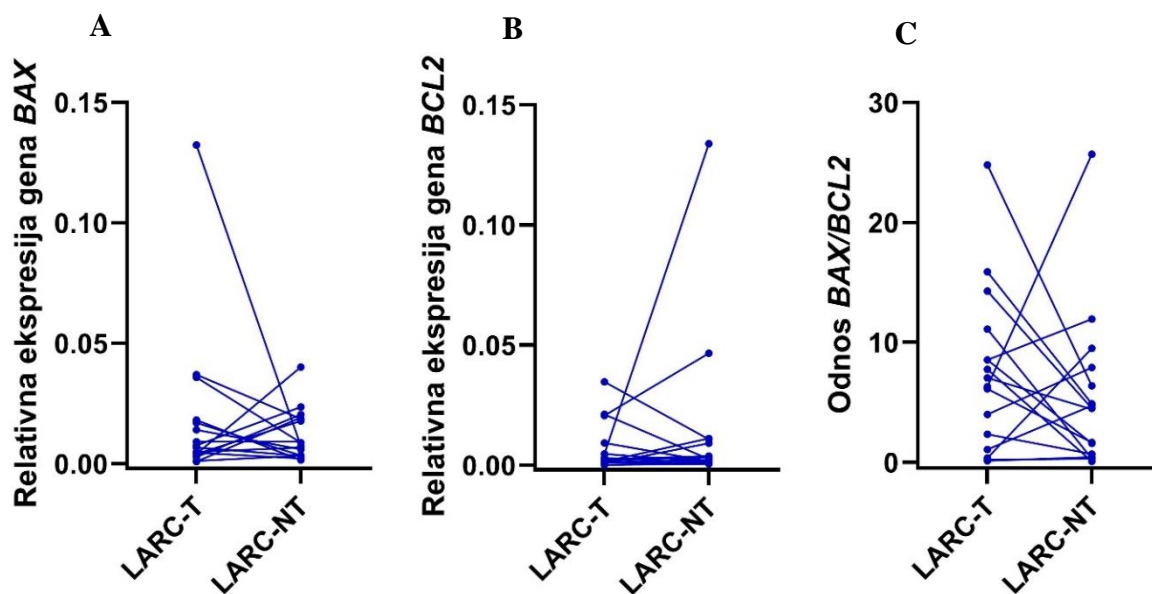
Poređenje ekspresije gena *BAX*, *BCL2* kao i njihovog odnosa između uzoraka tumorskog i okolnog netumorskog tkiva pacijenta pre terapije je prikazano na Slici 15. Za razliku od gena *BAX* koji je imao sličnu ekspresiju, za gen *BCL2* su uočene veće varijacije između parova tkiva, ali bez statističke značajnosti (p=0,812 za *BAX* i p=0,216 za *BCL2*). Odnos *BAX/BCL2* je bio značajno veći u uzorcima tumorskog u odnosu na uzorke netumorskog tkiva (p=0,002).



**Slika 15. Relativna ekspresija gena *BAX* (A), *BCL2* (B) i njihov odnos (C) u uzorcima tumorskih i odgovarajućih netumorskih tkiva prikupljenih od pacijenata sa LARC pre terapije. Svaki pojedinačni simbol na grafiku (●) predstavlja relativnu vrednost ekspresije gena ( $2^{-dCt}$ ), dok horizontalna linija povezuje uparene uzorke tumorskog i netumorskog tkiva poreklom od istog**

ispitanika. *BAX* – BCL2 associated X, apoptosis regulator; *BCL2* – BCL2 apoptosis regulator; LARC – locally advanced rectal cancer; nCRT – neoadjuvant chemoradiotherapy; LARC-T – tumorsko tkivo pacijenata sa LARC; LARC-NT – netumorsko tkivo pacijenata sa LARC. \*\* $p < 0,010$

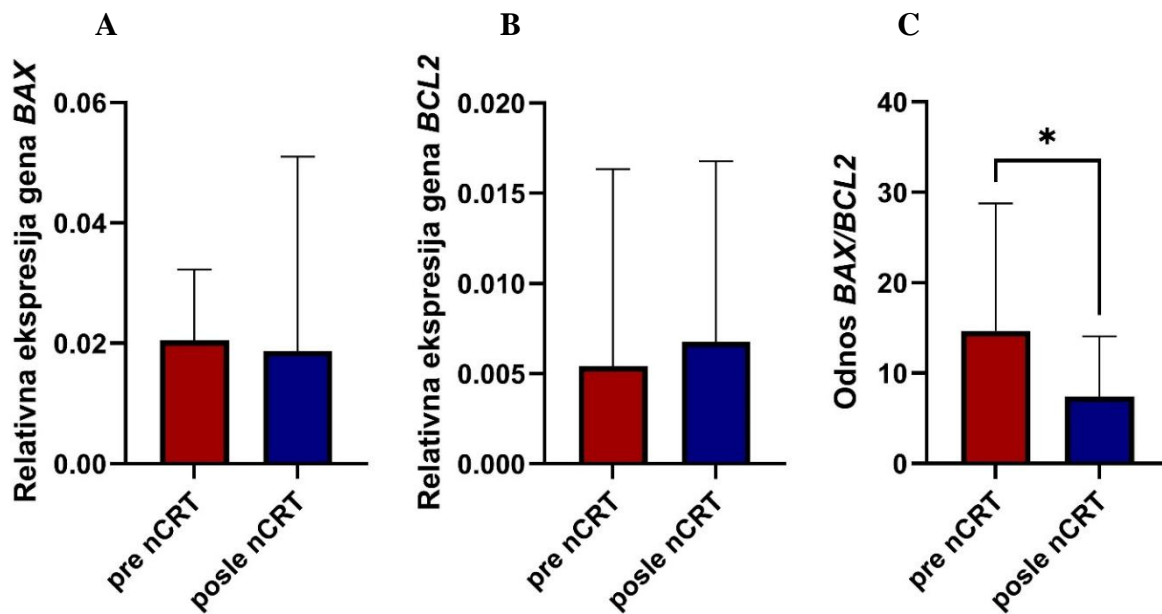
Na Slici 16 su prikazani rezultati poređenje ekspresija gena *BAX*, *BCL2* kao i njihovog odnosa između uparenih uzoraka tkiva prikupljenih od pacijenata koji su bili podvrgnuti nCRT. Nije uočena razlika između tkiva ni za jedan od analiziranih parametara ( $p=0,706$  za *BAX*,  $p=0,469$  za *BCL2* i  $p=0,301$  za odnos *BAX/BCL2*).



**Slika 16. Relativna ekspresija gena *BAX* (A), *BCL2* (B) i njihov odnos (C) u uzorcima tumorskih i odgovarajućih netumorskih tkiva prikupljenih od pacijenata sa LARC posle nCRT.** Svaki pojedinačni simbol na grafiku (●) predstavlja relativnu vrednost ekspresije gena ( $2^{-dCt}$ ), a horizontalna linija povezuje uparene uzorke tumorskog i netumorskog tkiva poreklom od istog ispitanika. *BAX* – BCL2 associated X, apoptosis regulator; *BCL2* – BCL2 apoptosis regulator; LARC – locally advanced rectal cancer; nCRT – neoadjuvant chemoradiotherapy; LARC-T – tumorsko tkivo pacijenata sa LARC; LARC-NT – netumorsko tkivo pacijenata sa LARC.

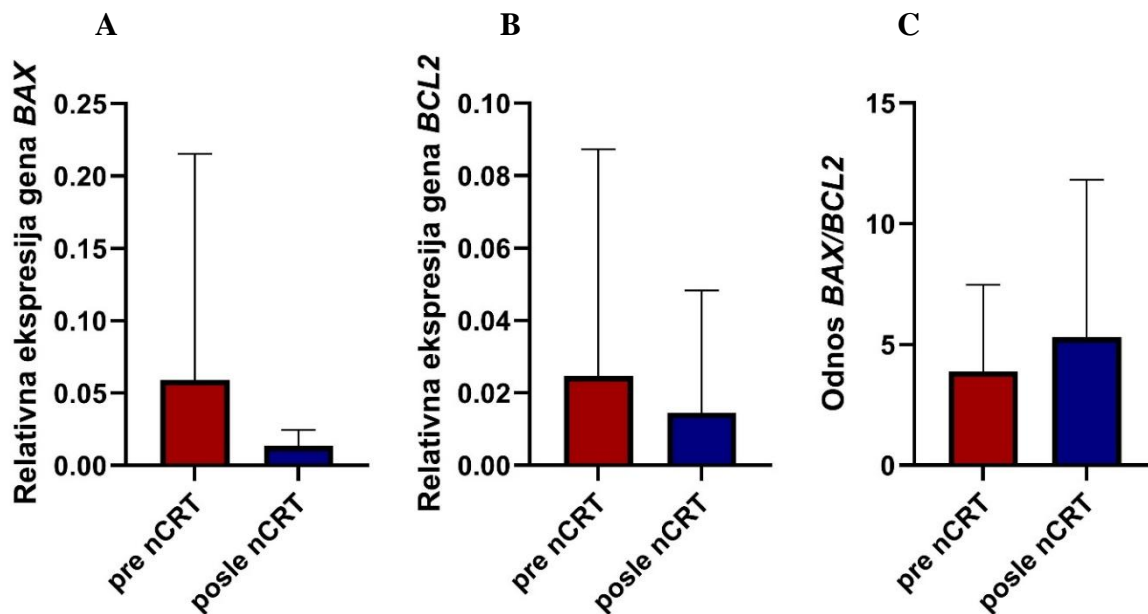
#### 4.6.2 Promene u ekspresiji gena *BAX*, *BCL2* i njihovog odnosa u tkivima pacijenta nakon nCRT

Kako bi se ispitaio uticaj nCRT na ekspresiju gena *BAX* i *BCL2* i njihov odnos, rezultati merenja su upoređeni posebno u tumorskim i posebno u netumorskim tkivima pre i posle nCRT (Slike 17 i 18). Nisu uočene značajne promene u ekspresiji pojedinačnih gena u tumorskim tkivu ( $p=0,134$  za *BAX* i  $p=0,187$  za *BCL2*), dok je odnos *BAX/BCL2* pokazao statistički značajno smanjenje nakon nCRT ( $p=0,013$ ).



**Slika 17. Relativna ekspresija gena *BAX* (A), *BCL2* (B) i njihov odnos (C) u uzorcima tumorskih tkiva pacijenata sa LARC upoređenim pre i posle nCRT.** Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost relativne ekspresije gena ( $2^{-\Delta Ct}$ ) + standardna devijacija. *BAX* – BCL2 associated X, apoptosis regulator; *BCL2* – BCL2 apoptosis regulator; LARC – locally advanced rectal cancer; nCRT – neoadjuvant chemoradiotherapy; \*\* $p < 0,05$

Rezultati poređenja ekspresije gena *BAX* i *BCL2*, kao i njihovog odnosa *BAX/BCL2* u netumorskim tkivima, nisu pokazali statistički značajne razlike pre i posle nCRT ( $p=0,215$  za *BAX*;  $p=0,642$  za *BCL2* i  $p=0,078$  za odnos *BAX/BCL2*).



**Slika 18. Relativna ekspresija gena *BAX* (A), *BCL2* (B) i njihov odnos (C) u uzorcima netumorskih tkiva pacijenata sa LARC upoređenim pre i posle nCRT.** Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost relativne ekspresije gena ( $2^{-\Delta Ct}$ ) + standardna devijacija. *BAX* – BCL2 associated X, apoptosis regulator; *BCL2* – BCL2 apoptosis regulator; LARC – locally advanced rectal cancer; nCRT – neoadjuvant chemoradiotherapy.

