

UNIVERZITET U BEOGRADU
FARMACEUTSKI FAKULTET
11000 BEOGRAD
Ul. Vojvode Stepe 450
01 broj 1131/3
10.9.2020. godine

Na osnovu člana 28. Statuta Univerziteta u Beogradu - Farmaceutskog fakulteta i predloga Komisije za poslediplomske studije – doktorske studije, Nastavno-naučno veće Farmaceutskog fakulteta u Beogradu na sednici održanoj 10. 9. 2020. godine, donelo je

ODLUKU

PRIHVATA SE izveštaj Komisije za ocenu ispunjenosti uslova kandidata **mag. farmacije – medicinskog biohemičara Mihajlović Marije** i naučne zasnovanosti teme za izradu doktorske disertacije pod naslovom:

„Multimarkerski pristup u proceni značaja potencijalnih lipidnih i inflamatornih biomarkera kolorektalnog karcinoma“

i upućuje Veću naučnih oblasti medicinskih nauka Univerziteta u Beogradu na usvajanje, a po dobijenoj pisanoj saglasnosti odobrava izradu doktorske disertacije.

Odluku dostaviti: imenovanoj, Univerzitetu, dekanu, prodekanu za poslediplomsku nastavu i kontinuiranu edukaciju, sekretaru, Odseku za nastavu i studentska pitanja, poslovnom sekretaru i arhivi.

**PREDSEDNIK
NASTAVNO-NAUČNOG VEĆA
FARMACEUTSKOG FAKULTETA**

Prof. dr Slađana Šobajić

Факултет Фармацеутски факултет

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ

1131/3
(Број захтева)

Већу научних области медицинских наука
(Назив већа научне области коме се захтев
упућује)

10.9.2020.
(Датум)

ЗАХТЕВ

за давање сагласности на предлог теме докторске дисертације за кандидата на докторским студијама

Молимо да, сходно члану 47. ст. 5. тач. 3. Статута Универзитета у Београду ("Гласник Универзитета", број 162/11-пречишћени текст, 167/12 и 172/13), дате сагласност на предлог теме докторске дисертације:

„Мултимаркерски приступ у процени значаја потенцијалних липидних и инфламаторних биомаркера
колоректалног карцинома“

(пун назив предложене теме докторске дисертације)

НАУЧНА ОБЛАСТ Медицинска биохемија

ПОДАЦИ О КАНДИДАТУ:

1. Име , име једног од родитеља и презиме кандидата:
Марија, Дарко, Михајловић

2. Претходно образовање (назив и седиште факултета, студијски програм):
Фармација-медицинска биохемија

Универзитет у Београду-
Фармацеутски факултет;

3. Година дипломирања: 2013.

4. Година уписа на докторске студије: 2014/2015

5. Назив студијског програма докторских студија: Фармацеутске науке, модул Медицинска биохемија

ПОДАЦИ О МЕНТОРУ:

Име и презиме ментора: др сц. Александра Зељковић

Звање: ванредни професор

Списак радова који квалификују ментора за вођење докторске дисертације:

1. Vekic J, **Zeljko** A, Stefanovic A, Jelic-Ivanovic Z, Spasojevic-Kalimanovska V. Obesity and dyslipidemia. *Metabolism* 2019; 92: 71-81.
2. Janac J, **Zeljko** A, Jelic-Ivanovic Z, Dimitrijevic-Sreckovic V, Miljkovic M, Stefanovic A, Munjas J, Vekic J, Kotur Stevuljevic J, Spasojevic-Kalimanovska V. The association between lecithin:cholesterol acyltransferase activity and fatty liver index. *Ann Clin Biochem.* 2019;56:583-592.
3. Stevanovic M, Vekic J, Bogavac-Stanojevic N, Janac J, Stjepanovic Z, Zeljkovic D, Trifunovic B, Spasojevic-Kalimanovska V, **Zeljko** A. Significance of LDL and HDL subclasses characterization in the assessment of risk for colorectal cancer development. *Biochem Med (Zagreb)* 2018;28(3):030713.
4. Joksić J, Sopić M, Spasojević-Kalimanovska V, Gojković T, **Zeljko** A, Vekić J, Andjelkovic K, Kalimanovska-Oštrić D, Jelić-Ivanović Z. Higher circulating resistin protein and PBMCs resistin mRNA levels are associated with increased prevalence of small dense LDL particles in coronary artery disease patients. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2016;43:22-28.
5. Vekic J, **Zeljko** A, Jelic-Ivanovic Z, Damjanovic T, Suvakov S, Matic M, Savic-Radojevic A, Simic T, Spasojevic-Kalimanovska V, Gojkovic T, Spasic S, Dimkovic N. Association of glutathione-S-transferase gene polymorphism and lipoprotein subclasses in hemodialysis patients. *Clin Biochem* 2014;47:398-403.
6. **Zeljko** A, Vekic J, Spasojevic-Kalimanovska V, Jelic-Ivanovic Z, Bogavac-Stanojevic N, Gulan B, Spasic S. LDL and HDL subclasses in acute ischemic stroke: prediction of risk and short-term mortality. *Atherosclerosis* 2010; 210: 548-554.

У случају менторства дисертације на докторским студијама у групацији техничко-технолошких, природно-математичких и медицинских наука ментор треба да има најмање три рада са SCI, SSCI, AHCI или SCIE листе, као и Math-Net.Ru листе.

У случају менторства дисертације на докторским студијама у групацији друштвено-хуманистичких наука ментор треба да има најмање три рада са релевантне листе научних часописа (Релевантна листа научних часописа обухвата SCI, SSCI, AHCI и SCIE листе, као и ERIH листу, листу часописа које је Министарство за науку класификовало као M24 и додатну листу часописа коју ће, на предлог универзитета, донети Национални савет за високо образовање. Посебно се вреднују и монографије које Министарство науке класификује као M11, M12, M13, M14, M41 и M51.)