#### 4.6.3 Povezanost učesnika sfingolipidnog metabolizma sa apoptotskim statusom tkiva pacijenata pre terapije

Test korelacije je sproveden na uzorcima prikupljenim pre terapije kako bi se analizirala povezanost učesnika sfingolipidnog metabolizma sa apoptotskim statusom tumorskog tkiva pacijenata, a dobijeni rezultati su prikazani u Tabeli 10. Među sfingolipidima, za CER C20, CER C22 i CER C24 je pokazana pozitivna korelacija sa apoptotskim statusom ( $r=0,619$ ,  $p=0,018$ ;  $r=0,694$ ,  $p=0,006$  i  $r=0,601$ ,  $p=0,023$ , redom). Sa porastom nivoa ovih ceramida u serumu, raste odnos *BAX/BCL2* gena u tumorskom tkivu. Suprotno tome, za AC je pokazana negativna korelacija sa apoptotskim statusom, odnosno sa porastom nivoa AC u serumu opada odnos *BAX/BCL2* u tumorskom tkivu ( $r=-0,536$ ,  $p=0,002$ ). Povezanost između ekspresije gena *ASAHI* i *BAX/BCL2* odnosa nije uočena.

**Tabela 10. Povezanost učesnika sfingolipidnog metabolizma sa apoptotskim statusom tumorskog tkiva pacijenata sa LARC pre terapije**

		<i>BAX/BCL2</i> u tumorskom tkivu	
Serum	Ceramidi (ng/mL)		
	CER C16	r=0,491	p=0,075
	CER C18	r=0,293	p=0,303
	CER C20	r=0,619	p= <b>0,018*</b>
	CER C22	r=0,694	p= <b>0,006**</b>
	CER C24	r=0,601	p= <b>0,023*</b>
	Sfingomijelini (µg/mL)		
	SM C16	r=0,091	p=0,757
	SM C18	r=0,217	p=0,455
	SM C24	r=0,356	p=0,212
	Enzimi (ng/mL)		
	AC	r=-0,536	p= <b>0,002**</b>
Tumorsko tkivo	Ekspresija gena ( $2^{-dCt}$ )		
	<i>ASAHI</i>	r=-0,023	p=0,918

LARC – locally advanced rectal cancer; *BAX* – BCL2 associated X, apoptosis regulator; *BCL2* – BCL2 apoptosis regulator; CER – ceramid; SM – sfingomijelin; AC – acid ceramidase; *ASAHI* – N-acylsphingosine amidohydrolase 1; r – koeficijent korelacije. \*p<0,05; \*\*p<0,010

#### 4.6.4 Povezanost apoptotskog statusa tumorskog tkiva pacijenata sa odgovorom na nCRT

Pacijenti su prema patološkom odgovoru tumora podeljeni u tri podgrupe: pacijente sa dobrim (TRG1+TRG2), umerenim (TRG3) i lošim TRG4+TRG5) terapijskim odgovorom. Analizirani su odnosi ekspresije *BAX* i *BCL2* gena u tumorskom tkivu pre terapije. Uočen je trend viših vrednosti *BAX/BCL2* odnosa kod pacijenata sa umerenim i lošim odgovorom ( $9,9 \pm 12,8$  za TRG1+TRG2 vs  $16,8 \pm 16,3$  za TRG3 i  $15,1 \pm 13,5$  za TRG4+TRG5). Međutim, razlike nisu bile statistički značajne (p=0,481).

#### 4.7 Analiza povezanosti učesnika sfingolipidnog metabolizma sa ishodima bolesti i lečenja

##### 4.7.1 Povezanost učesnika sfingolipidnog metabolizma sa preživljavanjem

Univarijantna Cox regresiona analiza je korišćena kako bi se ispitala povezanost učesnika sfingolipidnog metabolizma sa ukupnim preživljavanjem pacijenata sa LARC. Prosečno vreme praćenja pacijenata je bilo  $56,9 \pm 14,6$  meseci, a na kraju perioda praćenja je 83,3% pacijenata bilo živo (25 pacijenata od ukupno 30).

Kao faktori preživljavanja su analizirani serumski ceramidi i sfingomijelini, AC, kao i ekspresija gena *ASAHI* u tumorskom tkivu izmereni pre primene terapije. Dobijeni rezultati su prikazani u Tabeli 11 kao vrednosti HR sa 95% CI. Nijedan parametar nije pokazao statistički značajnu povezanost sa preživljavanjem. Iako je za gen *ASAHI* dobijena vrednost HR bila visoka

(oko 10), interval poverenja je pokazao nestabilnu procenu, odnosno nedovoljnu snagu i nepouzdanu procenu efekta.

**Tabela 11. Povezanost učesnika sfingolipidnog metabolizma sa preživljavanjem kod pacijenata sa LARC**

		HR (95% CI)	P vrednost
Serum	Ceramidi (ng/mL)		
	CER C16	0,999(0,997–1,002)	0,548
	CER C18	1,000(0,995–1,005)	0,980
	CER C20	0,997(0,987–1,006)	0,476
	CER C22	0,997(0,992–1,003)	0,356
	CER C24	1,000(0,999–1,000)	0,173
	Sfingomijelini (µg/mL)		
	SM C16	0,995(0,979–1,011)	0,521
	SM C18	0,985(0,941–1,031)	0,518
	SM C24	0,964(0,904–1,027)	0,257
Enzimi (ng/mL)			
	AC	1,098 (0,652–1,849)	0,923
Tumorsko tkivo	Ekspresija gena ( $2^{-dCt}$ )		
	<i>ASAHI</i>	10,046(0,00–65830326,088)	0,773

LARC – locally advanced rectal cancer; HR – hazard ratio; CI – confidence interval; CER – ceramid; SM – sfingomijelin; AC – acid ceramidase; *ASAHI* – N-acylsphingosine amidohydrolase 1.

#### 4.7.2 Povezanost učesnika sfingolipidnog metabolizma sa odgovorom na nCRT

Kako bi se učesnici sfingolipidnog metabolizma analizirali kao potencijalni prediktori odgovora na nCRT, serumski nivoi ceramida, sfingomijelina i AC, kao i ekspresija gena *ASAHI* u tumorskom tkivu, izmereni pre nCRT, su upoređeni između pacijenata sa različitim terapijskim odgovorom. Rezultati nisu pokazali povezanost ni za jedan od analiziranih parametra ( $p > 0,05$ ; Tabela 12).

**Tabela 12. Povezanost učesnika sfingolipidnog metabolizma sa odgovorom na nCRT kod pacijenata sa LARC#**

	Dobar (n=5)	Umeren (n=9)	Loš (n=12)	<i>P</i> vrednost	
Serum	Ceramidi (ng/mL), srednja vrednost±SD				
	CER C16	2356,6±197,9	2051,4±283,3	2271,2±531,3	0,678
	CER C18	544,1±125,7	530,6±247,4	622,1±236,1	0,680
	CER C20	509,6±86,9	638,4±149,1	649,6±239,1	0,522
	CER C22	3666,2±1059,6	4857,1±1387,0	4145,0±1268,3	0,260
	CER C24	14214,1±3555,9	16989,5±6517,4	150005,9±3752,3	0,828
	Sfingomijelini (µg/mL), srednja vrednost±SD				
	SM C16	358,8±42,2	288,9±35,7	366,6±100,2	0,162
	SM C18	103,3±9,5	95,7±20,8	124,5±32,6	0,116
	SM C24	63,9±15,3	78,1±37,5	67,5±17,8	0,748
	Enzimi (ng/mL), srednja vrednost±SD				
	AC	4,1±0,9	4,7±1,4	4,9±1,9	0,915
Tumorsko tkivo	Ekspresija gena ( $2^{-dCt}$ ), srednja vrednost±SD				
	<i>ASAH1</i>	0,07±0,05	0,07±0,06	0,04±0,02	0,644

# Četiri pacijenta su primila samo hemioterapiju i nisu analizirana u odnosu na terapijski odgovor. Pacijenti koji su primili nCRT su podeljeni u tri kategorije: dobar odgovor – pacijenti sa kompletnom (TRG1) i približno kompletnom (TRG2) regresijom tumora; umeren odgovor – pacijenti sa umerenom regresijom tumora (TRG3); i loš odgovor – pacijenti sa minimalnom regresijom (TRG4) i bez regresije tumora (TRG5). nCRT – neoadjuvant chemoradiotherapy; TRG – tumor regression grade; SD – standardna devijacija; CER – ceramid; SM – sfingomijelin; AC – acid ceramidase; *ASAH1* – N-acylsphingosine amidohydrolase 1.

## 5. DISKUSIJA

Sfingolipidi se smatraju ključnim za očuvanje strukturnog integriteta intestinalnog trakta. Kako je prethodno navedeno, ovi bioaktivni molekuli regulišu proliferaciju ćelija, diferencijaciju, i apoptozu. Razumevanje metabolizma sfingolipida u kolonu i rektumu od suštinskog je značaja za sagledavanje njihove uloge u razvoju CRC, progresiji bolesti i odgovoru na terapiju. Opisani koncept sfingolipidnog reostata značajno doprinosi rasvetljavanju uloga sfingolipida u patogenezi, kao i u predikciji pravca toka bolesti. Kod zdravih osoba metabolički profil je uglavnom uravnoteženiji, dok izmenjeno metaboličko stanje kod pacijenata sa CRC može biti povezano sa specifičnim promenama u metabolizmu lipida u poređenju sa zdravim kontrolama.

Brojna istraživanja su ispitivala prognostički i prediktivni značaj sfingolipidnih molekula kod pacijenata sa CRC. Zbog ograničene senzitivnosti i specifičnosti standardnih tumorskih markera, CEA i CA19-9, postoji stalna potreba za dodatnim, pouzdanim biomarkerima koji bi dopunili njihovu kliničku vrednost. Upravo iz ove potrebe proističe značaj istraživanja sfingolipida kao potencijalnih markera za praćenje kako toka bolesti, tako i odgovora na terapiju. U studijama, kao što je već opisano, analizirani su različiti učesnici sfingolipidnog metabolizma, uključujući ceramide i enzime koji učestvuju u njihovoj sintezi, kao i metabolite poput sfingozina i S1P. Pored toga, poseban interes je bio usmeren na AC, koja katalizuje hidrolizu ceramida i utiče na ravnotežu proapoptotskih i proliferativnih signalnih puteva. Međutim, u većini tih studija su analizirani mešoviti uzorci tumorskog tkiva kolona i rektuma, što je dovelo do heterogenih i često oprečnih rezultata. Istovremeno, u dostupnoj literaturi i dalje nema dovoljno podataka o specifičnoj ulozi metabolizma sfingolipida u karcinomu rektuma kao zasebnom biološkom i kliničkom entitetu.

U ovoj doktorskoj disertaciji sfingolipidni molekuli su analizirani u serumu pacijenata sa LARC, stadijuma III, a kojima je ordinirana nCRT, i u serumu zdravih ispitanika. Po polnoj strukturi se grupe ispitanika nisu razlikovale, dok su ispitanici u kontrolnoj grupi bili nešto mlađi. Ova razlika nije iznenađujuća s obzirom da je jedan od kriterijuma za uključivanje u kontrolnu grupu podrazumevao odsustvo bilo kakve istorije hroničnih bolesti, što otežava pronalaženje starijih osoba koje ispunjavaju ovaj uslov. Uočene razlike u hematološkim, hemostaznim i biohemijskim parametrima između grupa, bez obzira da li je postignuta statistička značajnost, su u skladu sa očekivanim efektima prisustva aktivne maligne bolesti. Parametri koji su pokazali statistički značajne razlike, poput leukocita, eritrocita, trombocita i nekih biohemijskih markera, jasno odražavaju uticaj bolesti na organizam. Ostali parametri, iako nisu značajno odstupali od vrednosti u kontrolnoj grupi, odgovaraju poznatim fiziološkim obrascima i predstavljaju tipične individualne varijacije unutar populacije pacijenata. Od tumor markera, vrednosti CEA i CA 19-9 bile su očekivano veće kod pacijenata sa LARC, što potvrđuje njihovu ulogu kao markera povezanih sa CRC. Nasuprot tome, CA 15-3 i CA 72-4 nisu pokazali razliku između grupa, što je u skladu sa njihovom primarnom primenom u praćenju drugih karcinoma, poput karcinoma dojke i želuca. Uzimajući sve zajedno, ovi rezultati naglašavaju da laboratorijski parametri pre terapije odražavaju sistemski uticaj same bolesti, a statistički značajne promene dodatno potvrđuju specifične efekte LARC u poređenju sa neobolelima.

Uočene promene u laboratorijskim parametrima pre i posle nCRT kod pacijenata sa LARC su u skladu sa očekivanim sistemskim efektima terapije. Smanjenje broja leukocita, limfocita i neutrofila odražava tipičnu supresiju koštane srži i primarno pogađa ćelije koje se brzo dele. Takođe, pad hemoglobina, eritrocita, trombocita i albumina, ukazuje na opšti sistemski stres indukovani terapijom. S druge strane, povećanje inflamatornih parametara, uključujući CRP i D-dimer, je u skladu sa sistemskim inflamatornim odgovorom i oslobađanjem molekula koje aktiviraju imunski sistem iz oštećenih ćelija. Smanjenje CEA nakon terapije ukazuje na redukciju tumorskog opterećenja, dok ostali biohemijski parametri ostaju relativno stabilni ili pokazuju manje promene. Ovi rezultati jasno pokazuju da nCRT indukuje širok sistemski odgovor organizma, koji uključuje hematološke,

inflamatorne i metaboličke komponente. Uočene promene odražavaju tipičnu fiziološku reakciju na kombinovanu radio-hemioterapiju i njihova pojava je očekivana u kontekstu terapijskog odgovora.

Profili ceramida i sfingomijelina u serumu pacijenata i zdravih ispitanika uključenih u ovu studiju su određivani metodom LC/MS-MS, nakon čega su dobijene vrednosti upoređene između ispitivanih grupa. Rezultati su za oba tipa sfingolipidnih molekula pokazali niže koncentracije u serumu pacijenata pre primene bilo kakve terapije u odnosu na kontrolnu grupu, pri čemu je statistički značajno niži nivo zabeležen za CER C18, CER C22, CER C24, SM C18 i SM C24. S obzirom da promene u nivou cirkulišućih ceramida i sfingomijelina mogu biti posledica unosa sfingolipida putem ishrane, pacijenti uključeni u istraživanje nisu bili na restriktivnom dijetetskom režimu. Raznovrsna ishrana ispitanika, uključujući pacijente i kontrolnu grupu, omogućila je realističnije sagledavanje uloge sfingolipida u karcinomu rektuma, nezavisno od dijetarnih faktora. Na osnovu dobijenih rezultata se može pretpostaviti da pad vrednosti CER C18, CER C22, CER C24, SM C18 i SM C24 može ukazivati na prisustvo karcinoma rektuma. Međutim, navike u ishrani ostaju važan faktor koji bi trebalo posebno uzeti u obzir u budućim istraživanjima, kao i sprovođenje analiza u grupama pacijentima s ranijim stadijuma tumora, I i II.

Niži nivo ceramida u serumu pacijenata u odnosu na zdrave ispitanike u suprotnosti su sa prethodno objavljenim istraživanjima (117). U serumu pacijenata sa metastaskim CRC su zabeleženi veći nivoi ceramida i sfingomijelina u poređenju sa zdravim kontrolama (119, 127). Takođe, pokazano je da u normalnom tkivu postoji gradijent u nivou aktivnosti alkalne sfingomijelinaze duž kolona ka rektumu, čijom se različitom aktivnošću sfingomijelini hidrolizuju do ceramida i fosfoholina, što rezultuje razlikama u nivou ceramida (128). Istraživanja su pokazala i da snižene koncentracije proapoptotskog ceramida i povišene koncentracije proproliferativnog S1P u polipoidnim lezijama sa visokim malignim potencijalom, dok je suprotan obrazac uočen kod lezija sa niskim malignim potencijalom (129). Regulacija nivoa S1P u ćelijama karcinoma kolona zavisi od povećane ili smanjene ekspresije enzima uključenih u njegovu sintezu, odnosno razgradnju. U kataboličkom putu, S1P može biti ireverzibilno degradiran ili ponovo pretvoren u ceramid i druge kompleksne sfingolipide (128). Neujednačenosti podataka u literaturi o povezanosti nivoa ceramida i sfingomijelina sa CRC doprinose i rezultati *in vitro* studija. Manje koncentracije sfingomijelina i ceramida zabeleženo su u ćelijskoj liniji SW620 u poređenju sa SW480 (130). Ćelijska linija SW480 predstavlja primarni tumor kolona iz kog je izvedena izogena metastatska linija SW620 iz limfnog čvora, pri čemu su migratorni potencijal i invazivnost ćelija SW480 veći u poređenju sa ćelijama SW620 (131, 132). Međutim, u odnosu na navedene studije, u ovoj doktorskoj disertaciji su bili uključeni isključivo pacijenti sa karcinomom rektuma kod kojih metastaze nisu bile prisutne u trenutku regrutovanja. Takođe, analiziran je nivo sfingolipidnih molekula u serumu, a poznato je da postoje razlike u profilu sfingolipida u tkivu i cirkulaciji (119).

Niži nivo ceramida kod pacijenata mogu ukazivati na njihovu pojačanu razgradnju, pri čemu AC predstavlja jedan od ključnih enzima uključenih u ovaj proces. Kao što je već napomenuto, AC ima značajnu ulogu u regulaciji ravnoteže između proapoptotskih i proproliferativnih sfingolipidnih molekula. Hidrolizom ceramida do sfingozina, AC smanjuje njihov antitumorski potencijal, dok istovremeno obezbeđuje supstrat za fosforilaciju i sintezu S1P, čime se podstiču protumorski efekti. S obzirom na to da AC nije direktno uključena u metabolizam sfingomijelina, u ovom istraživanju je analizirana njena povezanost samo sa nivoima ceramida u grupi pacijenata. Međutim, nije uočena značajna korelacija sa količinom enzima. Pošto je fokus ove disertacije bio na analizi sfingolipida, AC je razmatrana samo kao potencijalni mehanizam koji bi mogao objasniti uočene promene u profilu sfingolipida kod pacijenata sa LARC, zbog čega merenje AC nije sprovedeno u kontrolnoj grupi. Bez obzira što nije nađena korelacija između nivoa ceramida i AC, ne može se u potpunosti isključiti uloga ovog enzima, s obzirom na to da je merena samo količina proteina ELISA testom, dok aktivnost enzima nije analizirana. Merenje aktivnosti AC zahteva složenije i kombinovane metode, koje su tehnički zahtevnije od klasičnih ELISA testova i obično podrazumevaju dodatnu optimizaciju i kontrolne uslove. U tom kontekstu, funkcionalna aktivnost enzima bi trebalo da se uzme u obzir u

budućim istraživanjima, a kvantifikovanje sfingozina kao glavnog kataboličkog produkta moglo bi se koristiti za procenu te aktivnosti.

Nivo AC je dalje indirektno procenjivan u uzrocima tkiva pacijenata, a na osnovu analize ekspresije gena *ASAH1*, koji kodira ovaj enzim. Prvo su analizirani uzorci prikupljeni od pacijenata pre primene bilo kakve terapije kako bi se ispitao potencijal ekspresije ovog gena za razlikovanje malignog od nemalignog tkiva. Uočena je smanjena ekspresija gena *ASAH1* u tumorskom tkivu, uz ograničenu sposobnost razlikovanja malignog od nemalignog rektalnog tkiva. Smanjena ekspresija je primećena i pri analizi TCGA-READ seta podataka, koji je uključivao transkriptomске podatke iz primarnih uzoraka rektalnog adenokarcinoma stadijuma II–III. Prethodna studija koja je kombinovala TCGA podatke kolona i rektuma kako bi uporedila ekspresija gena povezanih sa metabolizmom sfingolipida između tumorskog i netumorskog tkiva je za gen *ASAH1* zabeležila sličan rezultat (133). Za razliku od pažljivo prikupljenih parova tkiva od pacijenata regrutovanih za potrebe ovog istraživanja, u Xena Browser-u nisu uvek dostupni podaci za uparene uzorke. Ipak, uprkos razlikama u platformama, metodologijama i potencijalnim varijacijama u stadijumu tumora i uparivanju uzoraka, uočen je sličan trend smanjenja ekspresije gena *ASAH1* u tumorskom tkivu. Ovo smanjenje najverovatnije odražava funkcionalne posledice u biologiji tumora, a ne biomarkerski značaj u smislu razlikovanja tkiva. S obzirom da nema dovoljno studija u kojima je direktno merena ekspresija gena *ASAH1* u humanom rektalnom tkivu, posebno u zdravoj sluznici, ovi rezultati doprinose boljem razumevanju uloge gena *ASAH1* u LARC, naročito u kontekstu ograničenih kliničkih podataka.

Na osnovu ekspresije na nivou gena, mogao bi se očekivati i snižen nivo AC u tumorskom tkivu rektuma, što bi bilo u suprotnosti sa prethodnim nalazima o povišenoj ekspresiji AC u CRC (134). Ekspresija gena *ASAH1*, kao indirektni pokazatelj nivoa AC u tkivu, je korelisana sa nivoom AC u serumu. Međutim, korelacija nije uočena. Ovakav rezultat može biti usled sistemskog porekla cirkulišuće AC. Uzimajući sve navedeno u obzir može se pretpostaviti da je AC, u zavisnosti od tkiva u kom se eksprimira, regulisana na više nivoa, uključujući transkripcione i posttranskripcione mehanizme. Ovakva tkivno specifična regulacija može doprineti razlikama u nivou enzima između kolona i rektuma uočenim u prethodnoj studiji (135). Takođe, pored tumorskih ćelija, AC luče i druge ćelije poput hepatocita, leukocita i endotelnih ćelija, što posledično u serumu odražava opšti, a ne tumor specifičan metabolizam sfingolipida (119, 136, 137).

S obzirom na primećeni potencijal da promene u nivou ceramida i sfingomijelina mogu ukazivati na prisustvo tumora, ovi parametri su dalje korelisani sa standardnim tumor markerima koji se koriste za procenu bolesti. Sve analize su sprovedene u serumu pre primene bilo kakve terapije, kako bi se izbegao uticaj terapijskih protokola na ispitivane parametre i obezbedila što pouzdanija interpretacija rezultata. Iako su uočene individualne varijacije u koncentracijama ispitivanih lipida i tumorskih markera, statističkom obradom podataka nije potvrđena značajna međusobna povezanost između ovih parametara. Drugim rečima, vrednosti ceramida i sfingomijelina nisu pokazale linearnu niti monotonu korelaciju sa standardnim tumorskim markerima. Odsustvo korelacije može se smatrati metodološki i klinički relevantnim nalazom, jer ukazuje na to da ispitivani lipidni parametri odražavaju različite biološke aspekte tumorskog procesa u odnosu na konvencionalne markere. Time se smanjuje verovatnoća preklapanja informacija i potvrđuje da svaki od analiziranih pokazatelja pruža nezavisnu dijagnostičku vrednost. Upravo ta komplementarnost omogućava njihovo paralelno praćenje u cirkulaciji, čime se potencijalno unapređuje preciznost procene tumorske bolesti i jača njihov ukupni biomarkerski značaj.