Наставно научно веће

Обавештавамо вас да је

(назив надлежног тела факултета).

на седници одржаној 10.9.2020. размотрило предложену тему и закључило да је тема подобна за израду докторске дисертације јер садржи оригиналну идеју и да је од значаја за развој науке, примену њених резултата, односно развој научне мисли уопште.

ДЕКАН ФАКУЛТЕТА

- Прилог**
- 1. Предлог теме докторске дисертације са образложењем.**
 - 2. Акт надлежног тела факултета о подобности теме за израду докторске дисертације.**
 - 3. Електронска верзија.**

NASTAVNO-NAUČNOM VEĆU FARMACEUTSKOG FAKULTETA UNIVERZITETA U BEOGRADU

Na sednici Nastavno-naučnog Veća Farmaceutskog fakulteta održanoj 16.07.2020. godine, imenovani smo u Komisiju za pisanje izveštaja o oceni ispunjenosti uslova kandidata i naučne zasnovanosti teme doktorske disertacije pod nazivom „Multimarkerski pristup u proceni značaja potencijalnih lipidnih i inflamatornih biomarkera kolorektalnog karcinoma“, kandidata magistra farmacije - medicinskog biohemičara Marije Mihajlović, te posle pregledane dokumentacije podnosimo Nastavno-naučnom Veću Farmaceutskog fakulteta sledeći

IZVEŠTAJ

A. Biografija

Marija Mihajlović je rođena 16.04.1989. godine u Požarevcu. Osnovnu i srednju školu je završila u Požarevcu kao nosilac dve Vukove diplome. Farmaceutski fakultet Univerziteta u Beogradu, smer magistar farmacije – medicinski biohemičar upisala je 2008. godine, a završila 2013. godine sa prosečnom ocenom 9,07. Po završetku studija, obavila je pripravnički staž u Zavodu za laboratorijsku dijagnostiku „Hexalab“ i 2014. godine položila stručni ispit za diplomirane farmaceute - medicinske biohemičare. Doktorske akademske studije, modul - Medicinska biohemija, upisala je školske 2014/2015. godine na Farmaceutskom fakultetu Univerziteta u Beogradu. Uspešno je položila sve ispite predviđene planom i programom doktorskih studija sa prosečnom ocenom 9,45. Školske 2017/2018. upisala je specijalističke akademske studije na modulu Farmakoeconomija i farmaceutska legislativa na Farmaceutskom fakultetu Univerziteta u Beogradu, koje je završila u septembru 2019. godine sa prosečnom ocenom 10,00.

U periodu od 2013. do 2015. godine je bila zaposlena na poziciji medicinskog biohemičara u Zavodu za biohemijsku, mikrobiološku, patohistološku i genetsku laboratorijsku dijagnostiku „Hexalab - Beolab, Synevo“. Od oktobra 2016. godine radi na Katedri za medicinsku biohemiju Farmaceutskog fakulteta

Univerziteta u Beogradu, najpre kao saradnik u nastavi. 2019. godine je na istoj katedri izabrana u zvanje asistenta za užu naučnu oblast Medicinska biohemija. Od 2017. do danas angažovana je kao saradnik na projektu Ministarstva prosvete nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije pod nazivom „Interaktivna uloga dislipidemije, oksidativnog stresa i inflamacije u aterosklerozi i drugim bolestima: genetički i biohemijski markeri“, čiji je rukovodilac prof. dr Vesna Spasojević-Kalimanovska. Od početka rada na Katedri za medicinsku biohemiju Farmaceutskog fakulteta, Marija Mihajlović učestvuje u pripremi i izvođenju dodiplomske praktične nastave iz obaveznih i izbornih predmeta: Opšta biohemija, Statistika u farmaciji, te Medicinska biohemija na studijskom programu magistar farmacije, kao i na predmetima Primena informatičkih metoda u medicinskoj biohemiji, Opšta biohemija, Statistika, Laboratorijska hemostaza i Laboratorijska hematologija na studijskom programu magistar farmacije – medicinski biohemičar. Od 2017. god. je učesnik na međunarodnom projektu COST (European research programme COST, European Cooperation in Science and Technology) „CliniMARK: ‘good biomarker practice’ to increase the number of clinically validated biomarkers (CA16113).“ Od 2019. god. je učesnik na međunarodnom projektu COST „Identifying Biomarkers Through Translational Research for Prevention and Stratification of Colorectal Cancer“ (COST Action CA17118).

Kao autor i koautor objavila je 1 rad u međunarodnom časopisu kategorije M22, 2 rada u međunarodnom časopisu kategorije 23 i imala 3 saopštenja sa međunarodnih skupova i skupova od nacionalnog značaja. Dobitnik je stipendije za učešće na letnjoj školi 2018. godine u Portorožu koju organizuje CEEPUS (International CEEPUS Summer School „Novel diagnostic and therapeutic approaches to complex genetic disorders- Inflammation“; 18-23. jul 2018. Portorož, Slovenija). U okviru COST akcije (CA16113 Training School) 2019. godine dobila je stipendiju za učešće u letnjoj školi COST CliniMARK Training School – Approaches for Biomarker Discovery and Validation, 23-27. septembar 2019, Speces, Grčka. Tokom osnovnih studija bila je stipendista Ministarstva za prosvetu i sport Republike Srbije. Učesnik je više domaćih i međunarodnih kongresa i skupova.

Radovi publikovani u međunarodnim časopisima:

1. Jelena Kotur-Stevuljević, Jelena Vekić, Aleksandra Stefanović, Aleksandra Zeljković, Ana Ninić, Jasmina Ivanišević, Milica Miljković, Miron Sopić, Jelena Munjas, Marija Mihajlović, Slavica Spasić, Zorana Jelić-Ivanović, Vesna Spasojević-Kalimanovska. Paraoxonase 1 and atherosclerosis-related diseases. BioFactors. 2019; 1-13

2. Dragana Kačarević, Nataša Bogavac-Stanojević, Vesna Spasojević-Kalimanovska, Dragana Bojanin, Tatjana Milenković, Aleksandra Stefanović, Marija Mihajlović, Sanja Vujčić, Rade Vuković, Aleksandra Zeljković, Slađana Todorović, Katarina Mitrović, Jelena Vekić. Factors associated with oxidative stress status in pediatric patients with type 1 diabetes mellitus. Journal of pediatric endocrinology & metabolism. 2020; 33: 591-8.

3. Marija Mihajlović, Biljana Jančić Stojanović, Vesna Spasojević-Kalimanovska, Dragana Vujanović, Branka Ivković, Aleksandra Zeljković, Jelena Kotur. Modulation of oxidative stress/antioxidative defence in human serum treated by four different tyrosine kinase inhibitors. Anti-Cancer Drugs. 2020.

Saopštenja sa međunarodnih skupova i skupova od nacionalnog značaja:

1. Aleksandra Stefanović, Marija Mihajlović, Daniela Ardalić, Gorica Banjac, Petar Cabunac, Zeljko Miković, Vesna Spasojević-Kalimanovska and Jelena Kotur Stevuljević. Inflammation and oxidative stress in the pathogenesis of preeclampsia. 4th Congress of physiological science of Serbia with international participation, Nis, septembar 2018.

2. J.Vekić, N.Bogavac-Stanojević, D.Kacarević, D.Bojanin, M.Mihajlović, A.Stefanović, J.Kotur-Stevuljević, T.Milenković, R.Vuković, S.Todorović, K.Mitrović, V.Spasojević-Kalimanovska. Factor analysis of variables associated with oxidative stress status in paediatric patients with type 1 diabetes mellitus. Clinica Chimica Acta. 2019; 493: S305-S306.

3. Bojanin D, Ninić A, Mihajlović M, Milenković T, Zatezalo Lj, Sopić M, Munjas J, Stefanović A, Vekić J, Spasojević-Kalimanovska V. Receptor for advanced glycated end products and transforming growth factor B1 gene expressions in children with type 1 diabetes mellitus. J Med Biochem. 2018; 37: 209.

B. Obrazloženje teme doktorske disertacije

- Naučna oblast:

Medicinska biohemija

- Predmet naučnog istraživanja:

Ispitivanje prediktivnog i dijagnostičkog značaja pojedinačnih i kombinovanih biomarkera lipidnog statusa i inflamacije kod pacijenata sa kolorektalnim karcinomom.

- Naučna zasnovanost predložene teme doktorske disertacije

Prema podacima Međunarodnog društva za istraživanje maligniteta, kolorektalni karcinom (CRC) predstavlja globalni zdravstveni problem i shodno tome izazov za zdravstvene sisteme širom sveta [1]. Epidemiološki podaci u našoj zemlji ukazuju da je CRC drugi uzročnik smrti kod muškaraca i treći kod žena, dok je među novoobolelima registrovan i veći udeo populacije mlađe od 40 godina [2]. Studije su dokazale da genetske promene doprinose nastanku CRC, kao i da je kod ovih pacijenata smanjen kapacitet reparacionih mehanizama DNK [3]. Međutim, u etiopatogenezi ove bolesti učestvuju i promenljivi faktori rizika. Smatra se da način ishrane uobičajen u zemljama razvijenog sveta (tzv. *Western type diet*) značajno doprinosi razvoju CRC, a kao dodatni faktori rizika navode se i smanjena fizička aktivnost, dijabetes, te konzumiranje alkohola i cigareta [4,5].

Za potrebe pravilnog sprovođenja skrininga i dijagnostike CRC definisane su preporuke u kojima se pored osnovnih neinvazivnih testova, navode i invazivne procedure [6]. Značaj skrininga za CRC je nesumnjiv, s obzirom na podatak da u zavisnosti od izbora procedure, redukcija mortaliteta iznosi između 18 i 57% [7]. Osim toga, skrining i rana dijagnostika omogućavaju otkrivanje maligniteta u inicijalnoj fazi razvoja bolesti, što dovodi i do smanjenja troškova lečenja [8]. Ipak, imajući u vidu invazivnost postupaka i posledični nizak odaziv pacijenata na ovakve preglede, smatra se da bi adekvatni neinvazivni biomarkeri unapredili ranu dijagnostiku, a potom olakšali i samo praćenje bolesti. Dodatno, lažno pozitivni rezultati nekih trenutno dostupnih skrining testova dovode do nepotrebne primene invazivnih i za pacijente neprijatnih procedura [9], te je razvoj novih biomarkera zadovoljavajućih performansi izuzetno važna tema aktuelnih biomedicinskih istraživanja. U tom kontekstu, serumski biomarkeri su svakako dijagnostički parametri izbora, budući da je minimalno invazivna venepunkcija najprihvatljivija opcija za pacijenta. Dva trenutno najviše korišćena serumska tumor markera za CRC su karcino-embrionalni antigen (CEA) i karbohidratni antigen 19-9 (CA 19-9), ali dostupna istraživanja ukazuju na njihovu nedovoljnu specifičnost i osetljivost [10]. Imajući u vidu da dosadašnja potraga za pojedinačnim biomarkerima CRC nije dala zadovoljavajuće rezultate, smatra se da je za unapređenje dijagnostičkih mogućnosti neophodan drugačiji pristup. Jedna od inovativnih mogućnosti je primena multimarkerskih panela u predikciji i dijagnostici oboljenja. Naime, pokazano je da multimarkerski pristup dovodi do povećanja kliničke upotrebne vrednosti markera, pritom predstavljajući put ka sistematičnom razumevanju procesa karcinogeneze [11,12]. Kriterijum za izbor odgovarajućih markera temelji se na njihovoj uzajamnoj povezanosti, strukturnoj sličnosti, ali i zajedničkim metaboličkim putevima preko kojih se uključuju u etiopatogenezu CRC. U tom smislu, u ovoj doktorskoj disertaciji bi za analizu dijagnostičkog potencijala bili predloženi oni biomarkeri koji su međusobno povezani po horizontalnoj osnovi, odnosno koji predstavljaju činioce jedinstvenog metaboličkog procesa. Međutim, multimarkerski