Identifikacija specifičnih biomarkera u serumu koji, u kombinaciji, odražavaju i biologiju tumora i sistemski imunski odgovor mogla bi unaprediti praćenje toka bolesti i odgovora na terapiju. S obzirom na povezanost tumora sa inflamacijom, učesnici sfingolipidnog metabolizma su korelisani i sa CRP parametrom i CALLY indeksom, pri čemu je pozitivna korelacija uočena između SM C18 i CRP. Prema podacima iz literature, CALLY indeks je u CRC proučavan kao prognostički biomarker, pri čemu njegove niže preoperativne vrednosti korelišu sa smanjenim preživljavanjem i većom stopom recidiva (138-140). Prednost CALLY indeksa u odnosu na druge inflamatorne

parametre, kao što su PLR (eng. *platelet-to-lymphocyte ratio*) i NLR (eng. *neutrophil-to-lymphocyte ratio*), ogleda se u tome što istovremeno odražava sistemsku inflamaciju, nutritivni status i imunski odgovor (141). Njegova prognostička vrednost nadmašuje druge često korišćene inflamatorne markere, a u kombinaciji sa kliničkim parametrima stadijuma bolesti, kao što je TNM klasifikacija, dodatno poboljšava preciznost prediktivnih modela za procenu ishoda bolesti (142). Međutim, dostupni podaci o ulozi CALLY indeksa isključivo u karcinomu rektuma su vrlo ograničeni. Pored toga nema zabeleženih studija koje su ispitivale povezanost sfingolipida i CALLY indeksa. Međusobni odnos metabolizma ceramida, inflamacije i nutritivnog statusa trebalo bi dodatno ispitati na većem broju pacijenata sa karcinomom rektuma, kako bi se identifikovali jedinstveni biomarkeri koji odražavaju sve navedeno ili različiti markeri koji u kombinaciji mogu s većom pouzdanošću ukazivati na tok bolesti.

Iako je svim pacijentima sa LARC uključenih u ovu studiju inicijalno ordinirana nCRT, kod četiri pacijenta su dva meseca nakon prve evaluacije detektovani sekundarni depoziti u jetri i plućima. Ovi pacijenti su primili samo hemioterapiju i dalje su praćeni, ali od njih nisu uzimani uzorci nakon terapije i nisu analizirani u kontekstu terapijskog odgovora.

Kako bi se procenio uticaj nCRT na metabolizam sfingolipida, ceramidi i sfingomijelini su mereni u serumu, dok je ekspresija gena *ASAH1* merena u tkivima pacijenata koji su bili podvrgnuti ovoj terapiji. Među analiziranim sfingolipidima uočeno je smanjenje nivoa C18 CER. Imajući u vidu da je *de novo* sinteza ceramida ranije predložena kao ključni mehanizam u nCRT-indukovanoj apoptozi, ovaj nalaz može biti posledica smanjene aktivnosti ceramid-sintaze 1, koja je odgovorna za sintezu C18 CER (143, 144). S druge strane, razlike u ekspresiji gena *ASAH1* uočene pre nCRT više nisu bile prisutne što je najverovatnije posledica blagog povećanja ekspresije u tumorskom i blagog smanjenja u netumorskom tkivu u odgovoru na terapiju. S obzirom na to da AC ima protumorske efekte, ovaj rezultat sugerise da tumor razvija adaptivni odgovor i potencijalno se opire terapiji.

Patohistološke karakteristike tumora nakon terapije opisuju stanje i biološke osobine rezidualnog tumora, a ne direktno odgovor na terapiju, iako se ponekad mogu preklapati. Limfovaskularna invazija se definiše kao prisustvo ćelija karcinoma u limfnim ili krvnim sudovima i smatra se ranim korakom u širenju tumora, a limfni nodusi potencijalno jesu inicijalna mesta za detektovanje metastaza. Zato se i prisustvo malignih ćelija u limfnom nodusu smatra ranim pokazateljem diseminacije bolesti u udaljene organe, odnosno agresivnosti samog tumora. Serumski sfingomijelini, ceramidi, AC i ekspresija gena *ASAH1* u tumorskom tkivu su analizirani kao potencijalni prediktori ovih karakteristika. Rezultati analize su pokazali da niži nivoi CER C16 i SM C16 u serumu pre izlaganja nCRT mogu ukazivati na limfatičnu invaziju tretiranog tumora, što sugerise da mogu odražavati agresivnije biološke osobine rezidualnog tumora. Iako nije nađena veza nova ceramida i sfingomijelina sa perineuralnom invazijom, ovi nalazi ne isključuju potencijal analiziranih sfingolipida kao biomarkera koji pruža dodatnu informaciju o invazivnosti tumora.

Važan faktor koji određuje odgovor na terapiju i može uticati na ishod lečenja pacijenata jeste apoptotski status tumorskog tkiva. Tumorsko tkivo sa očuvanim apoptotskim putevima i povećanim unutrašnjim apoptotskim kapacitetom verovatnije će bolje odgovoriti na terapiju. Takve ćelije su sklonije da uđu u proces ćelijske smrti nakon oštećenja izazvanog terapijom, dok tumori sa narušenim apoptotskim mehanizmima imaju veću verovatnoću da prežive. Sklonost tumorskih ćelija da izbegnu apoptozu može nastati i kao posledica ograničene akumulacije ceramida ili njihove brze degradacije. Iako sfingomijelini, koji služe kao depoi ceramida, spadaju u proapoptotske sfingolipide, njihova prekomerna akumulacija može biti povezana sa lošim odgovorom na terapiju (121). Sa druge strane, povećana aktivnost AC dovodi do značajnog pada nivoa ceramida, zbog čega se AC smatra obećavajućim targetom za razvoj novih terapijskih pristupa (114, 145, 146).

Odnos proteina BAX/BCL2 prethodno je predložen kao potencijalni indikator odgovora tumora na adjuvantnu CRT kod pacijenata sa karcinomom rektuma, ukazujući na njegovu moguću ulogu kao prediktivnog biomarkera (147). S obzirom na to da ekspresija gena predstavlja primarni

regulatorni nivo, pri čemu promene u nivou iRNK često prethode i dovode do promena u nivou proteina, u ovom istraživanju apoptotski status tkiva procenjen je na osnovu odnosa ekspresije proapoptotskog gena *BAX* i antiapoptotskog gena *BCL2*. Odnos ekspresije ovih gena često se koristi kao relevantan marker sklonosti ćelija ka apoptozi (148, 149).

Pošto ceramidi posreduju u zaustavljanju ćelijskog ciklusa i indukciji ćelijske smrti kao odgovor na stres, a AC je odgovorna za njihovu razgradnju, u ovoj studiji je ispitivana njihova povezanost sa apoptotskim statusom tumorskog tkiva. Dodatno je analizirana povezanost sfingomijelina, kao i ekspresija *ASAH1* gena. Nasuprot sfingomijelinima, za CER C20, CER C22 i CER C24 je pokazana pozitivna korelacija, odnosno sa povećanjem koncentracija ovih ceramida raste *BAX/BCL2* odnos. Pozitivna korelacija ceramida sa apoptotskim potencijalom tumorskog tkiva može se očekivati, imajući u vidu njihovu ulogu tumorsupresora i učestvovanje u apoptozi (102, 103). Ovi rezultati ukazuju da održavanje niskih cirkulišućih nivoa proapoptotskih ceramida može biti povezano sa preživljavanjem tumorskih ćelija, čime se podržava uključenost sfingolipidnih vrsta u biologiju karcinoma rektuma. Prethodna *in vitro* studija pokazala je da ćelije karcinoma kolona HCT116 ekspimiraju proteine uključene u ćelijsku smrt i zaustavljanje rasta kao odgovor na tretman ceramidima (128). Takođe, dobijeni rezultati podržavaju raniji nalaz da uticaj ceramida na rast i preživljavanje ćelija karcinoma zavisi od dužine lanca masne kiseline (118).

Za razliku od ceramida, za AC je pokazana negativna korelacija sa *BAX/BCL2* odnosom u tumorskom tkivu, dok za gen *ASAH1* nije uočena povezanost. Niži nivo AC može podstaći apoptozu dopuštajući akumulaciju ceramida, budući da se oni ne razgrađuju. Ovi rezultati ukazuju na mogućnost da sistemska merenja specifičnih ceramida i AC mogu pružiti uvid u apoptotsku aktivnost tumora. Međutim, neophodna su dalja istraživanja na većem broju ispitanika kako bi se potvrdila uočena povezanost. Takođe, iako merenje ekspresije proapoptotskih i antiapoptotskih gena ili proteina može pružiti značajne informacije o apoptotskom statusu tkiva, za sveobuhvatniju i pouzdaniju procenu apoptotskog statusa tkiva je neophodno analizirati apoptozu i na ćelijskom nivou, primenom metoda koje omogućavaju direktnu detekciju apoptotskih ćelija poput protočne citometrije. Ukoliko se ovi nalazi potvrde, odabrani sfingolipidni molekuli bi potencijalno mogli biti integrisani sa molekularnim analizama tkiva i drugim serumskim biomarkerima radi sveobuhvatnije procene apoptotskog potencijala tumora.

U tumorskom tkivu, koje se inicijalno karakterisalo izraženijim apoptotskim potencijalom, u odgovoru na nCRT je došlo do istovremenog povećanje ekspresije gena *BCL2* i smanjenje ekspresije gena *BAX*. Iako su pojedinačne promene u ekspresiji oba gena bile relativno malog intenziteta, njihov zbirni efekat doveo je do smanjenja prvobitno zabeleženog *BAX/BCL2* odnosa. Ovaj rezultat je bio u suprotnosti sa pretpostavkom da će nCRT dodatno pojačati apoptotski odgovor tumorskog tkiva, imajući u vidu njegov bazalni status. Umesto toga, došlo je do pomeranja ravnoteže u smeru smanjenja apoptotskog potencijala, što može ukazivati na aktivaciju mehanizama ćelijskog preživljavanja pod dejstvom terapije. Nasuprot tome, netumorsko tkivo je nakon terapije pokazalo trend povećanja *BAX/BCL2* odnosa, što je u skladu sa poznatim efektima citotoksične terapije na zdravo tkivo. Ipak, ove promene nisu dostigle statističku značajnost.

Treba napomenuti da je u tkivu meren ukupan signal ekspresije gena *BAX* i *BCL2*, bez mogućnosti razlikovanja doprinosa tumorskih ćelija i stromalnih, uključujući imunske ćelije. Takođe, dodatno ograničenje predstavlja nepostojanje jasno definisane granične vrednosti između visokog i niskog apoptotskog potencijala. Tumorsko tkivo pacijenata koji su bolje odgovorili na terapiju se inicijalno karakterisao nižim vrednostima *BAX/BCL2*. Dobijeni rezultati ukazuju na složenost regulacije apoptoze u uslovima terapijskog stresa, što podržava koncept da je terapijski odgovor povezan sa dinamikom apoptotskog odgovora tumora i naglašava potrebu za daljim istraživanjima molekularnih mehanizama koji doprinose otpornosti tumorskog tkiva na terapijom indukovanoj apoptozi. Ovi nalazi takođe sugerišu da bi stratifikacija pacijenata prema bazalnom apoptotskom potencijalu mogla imati značaj u budućim studijama sa većim kohortama i preciznijim metodološkim pristupom.

Do sada je uloga metabolizma sfingolipida u odgovoru na nCRT razmatrana na malom broju studija. U ovom istraživanju nisu uočene razlike u nivoima učesnika sfingolipidnog metabolizma između pacijenata sa različitim odgovorom na nCRT. Prethodna studija je pokazala da kombinacija C6 CER sa adjuvantnom terapijom dovodi do mitohondrijalne produkcije reaktivnih kiseoničnih vrsta i oslobađanja citohroma c, uz indukciju apoptoze (150). U *in vitro* uslovima je pokazano da je razvoj rezistencije ćelija kolona DLD-1 na 5-FU povezan sa porastom sfingomijelina i smanjenjem ceramida (122). Takođe, pokazano je da se rezistentne tumorske ćelije kolona HT29 i Caco-2 karakterišu visokom ekspresijom enzima uključenih u konverziju ceramida u glikosfingolipide (128). Treba napomenuti da je, pored ekspresije na nivou gena i proteina, važno analizirati i aktivnost enzima, jer niža ekspresija uz visoku aktivnost može imati slične biološke posledice kao visoka ekspresija uz umerenu aktivnost. Stoga bi buduća istraživanja trebala da procenjuju i ekspresiju i aktivnost AC kako u serumu tako i u rektalnom tkivu, jer njihova kombinovana procena može pružiti značajniji uvid u terapijski odgovor i potencijal AC kao terapijskog targeta.