pristup bi bio razvijen i po vertikalnoj osnovi, pa bi svaki predloženi marker bio analiziran sa više aspekata (genska ekspresija, genski polimorfizam, plazmatska koncentracija, strukturna i funkcionalna svojstva). Osim toga, zajednička odlika svih biomarkera selektovanih u ovom istraživanju podrazumeva mogućnost njihovog određivanja u uzorcima venske krvi, s obzirom na laku dostupnost ovog biološkog materijala, kao i dostupnost izvođenja ovakvih analiza u istraživačkim, ali i rutinskim biohemijskim laboratorijama. Različitim kombinacijama predloženih biomarkera i ispitivanjem dijagnostičke tačnosti dobijenih multimarkerskih modela ostvaruje se pristup koji je kompatibilan sa savremenim konceptom personalizovane medicine [13].

Sveobuhvatni pristup u razumevanju metaboličkih procesa uključenih u povećanje rizika za nastanak CRC, iz čega će proizići i izbor potencijalnih biomarkera, ukazuje na poseban značaj poremećaja lipidne homeostaze kod ovih pacijenata. Uloga holesterola u nastanku CRC je još uvek nejasna, jer pojedini autori ističu povišene koncentracije kao faktor rizika, dok drugi razmatraju upotrebu sniženih koncentracija kao markera subkliničkog razvoja bolesti [14,15]. Uprkos tome, doprinos holesterola ne sme da bude zanemaren, jer je otkriveno više signalnih kaskada (Hedgehog, PI3K/Akt, Wnt/ β -catenin) preko kojih se holesterol uključuje u malignu transformaciju ćelije [16]. Dodatno, maligne ćelije mogu da koriste holesterol za stvaranje metaboličkih intermedijera za koje je pokazano da učestvuju u propagaciji tumora [17]. Pored samog holesterola, fokus istraživanja okrenut je i ka lipoproteinskim česticama [18]. Oprečni rezultati studija postoje ne samo kada je u pitanju ukupan holesterol, već i kada se govori o povezanosti nastanka i razvoja CRC sa česticama lipoproteina niske gustine (LDL), ili trigliceridima (TG). Nasuprot tome, veći broj studija konzistentno ukazuje na značaj sniženih koncentracija holesterola sadržanog u lipoproteinima visoke gustine (HDL) [19,20]. Poznato je da HDL čestice svojom kompleksnom strukturom ostvaruju više značajnih uloga. Ovaj lipoprotein je prvenstveno odgovoran za reverzni transport holesterola (RTH), što podrazumeva sazrevanje HDL čestica i bidirekcionni transport triglicerida i estara holesterola između samih HDL čestica i lipoproteina obogaćenih TG. Pravilno funkcionisanje dva enzima, lecitin-holesterol aciltransferaze (LCAT) i holesterol-estar transfernog proteina (CETP) je neophodno kako bi RTH neometano tekao [21,22]. Učešćem u RTH, HDL ostvaruje svoju primarnu ulogu, ali ovaj jedinstveni lipoprotein zahvaljujući svojoj kompleksnoj strukturi poseduje i antioksidativni i antiinflamatorni potencijal [23,24]. Strukturna komponenta HDL, enzim paraoksonaza 1 (PON1) se ističe kao glavni nosilac antioksidativnog kapaciteta ovih čestica [23]. Ovaj enzim sprečava oksidativnu modifikaciju HDL i LDL, na taj način štiteći ih od štetnih uticaja slobodnih radikala [25]. S druge strane, antiinflamatorna uloga HDL se ostvaruje posredno, njegovim uticajem na imune ćelije, prvenstveno kroz smanjenje migracije monocita i sekrecije proinflamatornih citokina [26]. Mnogobrojna istraživanja su pokazala kako se narušena homeostaza HDL čestica odražava na funkcionisanje kardiovaskularnog sistema [21,22], a savremena biomedicinska

istraživanja se sada okreću ka ispitivanju uloge ovih čestica u razvoju malignih bolesti, između ostalog i CRC [27].

Narušena redoks homeostaza je takođe udružena sa razvojem karcinoma [28]. Dokazano je da reaktivne kiseonične vrste mogu da indukuju peroksidaciju lipida, te da dovedu do ozbiljnih oštećenja ćelijske membrane i genoma [29,30], pritom istovremeno uzrokujući disfunkcionalnost antioksidativnih zaštitnih sistema [31,32]. Pored PON1 koji se ističe po svom značaju jer direktno povezuje dislipidemiju i oksidativni stres, moguće je određivanje i drugih parametara redoks statusa poput prooksidativnog/antioksidativnog balansa (PAB). Određivanje PAB pruža istovremeni uvid u oksidativni i antioksidativni kapacitet organizma i na taj način obezbeđuje kompletnu informaciju o redoks statusu pojedinca [33]. Iz svega navedenog, prvi integrativni panel biomarkera bi podrazumevao određivanje koncentracije HDL holesterola, aktivnosti LCAT, CETP, PON1 (paraoksonazna i arilesterazna aktivnost) i PAB.

Osim dislipidemije, zajednička karakteristika pacijenata sa CRC je prisustvo inflamacije. Adipocitokini integrišu oba ova procesa, budući da je dislipidemija uzrok, a inflamacija posledica poremećaja njihove homeostaze. U tom smislu, adipocitokini predstavljaju dobre kandidat markere za dijagnostiku i predikciju CRC. Rezistin je okarakterisan prvenstveno kao inflamatorni medijator [34], dok nasuprot njemu, adiponektin predstavlja proapoptotsku i antiinflamatornu komponentu plazme [35]. Uslovi u kojima preovladavaju povišene koncentracije rezistina i snižene koncentracije adiponektina se povezuju sa povećanim rizikom za razvoj CRC [34,36]. Rezistin pripada familiji proteina bogatih cisteinom, dok su za njegovu sekreciju primarno odgovorni monociti, makrofage i ćelije koštane srži [37]. Ovaj adipocitokin se najčešće dovodi u vezu sa progresijom CRC, mada rezultati pojedinih studija ukazuju i da rezistin ostvaruje antiproliferativne efekte [38]. Više receptora je predloženo kao ciljno mesto vezivanja rezistina, a posebno interesovanje postoji za novootkriveni receptor - protein udružen sa adenilat ciklazom 1 (CAP-1; eng. Adenyl Cyclase-Associated Protein 1) [39,40]. Naime, interakcija rezistina sa CAP-1 dovodi do aktivacije protein kinaze A i nuklearnog faktora-kapa B signalnog puta, što indukuje pojačanu sekreciju proinflamatornih citokina [40]. Kao aktin vezujuća komponenta CAP-1 se dovodi u vezu i sa povećanom invazivnošću tumora i razvojem metastaza [41,42]. Takođe, važno je napomenuti da bi, s obzirom da HDL ima antiinflamatornu ulogu, u kontekstu multimarkerskog pristupa trebalo razmotriti i eventualnu povezanost između ovog lipoproteina i proinflamatornog molekula kao što je rezistin. Istraživanja koja su se bavila interakcijom rezistin - CAP1 i njihovom vezom sa HDL su prema dosadašnjem saznanju retka u CRC.

Savremeni koncept personalizovane medicine se u dobroj meri temelji na razumevanju povezanosti genetskih i epigenetskih promena sa individualnim kliničkim ishodom [43]. Kao jedan od najznačajnijih izvora genetske raznovrsnosti se navode polimorfizmi pojedinačnih nukleotida (eng. *Single*

nucleotide polymorphisms-SNP). SNP predstavljaju neophodan faktor u personalizaciji kliničkog pristupa, pa stoga zavređuju razmatranje u okviru integrativne multimarkerske analize. Shodno tome, u sklopu sveobuhvatne analize rezistina kao potencijalnog biomarkera CRC, izabran je polimorfizam *RETN* gena (rs1862513) koji je povezivan sa rizikom za razvoj CRC [44,45]. Predloženi panel biomarkera bi u ovom slučaju uključivao cirkulišuću koncentraciju rezistina, nivo ekspresije gena koji kodira sintezu rezistina, kao i gena za rezistinski receptor CAP-1, dok bi se ujedno ukazalo na značaj *RETN* rs1862513 polimorfizma za razvoj CRC i ispitao uticaj ovog polimorfizma na prethodno spomenute parametre. S obzirom da monociti predstavljaju jedan od glavnih izvora rezistina i da je u ovoj studiji venepunkcija procedura izbora za uzimanje biološkog materijala, za određivanje nivoa genskih ekspresija bi se koristio genetski materijal mononuklearnih ćelija periferne krvi (MČPK). Osim toga, kao nadogradnja ove faze istraživanja, ispitivao bi se i prediktivni potencijal multimarkerskog panela koji obuhvata markere rezistinske homeostaze i markere udružene sa HDL.

Izbor adiponektina kao drugog adipocitokina koji bi se ispitivao u ovoj studiji se temelji na njegovom pokazanom uticaju na polarizaciju i plastičnost makrofaga i antiinflamatornom efektu. Za adiponektin je utvrđeno da favorizuje proliferaciju M2 antiinflamatorne subpopulacije makrofaga, dok redukuje aktivaciju M1 proinflamatorne subpopulacije [46]. Adiponektin pripada C1Q/TNF- α familiji proteina, a osim što poseduje antiinflamatorna svojstva, smatra se i važnim regulatorom metaboličkog odgovora, jer učestvuje u modulaciji insulinske osetljivosti [47]. Vezivanjem za receptore [adiponektinski receptor 1 (Adipor1), adiponektinski receptor 2 (Adipor2) i T-kadherin] adiponektin ostvaruje najveći deo svojih efekata, između ostalog i antiproliferativno dejstvo u CRC [47,48]. Signalna transdukcija pokrenuta vezivanjem adiponektina za Adipor1 dominantno se odvija preko adenozin-monofosfat aktivirane protein kinaze, dok asocijacija sa Adipor2 pokreće odgovor posredovan peroksizom proliferator-aktiviranim receptorom- α [47]. Novija istraživanja su ukazala i na značaj polimorfizama *ADIPOR1* i *ADIPOR2* gena u CRC [49,50]. Dodatno, pojedini autori smatraju da su protektivni efekti adiponektina postignuti preko Adipor1 značajniji nego oni ostvareni Adipor2 signalizacijom [51]. Da bi se definisali adekvatni biomarkerski paneli utemeljeni na praćenju homeostaze adiponektina, vršila bi se evaluacija ekspresije gena za Adipor1 i Adipor2 iz MČPK, a potom bi se vršila i genotipizacija ispitanika u okviru dva polimorfizma za *ADIPOR1* gen (rs7539542, rs1342387) i u okviru jednog polimorfizma gena za adiponektin *ADIPOQ* (rs266729). Nadalje, strukturna srodnost TNF- α i adiponektina pruža osnov za ispitivanje nivoa relativne genske ekspresije ovog citokina, te evaluaciju polimorfizma od značaja za *TNF- α* gen (rs1800629), kao i moguće uključivanje ovih parametara u multimarkerski model koji se temelji na adiponektinu. Uloga TNF- α u CRC može biti posebno intrigantna, s obzirom da je pokazano da