Analizom ukupnog preživljavanja ni za jedan od parametara nije pokazana statistički značajna povezanost sa rizikom smrtnog ishoda, odnosno učesnici sfingolipidnog metabolizma nisu bili povezani sa ukupnim preživljavanjem u Cox regresionoj analizi. Procene hazard odnosa iz Cox regresione analize treba tumačiti sa oprezom zbog ograničenog broja događaja, što smanjuje statističku snagu studije i mogućnost pouzdanog otkrivanja potencijalnih asocijacija. Uzimajući u obzir medijanu praćenja od približno 5 godina u ispitivanoj kohorti, udeo pacijenata koji su bili živi na kraju perioda praćenja (83,3%) je sličan prijavljenoj stopi petogodišnjeg ukupnog preživljavanja kod LARC (81,6%) (142). Manje razlike između studija mogu odražavati razlike u selekciji pacijenata, terapijskim protokolima ili dužini perioda praćenja.

Izostanak značajne povezanosti sa terapijskim odgovorom ili preživljavanjem može biti posledica relativno malog uzorka, malog broja pacijenata sa dobrim odgovorom, visokog ukupnog preživljavanja, kao i multifaktorijalne prirode tumorske biologije, koja uključuje složene molekularne interakcije i signalne puteve koji prevazilaze uticaj pojedinačnih biomarkera. Kod pacijenata sa slabijim terapijskim odgovorom, adaptivne promene u tkivu, uočene u ovoj studiji, mogle su doprineti otpornosti tumora. Trend ka povećanju ekspresije gena *ASAH1* može potencijalno dovesti do povećanja aktivnosti AC, što može uticati na smanjenje nivoa proapoptotskih ceramida i pospešiti proapoptotske i proproliferativne procese. Iako nije moguće tvrditi da promene u ceramidnom metabolizmu direktno uzrokuju uočene promene u odnosu *BAX/BCL2*, paralelna pojava ovih promena sugerise moguće sinergističke mehanizme u regulaciji preživljavanja tumorskih ćelija. Kombinacija molekularnih, biohemijskih i ćelijskih pristupa, uz analizu većeg broja pacijenata sa različitim terapijskim ishodima, mogla bi značajno doprineti preciznijem sagledavanju stvarnog biološkog efekta terapije i dubljem razumevanju mehanizama koji stoje u osnovi varijabilnog terapijskog odgovora. U tom kontekstu, integracija genomskih, transkriptomskih, proteomskih i metabolomskih podataka omogućila bi sveobuhvatan uvid u kompleksne mehanizme otpornosti na nCRT, kao i identifikaciju ključnih molekularnih puteva uključenih u odgovor na terapiju. Takav multidisciplinarni i integrativni pristup doprineo bi preciznijoj stratifikaciji pacijenata, optimizaciji izbora terapijskih strategija i daljem razvoju personalizovanog lečenja, što bi se u krajnjoj liniji odrazilo na poboljšanje terapijskih ishoda i kvaliteta života obolelih.

Najveći značaj ove doktorske disertacije se ogleda u tome što je bila usmerena isključivo na karcinom rektuma, dok su brojne prethodne studije ispitivale sfingolipidni metabolizam u karcinomu kolona ili kombinovale uzorke tkiva rektuma i kolona. Iz tog razloga, dobijeni rezultati najviše doprinose opštem razumevanju sfingolipidnog metabolizma u rektumu kao zasebnom entitetu creva. Iako nijedan od analiziranih parametara nije pokazao značajnu povezanost sa terapijskim odgovorom ili preživljavanjem, uloga metabolizma sfingolipida u karcinomu rektuma zahteva dalja istraživanja, posebno imajući u vidu ograničene podatke u dostupnoj literaturi. S obzirom na to da je metabolizam sfingolipida dinamičan proces podložan snažnom uticaju egzogenih faktora, buduća istraživanja trebala bi usmeriti ka procesima sinteze i razgradnje sfingolipida, kao i korelaciji metabolita i enzima

sa dijetarnim navikama i ostalim faktorima rizika za nastanak CRC. Da bi se bolje razumela povezanost sfingolipida sa ishodima bolesti i terapijskim odgovorom, potrebno je sprovesti analize na većem broju pacijenata i obuhvatiti i druge učesnike sfingolipidnog metabolizma.

## 6. ZAKLJUČCI

Na osnovu postavljenih ciljeva i dobijenih rezultata ove doktorske disertacije, izvedeni su sledeći zaključci:

1. Nivoi CER C18, CER C22 i CER C24, kao i SM C18 i SM C24 u serumu, značajno su sniženi kod pacijenata sa LARC u poređenju sa zdravim ispitanicima, što može odražavati prisustvo karcinoma rektuma.
2. Odsustvo korelacije analiziranih ceramida i sfingomijelina, izuzev SM C18, sa standardnim tumor markerima i parametrima inflamacije sugerise njihov potencijal da pružaju nezavisne informacije o tumoru.
3. Korelacija serumskih nivoa CER C20–C24 i AC sa apoptotskim statusom tumorskog tkiva ukazuje na potencijal njihove primene u indirektnoj, neinvazivnoj proceni apoptotske aktivnosti tumora.
4. Niži nivoi CER C16 i SM C16 u serumu pre primene nCRT mogu ukazivati na limfatičnu invaziju tretiranog tumora, što sugerise da odražavaju agresivnije biološke osobine rezidualnog tumora.
5. Ekspresija gena *ASAH1*, koji kodira AC, smanjena je u rektalnom tumorskom tkivu u odnosu na okolnu zdravu sluznicu, što ima pretežno funkcionalni, a ne biomarkerski značaj. Blago povećanje ekspresije pod dejstvom nCRT može odražavati adaptivne promene tumora.
6. Tumorsko tkivo pokazuje promenu apoptotskog potencijala u smeru smanjenja, što je verovatno posledica adaptivnih promena nastalih kao odgovor na nCRT.
7. Ni za jedan od analiziranih parametara sfingolipidnog metabolizma nije utvrđen prognostički značaj niti povezanost sa odgovorom na nCRT.
8. Za razjašnjenje značaja promena u metabolizmu sfingolipida u predikciji odgovora na nCRT su neophodna istraživanja na većem broju ispitanika, uz ujednačeniju zastupljenost pacijenata sa različitim odgovorima na terapiju.

## 7. LITERATURA

1. Filho AM, Laversanne M, Ferlay J, Colombet M, Piñeros M, Znaor A, et al. The GLOBOCAN 2022 cancer estimates: Data sources, methods, and a snapshot of the cancer burden worldwide. *Int J Cancer*. 2025;156(7):1336-46.
2. Siegel RL, Kratzer TB, Giaquinto AN, Sung H, Jemal A. Cancer statistics, 2025. *CA Cancer J Clin*. 2025;75(1):10-45.
3. Kuipers EJ, Grady WM, Lieberman D, Seufferlein T, Sung JJ, Boelens PG, et al. Colorectal cancer. *Nat Rev Dis Primers*. 2015;1:15065.
4. Nishida A, Andoh A. The Role of Inflammation in Cancer: Mechanisms of Tumor Initiation, Progression, and Metastasis. *Cells*. 2025;14(7).
5. Ogino S, Goel A. Molecular classification and correlates in colorectal cancer. *J Mol Diagn*. 2008;10(1):13-27.
6. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*. 1990;61(5):759-67.
7. Kasi A, Handa S, Bhatti S, Umar S, Bansal A, Sun W. Molecular Pathogenesis and Classification of Colorectal Carcinoma. *Curr Colorectal Cancer Rep*. 2020;16(5):97-106.
8. Itzkowitz SH, Yio X. Inflammation and cancer IV. Colorectal cancer in inflammatory bowel disease: the role of inflammation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2004;287(1):G7-17.
9. Yamamoto H, Imai K. Microsatellite instability: an update. *Arch Toxicol*. 2015;89(6):899-921.
10. Awosika JA, Gulley JL, Pastor DM. Deficient Mismatch Repair and Microsatellite Instability in Solid Tumors. *Int J Mol Sci*. 2025;26(9).
11. Jung G, Hernández-Illán E, Moreira L, Balaguer F, Goel A. Epigenetics of colorectal cancer: biomarker and therapeutic potential. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2020;17(2):111-30.
12. Fazeli MS, Keramati MR. Rectal cancer: a review. *Med J Islam Repub Iran*. 2015;29:171.
13. Krivokapic Z. Karcinom debelog creva-od prevencije preko karcinogeneze do metastaze: Zavod za udzbenike i Srpska akademija nauka i umetnosti; 2018. str. 146-160.
14. Roshandel G, Ghasemi-Kebria F, Malekzadeh R. Colorectal Cancer: Epidemiology, Risk Factors, and Prevention. *Cancers (Basel)*. 2024;16(8).
15. Murphy N, Strickler HD, Stanczyk FZ, Xue X, Wassertheil-Smoller S, Rohan TE, et al. A Prospective Evaluation of Endogenous Sex Hormone Levels and Colorectal Cancer Risk in Postmenopausal Women. *J Natl Cancer Inst*. 2015;107(10).
16. Bouras E, Papandreou C, Tzoulaki I, Tsilidis KK. Endogenous sex steroid hormones and colorectal cancer risk: a systematic review and meta-analysis. *Discov Oncol*. 2021;12(1):8.
17. Keivanlou MH, Amini-Salehi E, Joukar F, Letafatkar N, Habibi A, Norouzi N, et al. Family history of cancer as a potential risk factor for colorectal cancer in EMRO countries: a systematic review and meta-analysis. *Sci Rep*. 2023;13(1):17457.
18. Kolligs FT. Diagnostics and Epidemiology of Colorectal Cancer. *Visc Med*. 2016;32(3):158-64.
19. Waheed Janabi AH, Kamboh AA, Saeed M, Xiaoyu L, BiBi J, Majeed F, et al. Flavonoid-rich foods (FRF): A promising nutraceutical approach against lifespan-shortening diseases. *Iran J Basic Med Sci*. 2020;23(2):140-53.
20. Schatzkin A, Lanza E, Corle D, Lance P, Iber F, Caan B, et al. Lack of effect of a low-fat, high-fiber diet on the recurrence of colorectal adenomas. Polyp Prevention Trial Study Group. *N Engl J Med*. 2000;342(16):1149-55.
21. Alberts DS, Martínez ME, Roe DJ, Guillén-Rodríguez JM, Marshall JR, van Leeuwen JB, et al. Lack of effect of a high-fiber cereal supplement on the recurrence of colorectal adenomas. Phoenix Colon Cancer Prevention Physicians' Network. *N Engl J Med*. 2000;342(16):1156-62.

22. Chan, Annie OY, Tao, Ling, Chen, Guodong, et al. The association of dietary fiber intake with colorectal cancer and related risks: A literature review of recent research. *J Agric Food Res.* 2024;16:101140.
23. O'Keefe SJ. Diet, microorganisms and their metabolites, and colon cancer. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2016;13(12):691-706.
24. Hodge AM, Williamson EJ, Bassett JK, MacInnis RJ, Giles GG, English DR. Dietary and biomarker estimates of fatty acids and risk of colorectal cancer. *Int J Cancer.* 2015;137(5):1224-34.
25. Willett WC, Stampfer MJ, Colditz GA, Rosner BA, Speizer FE. Relation of meat, fat, and fiber intake to the risk of colon cancer in a prospective study among women. *N Engl J Med.* 1990;323(24):1664-72.
26. Gram IT, Park SY, Wilkens LR, Haiman CA, Le Marchand L. Smoking-Related Risks of Colorectal Cancer by Anatomical Subsite and Sex. *Am J Epidemiol.* 2020;189(6):543-53.
27. Amitay EL, Carr PR, Jansen L, Roth W, Alwers E, Herpel E, et al. Smoking, alcohol consumption and colorectal cancer risk by molecular pathological subtypes and pathways. *Br J Cancer.* 2020;122(11):1604-10.
28. McNabb S, Harrison TA, Albanes D, Berndt SI, Brenner H, Caan BJ, et al. Meta-analysis of 16 studies of the association of alcohol with colorectal cancer. *Int J Cancer.* 2020;146(3):861-73.
29. Oyesanmi O, Snyder D, Sullivan N, Reston J, Treadwell J, Schoelles KM. Alcohol consumption and cancer risk: understanding possible causal mechanisms for breast and colorectal cancers. *Evid Rep Technol Assess (Full Rep).* 2010(197):1-151.
30. Lauby-Secretan B, Scoccianti C, Loomis D, Grosse Y, Bianchini F, Straif K, et al. Body Fatness and Cancer--Viewpoint of the IARC Working Group. *N Engl J Med.* 2016;375(8):794-8.
31. Bruning PF, Van Doorn J, Bonfrère JM, Van Noord PA, Korse CM, Linders TC, et al. Insulin-like growth-factor-binding protein 3 is decreased in early-stage operable pre-menopausal breast cancer. *Int J Cancer.* 1995;62(3):266-70.
32. Friedenreich CM, Neilson HK, Lynch BM. State of the epidemiological evidence on physical activity and cancer prevention. *Eur J Cancer.* 2010;46(14):2593-604.
33. Hursting SD, DiGiovanni J, Dannenberg AJ, Azrad M, Leroith D, Demark-Wahnefried W, et al. Obesity, energy balance, and cancer: new opportunities for prevention. *Cancer Prev Res (Phila).* 2012;5(11):1260-72.
34. Davidson KW, Barry MJ, Mangione CM, Cabana M, Caughey AB, Davis EM, et al. Screening for Colorectal Cancer: US Preventive Services Task Force Recommendation Statement. *JAMA.* 2021;325(19):1965-77.
35. Banković Lazarević D, Krivokapić Z, Barišić G, Jovanović V, Ilić D, Veljković M. Organized colorectal cancer screening in Serbia - the first round within 2013-2014. *Vojnosanit Pregl.* 2016;73(4):360-7.
36. Lee MW, Pourmorady JS, Laine L. Use of Fecal Occult Blood Testing as a Diagnostic Tool for Clinical Indications: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Am J Gastroenterol.* 2020;115(5):662-70.
37. Konrad G, Katz A. Are medication restrictions before FOBT necessary?: practical advice based on a systematic review of the literature. *Can Fam Physician.* 2012;58(9):939-48.
38. Caligiore P, Macrae FA, St John DJ, Rayner LJ, Legge JW. Peroxidase levels in food: relevance to colorectal cancer screening. *Am J Clin Nutr.* 1982;35(6):1487-9.
39. Yuan SY, Wu W, Fu J, Lang YX, Li JC, Guo Y, et al. Quantitative immunochemical fecal occult blood test for neoplasia in colon cancer screening. *J Dig Dis.* 2019;20(2):78-82.
40. Young GP, Cole SR. Which fecal occult blood test is best to screen for colorectal cancer? *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol.* 2009;6(3):140-1.
41. Wu CI, Tsai CC, Lu CC, Wu PC, Wu DC, Lin SY, et al. Diagnosis of occult blood in human feces using matrix-assisted laser desorption ionization/time-of-flight mass spectrometry. *Clin Chim Acta.* 2007;384(1-2):86-92.

42. Lidgard GP, Domanico MJ, Bruinsma JJ, Light J, Gagrat ZD, Oldham-Haltom RL, et al. Clinical performance of an automated stool DNA assay for detection of colorectal neoplasia. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2013;11(10):1313-8.
43. Imperiale TF, Ransohoff DF, Itzkowitz SH. Multitarget stool DNA testing for colorectal-cancer screening. *N Engl J Med*. 2014;371(2):187-8.
44. Jayasinghe M, Prathiraja O, Caldera D, Jena R, Coffie-Pierre JA, Silva MS, et al. Colon Cancer Screening Methods: 2023 Update. *Cureus*. 2023;15(4):e37509.
45. Crimi F, Lacognata C, Cecchin D, Zucchetta P, Pomerri F. Rectal cancer staging: An up-to-date pictorial review. *J Med Imaging Radiat Oncol*. 2018.
46. Sarma DP. Dukes' classification of rectal cancer. *South Med J*. 1988;81(3):407-8.
47. 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.
48. Amin MB, Greene FL, Edge SB, Compton CC, Gershenwald JE, Brookland RK, et al. The Eighth Edition AJCC Cancer Staging Manual: Continuing to build a bridge from a population-based to a more "personalized" approach to cancer staging. *CA Cancer J Clin*. 2017;67(2):93-9.
49. Kim S, Huh JW, Lee WY, Yun SH, Kim HC, Cho YB, et al. Prognostic Impact of Lymphatic Invasion, Venous Invasion, Perineural Invasion, and Tumor Budding in Rectal Cancer Treated With Neoadjuvant Chemoradiotherapy Followed by Total Mesorectal Excision. *Dis Colon Rectum*. 2023;66(7):905-13.
50. Wang Y, Zhang J, Zhou M, Yang L, Wan J, Shen L, et al. Poor prognostic and staging value of tumor deposit in locally advanced rectal cancer with neoadjuvant chemoradiotherapy. *Cancer Med*. 2019;8(4):1508-20.
51. Gani C, Kirschniak A, Zips D. Watchful Waiting after Radiochemotherapy in Rectal Cancer: When Is It Feasible? *Visc Med*. 2019;35(2):119-23.
52. Vodenkova S, Buchler T, Cervena K, Veskrnova V, Vodicka P, Vymetalkova V. 5-fluorouracil and other fluoropyrimidines in colorectal cancer: Past, present and future. *Pharmacol Ther*. 2020;206:107447.
53. Sawicki T, Ruszkowska M, Danielewicz A, Niedźwiedzka E, Arłukowicz T, Przybyłowicz KE. A Review of Colorectal Cancer in Terms of Epidemiology, Risk Factors, Development, Symptoms and Diagnosis. *Cancers (Basel)*. 2021;13(9).
54. Alcindor T, Beauger N. Oxaliplatin: a review in the era of molecularly targeted therapy. *Curr Oncol*. 2011;18(1):18-25.
55. Lamarca A, Palmer DH, Wasan HS, Ross PJ, Ma YT, Arora A, et al. Second-line FOLFOX chemotherapy versus active symptom control for advanced biliary tract cancer (ABC-06): a phase 3, open-label, randomised, controlled trial. *Lancet Oncol*. 2021;22(5):690-701.
56. Glynne-Jones R, Harrison M. FOLFOXIRI reintroduction in metastatic colorectal cancer. *Lancet Oncol*. 2020;21(4):468-9.
57. Mahipal A, Grothey A. Role of Biologics in First-Line Treatment of Colorectal Cancer. *J Oncol Pract*. 2016;12(12):1219-28.
58. Fuchs C, Mitchell EP, Hoff PM. Irinotecan in the treatment of colorectal cancer. *Cancer Treat Rev*. 2006;32(7):491-503.
59. Petitprez A, Poindessous V, Ouaret D, Regairaz M, Bastian G, Guérin E, et al. Acquired irinotecan resistance is accompanied by stable modifications of cell cycle dynamics independent of MSI status. *Int J Oncol*. 2013;42(5):1644-53.
60. Ellis LM. Mechanisms of action of bevacizumab as a component of therapy for metastatic colorectal cancer. *Semin Oncol*. 2006;33(5 Suppl 10):S1-7.
61. Siegel RL, Wagle NS, Cercek A, Smith RA, Jemal A. Colorectal cancer statistics, 2023. *CA Cancer J Clin*. 2023;73(3):233-54.
62. Mendis S, To YH, Tie J. Biomarkers in Locally Advanced Rectal Cancer: A Review. *Clin Colorectal Cancer*. 2022;21(1):36-44.

63. Airoidi M, Roselló S, Tarazona N, Huerta M, Pérez-Santiago L, Fleitas T, et al. Advances in the management of locally advanced rectal cancer: A shift toward a patient-centred approach to balance outcomes and quality of life. *Cancer Treat Rev.* 2025;140:103015.
64. Wang C, Liu X, Wang W, Miao Z, Li X, Liu D, et al. Treatment Options for Distal Rectal Cancer in the Era of Organ Preservation. *Curr Treat Options Oncol.* 2024;25(4):434-52.
65. Mandard AM, Dalibard F, Mandard JC, Marnay J, Henry-Amar M, Petiot JF, et al. Pathologic assessment of tumor regression after preoperative chemoradiotherapy of esophageal carcinoma. Clinicopathologic correlations. *Cancer.* 1994;73(11):2680-6.
66. Camp ER, Patterson LD, Kester M, Voelkel-Johnson C. Therapeutic implications of bioactive sphingolipids: A focus on colorectal cancer. *Cancer Biol Ther.* 2017;18(9):640-50.
67. Group. BDW. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther.* 2001;69(3):89-95.
68. 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.
69. Estey MP, Kim MS, Trimble WS. Septins. *Curr Biol.* 2011;21(10):R384-7.
70. Hu J, Hu B, Gui YC, Tan ZB, Xu JW. Diagnostic Value and Clinical Significance of Methylated SEPT9 for Colorectal Cancer: A Meta-Analysis. *Med Sci Monit.* 2019;25:5813-22.
71. Chung DC, Gray DM, Singh H, Issaka RB, Raymond VM, Eagle C, et al. A Cell-free DNA Blood-Based Test for Colorectal Cancer Screening. *N Engl J Med.* 2024;390(11):973-83.
72. Van Roosbroeck K, Calin GA. Cancer Hallmarks and MicroRNAs: The Therapeutic Connection. *Adv Cancer Res.* 2017;135:119-49.
73. Bagheri R, Ghorbian M, Ghorbian S. Tumor circulating biomarkers in colorectal cancer. *Cancer Treat Res Commun.* 2024;38:100787.
74. Clancy C, Joyce MR, Kerin MJ. The use of circulating microRNAs as diagnostic biomarkers in colorectal cancer. *Cancer Biomark.* 2015;15(2):103-13.
75. Precazzini F, Detassis S, Imperatori AS, Denti MA, Campomenosi P. Measurements Methods for the Development of MicroRNA-Based Tests for Cancer Diagnosis. *Int J Mol Sci.* 2021;22(3).
76. Xie H, Wei L, Liu M, Liang Y, Wang Q, Tang S, et al. The value of carcinoembryonic antigen stage in staging, prognosis, and management of colorectal cancer: results from two cohort studies. *Front Oncol.* 2023;13:1268783.
77. Thirunavukarasu P, Sukumar S, Sathaiah M, Mahan M, Pragatheeshwar KD, Pingpank JF, et al. C-stage in colon cancer: implications of carcinoembryonic antigen biomarker in staging, prognosis, and management. *J Natl Cancer Inst.* 2011;103(8):689-97.
78. Eso Y, Shimizu T, Takeda H, Takai A, Marusawa H. Microsatellite instability and immune checkpoint inhibitors: toward precision medicine against gastrointestinal and hepatobiliary cancers. *J Gastroenterol.* 2020;55(1):15-26.
79. Boland CR, Goel A. Microsatellite instability in colorectal cancer. *Gastroenterology.* 2010;138(6):2073-87.e3.
80. Prior IA, Lewis PD, Mattos C. A comprehensive survey of Ras mutations in cancer. *Cancer Res.* 2012;72(10):2457-67.
81. Morkel M, Riemer P, Bläker H, Sers C. Similar but different: distinct roles for KRAS and BRAF oncogenes in colorectal cancer development and therapy resistance. *Oncotarget.* 2015;6(25):20785-800.
82. Ji D, Qiao M, Yao Y, Li M, Chen H, Dong Q, et al. Serum-based microRNA signature predicts relapse and therapeutic outcome of adjuvant chemotherapy in colorectal cancer patients. *EBioMedicine.* 2018;35:189-97.
83. Kim JK, Alden AJ, Knaus S, Thakkar R, Moudgill L, Chudzinski A, et al. Circulating Tumor DNA Detects Minimal Residual Disease in Patients with Locally Advanced Rectal Cancer After Total Neoadjuvant Therapy. *Cancers (Basel).* 2025;17(15).
84. Futerman AH, Hannun YA. The complex life of simple sphingolipids. *EMBO Rep.* 2004;5(8):777-82.