s jedne strane ovaj citokin indukuje antitumorski imuni odgovor, dok s druge strane, u zavisnosti od koncentracije pospešuje razvoj tumora [52].

U sklopu ovog istraživanja određivala bi se i koncentracija solubilnog E-kadherina koja pruža informaciju o stepenu progresije i invazivnosti karcinoma [53]. E-kadherin je od značaja za ćelijsku adheziju i proces epitelno-mezenhimalne tranzicije [53]. Studije su pokazale da proinflamatorno okruženje karcinoma u velikoj meri narušava zaštitnu funkciju E-kadherina [54,55]. Značajno je napomenuti da su istraživanja ukazala na povezanost adiponektinskih receptora i E-kadherina, dajući prostora za razvoj hipoteza o njihovim komplementarnim ulogama [56]. Na kraju, važnu ulogu u razvoju karcinoma imaju i insulinu-slični faktori rasta (eng. *Insulin growth factor*, IGF) kao medijatori ćelijske proliferacije i apoptoze [57]. Pokazano je da hiperinsulinemija kao jedan od predisponirajućih faktora za razvoj CRC dovodi do smanjene količine cirkulišućih IGF vezujućih proteina, formirajući uslove za ostvarivanje štetnih proliferišućih i antiapoptotskih efekata slobodnog IGF-1 [58]. Shodno tome, dislipidemija kao osnovni uzročnik narušene delikatne insulinske ravnoteže doprinosi pogoršanju osnovne bolesti, između ostalog i preko IGF-1. Dosadašnja naučna saznanja ukazuju na uzročno-posledičnu vezu između polimorfizma gena za IGF-1, gojaznosti i rizika za razvoj CRC [59]. Na temelju tih istraživanja je za svrhe ove studije izabran *IGF-1* polimorfizam rs2946834, za koji je pokazano da poseduje i prognostički značaj za CRC [60]. Uključivanje molekula kao što su E-kadherin i IGF-1 u multimarkerske panele, može da poboljša njihov dijagnostički i prediktivni kapacitet, prevashodno imajuću u vidu ulogu ovih molekula u etipatogenezi CRC. Tome u prilog stoje dokazi studija o uticaju IGF-1 na vezu E-kadherina i β -katenina u CRC ćelijskim linijama [61].

Imajući u vidu da je ovom studijom obuhvaćeno više relevantnih polimorfizama za gene od interesa, istraživanje će biti dopunjeno i ispitivanjem gensko-genskih interakcija, kao i formiranjem modela interakcija gena sa faktorima spoljašnje sredine primenom Multifactor Dimensionality Reduction softvera (MDR). Pre sprovođenja eksperimentalnih procedura, koristili bi se standardni bioinformatički alati i javno dostupne baze podataka kako bi se ispitali nivoi ekspresija prethodno navedenih gena u različitim uzorcima (subpopulacije MČPK ili tkivo pacijenata sa CRC). Ove bioinformatičke analize bi ujedno ukazale na povezanost ciljnih gena sa signalnim i metaboličkim putevima.

Multimarkerski pristup koji uključuje proteinsku koncentraciju, gensku ekspresiju i polimorfizme od značaja može da predstavlja osnov razvoja visoko osetljivih i specifičnih dijagnostičkih i prediktivnih alata za kompleksna oboljenja poput CRC. Osim toga, ovakvi modeli u sebi nose i potencijal za praćenje individualizovane terapije. Relativno neinvazivan postupak uzorkovanja donosi značajnu prednost ovakvom pristupu za potencijalnu predikciju nastanka i ranu dijagnostiku CRC.