85. Kuo A, Hla T. Regulation of cellular and systemic sphingolipid homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2024;25(10):802-21.
86. Fahy E, Subramaniam S, Brown HA, Glass CK, Merrill AH, Murphy RC, et al. A comprehensive classification system for lipids. *J Lipid Res.* 2005;46(5):839-61.
87. A Treatise on the Chemical Constitution of the Brain: Based Throughout upon Original Researches. *Glasgow Med J.* 1884;22(5):363-4.
88. Alessenko AV, Albi E. Exploring Sphingolipid Implications in Neurodegeneration. *Front Neurol.* 2020;11:437.
89. Smith ER, Merrill AH, Obeid LM, Hannun YA. Effects of sphingosine and other sphingolipids on protein kinase C. *Methods Enzymol.* 2000;312:361-73.
90. Maceyka M, Harikumar KB, Milstien S, Spiegel S. Sphingosine-1-phosphate signaling and its role in disease. *Trends Cell Biol.* 2012;22(1):50-60.
91. Zammit PS, Partridge TA, Yablonka-Reuveni Z. The skeletal muscle satellite cell: the stem cell that came in from the cold. *J Histochem Cytochem.* 2006;54(11):1177-91.
92. Merrill AH, Wang MD, Park M, Sullards MC. (Glyco)sphingolipidology: an amazing challenge and opportunity for systems biology. *Trends Biochem Sci.* 2007;32(10):457-68.
93. Hannun YA, Obeid LM. Sphingolipids and their metabolism in physiology and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2018;19(3):175-91.
94. Schenck M, Carpinteiro A, Grassmé H, Lang F, Gulbins E. Ceramide: physiological and pathophysiological aspects. *Arch Biochem Biophys.* 2007;462(2):171-5.
95. Kitatani K, Idkowiak-Baldys J, Hannun YA. The sphingolipid salvage pathway in ceramide metabolism and signaling. *Cell Signal.* 2008;20(6):1010-8.
96. Goñi FM, Alonso A. Sphingomyelinases: enzymology and membrane activity. *FEBS Lett.* 2002;531(1):38-46.
97. Snider JM, Snider AJ, Obeid LM, Luberto C, Hannun YA. Probing de novo sphingolipid metabolism in mammalian cells utilizing mass spectrometry. *J Lipid Res.* 2018;59(6):1046-57.
98. Hannun YA, Obeid LM. Many ceramides. *J Biol Chem.* 2011;286(32):27855-62.
99. Mencarelli C, Martinez-Martinez P. Ceramide function in the brain: when a slight tilt is enough. *Cell Mol Life Sci.* 2013;70(2):181-203.
100. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol.* 2007;35(4):495-516.
101. Young MM, Kester M, Wang HG. Sphingolipids: regulators of crosstalk between apoptosis and autophagy. *J Lipid Res.* 2013;54(1):5-19.
102. Ganesan V, Colombini M. Regulation of ceramide channels by Bcl-2 family proteins. *FEBS Lett.* 2010;584(10):2128-34.
103. Siskind LJ, Feinstein L, Yu T, Davis JS, Jones D, Choi J, et al. Anti-apoptotic Bcl-2 Family Proteins Disassemble Ceramide Channels. *J Biol Chem.* 2008;283(11):6622-30.
104. Kikas P, Chalikias G, Tziakas D. Cardiovascular Implications of Sphingomyelin Presence in Biological Membranes. *Eur Cardiol.* 2018;13(1):42-5.
105. Lingwood D, Simons K. Lipid rafts as a membrane-organizing principle. *Science.* 2010;327(5961):46-50.
106. Iqbal J, Walsh MT, Hammad SM, Hussain MM. Sphingolipids and Lipoproteins in Health and Metabolic Disorders. *Trends Endocrinol Metab.* 2017;28(7):506-18.
107. Bajwa H, Azhar W. Niemann-Pick Disease. [Updated 2023 Mar 6]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2025 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK556129/>
108. Maceyka M, Sankala H, Hait NC, Le Stunff H, Liu H, Toman R, et al. SphK1 and SphK2, sphingosine kinase isoenzymes with opposing functions in sphingolipid metabolism. *J Biol Chem.* 2005;280(44):37118-29.
109. Serra M, Saba JD. Sphingosine 1-phosphate lyase, a key regulator of sphingosine 1-phosphate signaling and function. *Adv Enzyme Regul.* 2010;50(1):349-62.

110. van Meel E, Bos E, van der Lienden MJC, Overkleeft HS, van Kasteren SI, Koster AJ, et al. Localization of active endogenous and exogenous  $\beta$ -glucocerebrosidase by correlative light-electron microscopy in human fibroblasts. *Traffic*. 2019;20(5):346-56.
111. Diaz Escarcega R, McCullough LD, Tsvetkov AS. The Functional Role of Sphingosine Kinase 2. *Front Mol Biosci*. 2021;8:683767.
112. Jamil M, Cowart LA. Sphingolipids in mitochondria-from function to disease. *Front Cell Dev Biol*. 2023;11:1302472.
113. Park JH, Schuchman EH. Acid ceramidase and human disease. *Biochim Biophys Acta*. 2006;1758(12):2133-8.
114. Vijayan Y, James S, Viswanathan A, Aparna JS, Bindu A, Namitha NN, et al. Targeting acid ceramidase enhances antitumor immune response in colorectal cancer. *J Adv Res*. 2024;65:73-87.
115. Nixon GF. Sphingolipids in inflammation: pathological implications and potential therapeutic targets. *Br J Pharmacol*. 2009;158(4):982-93.
116. Newton J, Lima S, Maceyka M, Spiegel S. Revisiting the sphingolipid rheostat: Evolving concepts in cancer therapy. *Exp Cell Res*. 2015;333(2):195-200.
117. Separovic D, Shields AF, Philip PA, Bielawski J, Bielawska A, Pierce JS, et al. Altered Levels of Serum Ceramide, Sphingosine and Sphingomyelin Are Associated with Colorectal Cancer: A Retrospective Pilot Study. *Anticancer Res*. 2017;37(3):1213-8.
118. Sedić M, Grbčić P, Pavelić SK. Bioactive Sphingolipids as Biomarkers Predictive of Disease Severity and Treatment Response in Cancer: Current Status and Translational Challenges. *Anticancer Res*. 2019;39(1):41-56.
119. Markowski AR, Błachnio-Zabielska AU, Guzińska-Ustymowicz K, Markowska A, Pogodzińska K, Roszczyk K, et al. Ceramides Profile Identifies Patients with More Advanced Stages of Colorectal Cancer. *Biomolecules*. 2020;10(4).
120. Machala M, Procházková J, Hofmanová J, Králiková L, Slavík J, Tylichová Z, et al. Colon Cancer and Perturbations of the Sphingolipid Metabolism. *Int J Mol Sci*. 2019;20(23).
121. Ryland LK, Fox TE, Liu X, Loughran TP, Kester M. Dysregulation of sphingolipid metabolism in cancer. *Cancer Biol Ther*. 2011;11(2):138-49.
122. Klobučar M, Grbčić P, Pavelić SK, Jonjić N, Visentin S, Sedić M. Acid ceramidase inhibition sensitizes human colon cancer cells to oxaliplatin through downregulation of transglutaminase 2 and  $\beta$ 1 integrin/FAK-mediated signalling. *Biochem Biophys Res Commun*. 2018;503(2):843-8.
123. Clifford RE, Govindarajah N, Bowden D, Sutton P, Glenn M, Darvish-Damavandi M, et al. Targeting Acid Ceramidase to Improve the Radiosensitivity of Rectal Cancer. *Cells*. 2020;9(12).
124. Bowden DL, Sutton PA, Wall MA, Jithesh PV, Jenkins RE, Palmer DH, et al. Proteomic profiling of rectal cancer reveals acid ceramidase is implicated in radiation response. *J Proteomics*. 2018;179:53-60.
125. Aslan M, Kırac E, Kaya S, Özcan F, Salim O, Küpesiz OA. Decreased Serum Levels of Sphingomyelins and Ceramides in Sickle Cell Disease Patients. *Lipids*. 2018;53(3):313-22.
126. Özer H, Aslan İ, Oruç MT, Çöpelci Y, Afşar E, Kaya S, et al. Early postoperative changes of sphingomyelins and ceramides after laparoscopic sleeve gastrectomy. *Lipids Health Dis*. 2018;17(1):269.
127. Shen S, Yang L, Li L, Bai Y, Cai C, Liu H. A plasma lipidomics strategy reveals perturbed lipid metabolic pathways and potential lipid biomarkers of human colorectal cancer. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2017;1068-1069:41-8.
128. García-Barros M, Coant N, Truman JP, Snider AJ, Hannun YA. Sphingolipids in colon cancer. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1841(5):773-82.
129. Kurek K, Łukaszuk B, Świdnicka-Siergiejko A, Rogalski P, Wróblewski E, Chabowski A, et al. Sphingolipid metabolism in colorectal adenomas varies depending on histological architecture of polyps and grade of nuclear dysplasia. *Lipids*. 2015;50(4):349-58.
130. Fhaner CJ, Liu S, Ji H, Simpson RJ, Reid GE. Comprehensive lipidome profiling of isogenic primary and metastatic colon adenocarcinoma cell lines. *Anal Chem*. 2012;84(21):8917-26.

131. Leibovitz A, Stinson JC, McCombs WB, McCoy CE, Mazur KC, Mabry ND. Classification of human colorectal adenocarcinoma cell lines. *Cancer Res.* 1976;36(12):4562-9.
132. de Toledo M, Anguille C, Roger L, Roux P, Gadea G. Cooperative anti-invasive effect of Cdc42/Rac1 activation and ROCK inhibition in SW620 colorectal cancer cells with elevated blebbing activity. *PLoS One.* 2012;7(11):e48344.
133. Jang SW, Park WJ, Min H, Kwon TK, Baek SK, Hwang I, et al. Altered mRNA expression levels of the major components of sphingolipid metabolism, ceramide synthases and their clinical implication in colorectal cancer. *Oncol Rep.* 2018;40(6):3489-500.
134. Espinoza KS, Snider AJ. Therapeutic Potential for Sphingolipids in Inflammatory Bowel Disease and Colorectal Cancer. *Cancers (Basel).* 2024;16(4).
135. Markowski AR, Błachnio-Zabielska AU, Pogodzińska K, Markowska AJ, Zabielski P. Diverse Sphingolipid Profiles in Rectal and Colon Cancer. *Int J Mol Sci.* 2023;24(13).
136. Coant N, Sakamoto W, Mao C, Hannun YA. Ceramidases, roles in sphingolipid metabolism and in health and disease. *Adv Biol Regul.* 2017;63:122-31.
137. Leonetti D, Estéphan H, Ripoche N, Dubois N, Aguesse A, Gouard S, et al. Secretion of Acid Sphingomyelinase and Ceramide by Endothelial Cells Contributes to Radiation-Induced Intestinal Toxicity. *Cancer Res.* 2020;80(12):2651-62.
138. Furukawa S, Hiraki M, Kimura N, Kohya N, Sakai M, Ikubo A, et al. The Potential of the C-Reactive Protein-Albumin-Lymphocyte (CALLY) Index as a Prognostic Biomarker in Colorectal Cancer. *Cancer Diagn Progn.* 2025;5(3):370-7.
139. Yang M, Lin SQ, Liu XY, Tang M, Hu CL, Wang ZW, et al. Association between C-reactive protein-albumin-lymphocyte (CALLY) index and overall survival in patients with colorectal cancer: From the investigation on nutrition status and clinical outcome of common cancers study. *Front Immunol.* 2023;14:1131496.
140. Takeda Y, Sugano H, Okamoto A, Nakano T, Shimoyama Y, Takada N, et al. Prognostic usefulness of the C-reactive protein-albumin-lymphocyte (CALLY) index as a novel biomarker in patients undergoing colorectal cancer surgery. *Asian J Surg.* 2024;47(8):3492-8.
141. Wu B, Liu J, Shao C, Yu D, Liao J. Integrating inflammation, nutrition, and immunity: the CALLY index as a prognostic tool in digestive system cancers - a systematic review and meta-analysis. *BMC Cancer.* 2025;25(1):672.
142. Gabbani M, Giorgi C, Napoli G, Tebano U, Perrone MS, Missiroli S, et al. Outcomes of Locally Advanced Rectal Cancer Patients Treated with Total Neoadjuvant Treatment: A Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *Clin Colorectal Cancer.* 2022;21(4):297-308.
143. Pettus BJ, Chalfant CE, Hannun YA. Ceramide in apoptosis: an overview and current perspectives. *Biochim Biophys Acta.* 2002;1585(2-3):114-25.
144. Alizadeh J, da Silva Rosa SC, Weng X, Jacobs J, Lorzadeh S, Ravandi A, et al. Ceramides and ceramide synthases in cancer: Focus on apoptosis and autophagy. *Eur J Cell Biol.* 2023;102(3):151337.
145. Vijayan Y, Lankadasari MB, Harikumar KB. Acid Ceramidase: A Novel Therapeutic Target in Cancer. *Curr Top Med Chem.* 2019;19(17):1512-20.
146. Zeidan YH, Jenkins RW, Korman JB, Liu X, Obeid LM, Norris JS, et al. Molecular targeting of acid ceramidase: implications to cancer therapy. *Curr Drug Targets.* 2008;9(8):653-61.
147. Scopa CD, Vagianos C, Kardamakias D, Kourelis TG, Kalofonos HP, Tsamandas AC. bcl-2/bax ratio as a predictive marker for therapeutic response to radiotherapy in patients with rectal cancer. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2001;9(4):329-34.
148. Khodapasand E, Jafarzadeh N, Farrokhi F, Kamalidehghan B, Houshmand M. Is Bax/Bcl-2 ratio considered as a prognostic marker with age and tumor location in colorectal cancer? *Iran Biomed J.* 2015;19(2):69-75.
149. Szymona K, Dudzińska E, Karakuła-Juchnowicz H, Gil-Kulik P, Chomik P, Świstowska M, et al. Analysis of the expression of BAX, BCL2, BIRC6, CASP3, CASP9 apoptosis genes during the first episode of schizophrenia. *Psychiatr Pol.* 2019;53(6):1293-303.

150. Sakamoto W, Coant N, Canals D, Obeid LM, Hannun YA. Functions of neutral ceramidase in the Golgi apparatus. *J Lipid Res.* 2018;59(11):2116-25.

## Lista skraćenica

5-FU	5-fluorouracil
AC	kisela ceramidaza (eng. <i>acid ceramidase</i> )
ACTB	aktin beta (eng. <i>actin beta</i> )
AJCC	Američki zajednički komitet za rak (eng. <i>American Joint Committee on Cancer</i> )
ALT	alanin-aminotransferaza (eng. <i>alanine aminotransferase</i> )
ALP	alkalna fosfataza (eng. <i>alkaline phosphatase</i> )
aPTT	aktivirano parcijalno tromboplastinsko vreme (eng. <i>activated partial thromboplastin time</i> )
ASAH1	eng. <i>N-acylsphingosine amidohydrolase 1</i>
AUC	površina ispod krive (eng. <i>area under the curve</i> )
BAX	eng. <i>BCL2 associated X, apoptosis regulator</i>
BCL2	eng. <i>BCL2 apoptosis regulator</i>
bp	bazni par
CA 15-3	karcinomski antigen 15-3 (eng. <i>cancer antigen 15-3</i> )
CA 19-9	karbohidratni antigen 19-9 (eng. <i>carbohydrate antigen 19-9</i> )
CA 72-4	karcinomski antigen 72-4 (eng. <i>cancer antigen 72-4</i> )
CALLY	eng. <i>C-reactive protein-albumin-lymphocyte index</i>
CEA	karcino-embrionalni antigen (eng. <i>carcinoembryonic antigen</i> )
CER	ceramid
CIMP	fenotip nastao metilacijom CpG ostrvaca (eng. <i>CpG island methylator phenotype</i> )
CI	interval poverenja (eng. <i>confidence interval</i> )
cDNK	komplementarna DNK (eng. <i>complementary DNA</i> )
CMIA	eng. <i>chemiluminescent microparticle immunoassay</i>
CRC	kolorektalni karcinom (eng. <i>colorectal cancer</i> )
CRP	C-reaktivni protein (eng. <i>C-reactive protein</i> )
CT	kompjuterizovana tomografija (eng. <i>computed tomography</i> )
C1P	ceramid-1-fosfat (eng. <i>ceramide-1-phosphate</i> )
dMMR	deficit MMR sistema (eng. <i>deficient mismatch repair</i> )

EDTA	etilendiamintetrasirćetna kiselina (eng. <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i> )
EGFR	receptor za epidermalni faktor rasta (eng. <i>epithelial growth factor receptor</i> )
ECLIA	elektrohemiluminiscentna imunoanaliza (eng. <i>electrochemiluminescence immunoassay</i> )
ELISA	enzimatski imunoadsorbentni test (eng. <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i> )
ERUS	endorektalne ultrasonografije (eng. <i>endorectal ultrasonography</i> )
FDA	Uprava za hranu i lekove (eng. <i>Food and Drug Administration</i> )
FAP	familijarna adenomatozna polipoza (eng. <i>familial adenomatous polyposis</i> )
FIT	fekalni imunohemijski testovi (eng. <i>fecal immunochemical test</i> )
FOBT	test na okultno krvarenje u stolici (eng. <i>fecal occult blood test</i> )
HDL	lipoprotein visoke gustine (eng. <i>high-density lipoprotein</i> )
HGNC	eng. <i>HUGO Gene Nomenclature Committee</i>
HR	eng. <i>hazard ratio</i>
LC/MS-MS	tečna hromatografija spregnuta sa masenom spektrometrijom (eng. <i>liquid chromatography–mass spectrometry</i> )
LDL	lipoprotein niske gustine (eng. <i>low-density lipoprotein</i> )
LARC	lokalno uznapredovali rektalni karcinom (eng. <i>locally advanced rectal cancer</i> )
miRNK	mikro-RNK
MSI	mikrosatelitska nestabilnost (eng. <i>microsatellite instability</i> )
MMR	mehanizam reparacije pogrešno sparenih baza (eng. <i>mismatch repair</i> )
MRI	magnetna rezonanca (eng. <i>magnetic resonance imaging</i> )
nCRT	neoadjuvantna hemioradioterapija (eng. <i>neoadjuvant chemoradiotherapy</i> )
PT	protrombinsko vreme (eng. <i>prothrombin time</i> )
qRT-PCR	kvantitativna reakcija lančanog umnožavanja u realnom vremenu (eng. <i>quantitative real time polymerase chain reaction</i> )
READ	karcinom rektuma (eng. <i>Rectum Adenocarcinoma</i> )
ROC	ROC kriva (eng. <i>receiver operating characteristic</i> )
SD	standardna devijacija
SM	Sfingomijelin
S1P	sfingozin-1-fosfat (eng. <i>sphingosine-1-phosphate</i> )

TNF- $\alpha$	faktor nekroze tumora (eng. <i>tumor necrosis factor alpha</i> )
TNM	eng. <i>tumor, node, metastasis</i>
TRG	stepen tumorske regresije (eng. <i>tumor regression grade</i> )
VLDL	lipoprotein veoma niske gustine (eng. <i>very low-density lipoprotein</i> )

**Publikovani radovi iz teze:**

1. Bjelanovic J, Nikolic A, Aslan M, Miladinov M, Kotur N, Barisic G, Dragicevic S. Altered levels of sphingolipid metabolites in serum of locally advanced rectal cancer patients: A pilot study. *J Med Biochem.* 2025 Jun 13;44(3):524-533. doi: 10.5937/jomb0-55113.
2. Bjelanovic J, Zeljic K, Miladinov M, Barisic G, Dragicevic S. Acid ceramidase expression and biomarker potential in patients with locally advanced rectal cancer. *Biomol Biomed.* 2025 Nov 28;26(6):924-932. doi: 10.17305/bb.2025.13275.
3. Bjelanovic J, Barisic G, Dragicevic S. Tradicionalni i novi prediktivni biomarkeri u različitim stadijumima karcinoma rektuma. *Medicinski podmladak.* 2026 doi: 10.5937/mp80-62844

## **BIOGRAFIJA AUTORA**

Jasna Bjelanović rođena je 4. februara 1978. godine u Kruševcu, gde je završila osnovnu školu i Gimnaziju. Studije Medicinske biohemije na Farmaceutskom fakultetu Univerziteta u Beogradu upisala je školske 1996/1997. godine, a završila aprila 2002. godine sa prosečnom ocenom 8,81. Specijalističke studije iz Medicinske biohemije završila je juna 2012. godine sa ocenom 10,00, a studije uže specijalizacije iz kliničke imunohemije jula 2021. godine sa ocenom 10,00 na Farmaceutskom fakultetu UB. Doktorske akademske studije na Medicinskom fakultetu UB, modul Biologija tumora i oksidativna oboljenja, upisala je školske 2016/2017. godine i položila sve ispite predviđene programom. Od aprila 2002. godine zaposlena je u Centru za medicinsku biohemiju, Univerzitetskog kliničkog centra Srbije. Član je Komore biohemičara Srbije, Društva medicinskih biohemičara Srbije, Evropske federacije za kliničku hemiju i laboratorijsku medicine i Registra evropskih specijalista laboratorijske medicine. Do sada je učestvovala kao autor/koautor na 5 radova objavljenih u međunarodnim časopisima i aktivni učesnik/predavač na nekoliko skupova od nacionalnog značaja.

## Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Јасна Бјелановић

Број индекса 2016/5091

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Анализа предиктивног значаја промена у метаболизму сфинголипида код пацијената са локално узрапредовалим карциномом ректума

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

Потпис аутора

У Београду, 3. 3. 2026.

---

**Изјава о истоветности штампане и електронске верзије  
докторског рада**

Име и презиме аутора Јасна Бјелановић

Број индекса 2016/5091

Наслов рада Анализа предиктивног значаја промена у метаболизму сфинголипида код пацијената са локално унапредовалим карциномом ректума

Ментор проф. др Горан Баришић и виши научни сарадник др Сандра Драгичевић

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

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

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

**Потпис аутора**

У Београду, 3. 3. 2026.

---

## Изјава о коришћењу

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

Анализа предиктивног значаја промена у метаболизму сфинголипида код пацијената са локално узрапредовалим карциномом ректума

која је моје ауторско дело.

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

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

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прераде (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

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

**Потпис аутора**

У Београду, 3. 3. 2026.

---