C. Ciljevi istraživanja:

- Ispitati karakteristike osnovnog lipidnog profila kod pacijenata sa CRC i utvrditi razlike u odnosu na zdrave osobe. Ispitati uticaj enzima određivanih u okviru specifičnog lipidnog profilisanja (enzimska aktivnost LCAT, CETP i masena koncentracija CETP) na proces sazrevanja i funkcionalnost HDL čestica izraženu preko PON1 paraoksonazne i arilesterazne aktivnosti. Utvrditi razlike u navedenim parametrima između dve grupe ispitanika, kao i uticaj glavnog pokazatelja oksidativnog stresa - PAB na funkcionalna svojstva HDL čestice.
- Ispitati razlike u nivoima ekspresije gena za rezistin, CAP-1, Adipor1, Adipor2 i TNF- α u MČPK pacijenata u odnosu na kontrolnu grupu zdravih ispitanika.
- U ispitivanim grupama odrediti koncentracije plazmatskog rezistina, IGF-1 i E-kadherina kao indikatora promene homeostaze lipida i inflamatornih medijatora u CRC
- Ispitati korelacije nivoa ekspresija gena za rezistin, Adipor1, Adipor2, TNF- α i CAP-1 u MČPK, kao i plazmatskih koncentracija rezistina, IGF-1 i E-kadherina sa antropometrijskim karakteristikama ispitanika i tradicionalnim lipidnim i nelipidnim faktorima rizika za CRC.
- Ispitati razlike u frekvenci genotipa ispitanika u sklopu polimorfizama za *ADIPOQ* (rs266729), *RETN* (rs1862513), *ADIPOR1* (rs7539542, rs1342387), *TNF- α* (rs1800629) i *IGF-1* (rs2946834).
- Ispitati povezanost genskih ekspresija i polimorfizama ciljnih gena sa plazmatskim koncentracijama proteina, kao i međusobnu povezanost ispitivanih polimorfizama i genskih ekspresija.
- Utvrditi postojanje razlika u ispitivanim biomarkerima u zavisnosti od gradusa i stadijuma CRC.
- Utvrditi potencijal svakog pojedinačnog biomarkera za predikciju prisustva i dijagnozu CRC.
- Na osnovu karakteristika i identifikovane međusobne povezanosti pojedinačnih biomarkera formirati odgovarajuće multimarkerske modele za predikciju prisustva CRC.
- Primenom analize ROC krive ispitati dijagnostičku tačnost dobijenih multimarkerskih modela.
- Primenom MDR softvera evaluirati prisustvo gensko-genskih interakcija i interakcija gena sa faktorima spoljašnje sredine.

D. Metodologija naučnog istraživanja

Istraživanje bi uključivalo 100 pacijenata sa dijagnostikovanim CRC koji su lečeni na Klinici za opštu hirurgiju Vojnomedicinske akademije, kao i 130 zdravih osoba regrutovanih u Opštoj bolnici MediGroup u Beogradu. Uzorci krvi pacijenata bi bili uzimani natašte, neposredno pre elektivne resekcije

kolona ili rektuma. Kriterijumi za uključivanje pacijenata u studiju bi bili: prvi put dijagnostikovani CRC, odsustvo drugih malignih bolesti u anamnezi, odsustvo prethodne neoadjuvantne terapije, odsustvo ozbiljnih fizičkih invaliditeta, te nekorišćenje hipolipemika. Finalna potvrda dijagnoze CRC postavljao se nakon analize patohistoloških preparata resektovanog tkiva. Na osnovu kliničkog i patohistološkog nalaza vršio se stratifikacija pacijenata prema gradusu i stadijumu bolesti. Izbor zdravih ispitanika vršio se tako da ne budu uključene osobe sa prethodnom ili trenutnom dijagnozom maligne bolesti. Takođe kriterijum selekcije kontrolne grupe uključuje odsustvo hroničnih srčanih, bubrežnih bolesti, gastrointestinalnih poremećaja ili bolesti jetre, te korišćenja hipolipemika. Uzorci krvi zdravih ispitanika bi se uzimali natašte nakon rutinskog sistematskog pregleda. Nakon sprovedenih procedura uzorkovanja krvi, vršio se odvajanje seruma i plazme, a potom će se uzorci alikvotirati u manje zapremine i čuvati u zamrzivaču na -80°C do daljeg sprovođenja analiza. Pacijenti i zdravi ispitanici će popuniti anketu sa osnovnim demografskim i antropometrijskim podacima (težina, visina, indeks telesne mase), te uobičajenim životnim navikama.

U serumu će biti određivani sledeći biohemijski parametri: glukoza, ukupan holesterol, LDL-holesterol, HDL-holesterol, TG, albumin, ukupni proteini, urea i kreatinin standardnim biohemijskim metodama na automatskom analizatoru Ilab 300+ (Instrumentation Laboratory, Milan, Italy). Spektrofotometrijsko određivanje koncentracija slobodnog i esterifikovanog holesterola u ukupnoj plazmi i HDL frakciji plazme bi se takođe sprovело na automatskom analizatoru Ilab 300+. Dobijene vrednosti bi se koristile za procenu aktivnosti LCAT i CETP. Aktivnost LCAT bi se određivala kao razlika u koncentraciji slobodnog i esterifikovanog holesterola u plazmi, a aktivnost CETP kao razlika u koncentraciji estera holesterola u HDL frakciji plazme u jedinici vremena. Upotrebom prethodno validiranih spektrofotometrijskih metoda, na aparatu ILAB 300+ i UV-1800 Shimadzu spektrofotometru, merio se parametri oksidativnog stresa: PAB i PON1 paraoksonazna i arilesterazna aktivnost. Koncentracije cirkulišućeg rezistina, IGF1, E-kadherina kao i masena koncentracija CETP bi bile određivane u plazmi tehnikom enzimskog imunoeseja (ELISA).

Određivanju nivoa genskih ekspresija adiponektinskih receptora, CAP-1, rezistina, $\text{TNF-}\alpha$ bi prethodila izolacija mRNK na Ficoll-Paque® gustinskom gradijentu. TRIzol™ reagens bi bio odmah dodat radi liziranja ćelija i očuvanja integriteta ukupne RNK. Takav uzorak bi potom bio skladišten u zamrzivaču na -80°C do daljeg postupka izolacije RNK koja bi se izvodila prema uputstvu proizvođača za manuelnu izolaciju RNK. Određivanje koncentracije izolovane RNK, kao i procena prisustva nečistoća vršio se merenjem apsorbancije rastvora RNK na različitim talasnim dužinama na UV-1800 Shimadzu spektrofotometru, dok će se integritet nukleinske kiseline proveravati elektroforetski na 1% agaroznom gelu. Korišćenjem reverzne transkripcije bi se iRNK uzoraka prevele u komplementarnu DNK. Kvantifikacija genske ekspresije bila bi sprovedena upotrebom Real time PCR metode.

U svrhe genotipizacije, za izolaciju DNK koristiće se 200µL pune krvi i protokol priložen od strane proizvođača GeneJET Whole Blood Genomic DNA Purification Mini Kit (Thermo Scientific). Ukratko, uzorci će se digestirati proteinaza K lizirajućim rastvorom. Lizat će se pomešati sa etanolom i nanositi na prečišćavajuće kolone, na kojima će se DNK vezivati za matriks silika membrana. Nečistoće će se ispirati upotrebom odgovarajućih Wash pufera menjanjem pH gradijenta, dok će se zaostala prečišćena DNK na kraju eluirati upotrebom elucionog pufera. Čistoća rastvora DNK, kao i koncentracija nukleinske kiseline će se odrediti merenjem apsorpcije na različitim talasnim dužinama na UV-1800 Shimadzu spektrofotometru. Očuvanost DNK će se proveriti elektroforetski. Dalja detekcija polimorfizama će se vršiti reakcijom koja je zasnovana na 5'-3' egzonukleaznoj aktivnosti DNK polimeraze, primenom *minor groove binding* VIC i FAM obeleženih proba za detekciju odgovarajućih alela.

Statistička i bioinformatička analiza vršiće se sledećim statističkim paketima: MedCalc, SPSS, GraphPadPRism, MDR i GSEA softver. Dodatno će se koristiti online dostupni statistički alati za specifične analize polimorfizama. Shapiro-Wilk i Kolmogorov-Smirnov test će se koristiti se za proveru normalnosti raspodele podataka. Ispitivanje razlika u kontinuiranim podacima između grupa, vršiće se u zavisnosti od distribucije podataka odgovarajućim parametarskim ili neparametarskim testovima. Kategorički podaci će biti upoređivani Chi-kvadrat testom. Povezanost ispitivanih parametara analiziraće se primenom Spearman i Pearson korelacione analize, te linearnom regresionom analizom. Prediktivni potencijal ispitivanih biomarkera i formiranih multimarkerskih modela ispitaće se multivarijantnom logističkom regresionom analizom kojoj će prethoditi univarijantna analiza. ROC krive će se koristiti za evaluiranje dijagnostičke tačnosti pojedinačnih markera i predloženih modela.

E. Literatura

1. Dostupno na: https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/10_8_9-Colorectum-fact-sheet.pdf
2. Republička stručna komisija za izradu i implementaciju vodiča dobre kliničke prakse Ministarstvo zdravlja Republike Srbije: Nacionalni vodič dobre kliničke prakse za dijagnostikovanje i lečenje raka kolona i rektuma.
3. Armaghany T, Wilson JD, Chu Q, Mills G. Genetic alterations in colorectal cancer. *Gastrointestinal cancer research*. 2012; 5:19-27.

4. Oruç Z, Kaplan MA. Effect of exercise on colorectal cancer prevention and treatment. *World journal of gastrointestinal oncology*. 2019;11:348-366.
5. Pietrzyk Ł. Food properties and dietary habits in colorectal cancer prevention and development. *International Journal of Food Properties*. 2017; 20:2323-2343.
6. Dostupno na: <https://www.cancer.org/cancer/colon-rectal-cancer/detection-diagnosis-staging/acs-recommendations.html>
7. Elmunzer BJ, Singal AG, Sussman JB, Deshpande AR, Sussman DA, Conte ML, Dwamena BA, Rogers MA, Schoenfeld PS, Inadomi JM, Saini SD, Waljee AK. Comparing the effectiveness of competing tests for reducing colorectal cancer mortality: a network meta-analysis. *Gastrointestinal endoscopy*. 2015;81:700-709.
8. Simon K. Colorectal cancer development and advances in screening. *Clinical interventions in aging*. 2016;11:967-976.
9. Narula N, Ulic D, Al-Dabbagh R, Ibrahim A, Mansour M, Balion C, Marshall JK. Fecal occult blood testing as a diagnostic test in symptomatic patients is not useful: a retrospective chart review. *Canadian Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 2014;28: 421-426.
10. Hauptman N, Glavač D. Colorectal cancer blood-based biomarkers. *Gastroenterology research and practice*. 2017;2017. <https://doi.org/10.1155/2017/2195361>
11. Lu M, Zhan X. The crucial role of multiomic approach in cancer research and clinically relevant outcomes. *EPMA Journal*. 2018; 9:77-102.
12. Golubnitschaja O, Costigliola V. General report & recommendations in predictive, preventive and personalised medicine 2012: white paper of the European Association for Predictive, Preventive and Personalised Medicine. *EPMA Journal*. 2012;3:14.
13. Adamcova M, Šimko F. Multiplex biomarker approach to cardiovascular diseases. *Acta Pharmacologica Sinica*. 2018;39:1068-72.
14. Radišauskas R, Kuzmickienė I, Milinavičienė E, Everatt R. Hypertension, serum lipids and cancer risk: A review of epidemiological evidence. *Medicina*. 2016; 52:89-98.
15. Mamtani R, Lewis J, Scott F, Ahmad T, Goldberg D, Datta J, Yang Y , Boursi B. Disentangling the Association between Statins, Cholesterol, and Colorectal Cancer: A Nested Case-Control Study. *PLOS MEDICINE*. 2016; 13(4): e1002007.
16. Ding X, Zhang W, Li S, Yang H. The role of cholesterol metabolism in cancer. *American Journal of Cancer Research*. 2019;9:219–227.
17. Swan R, Alnabulsi A, Cash B, Alnabulsi A, Murray GI. Characterisation of the oxysterol metabolising enzyme pathway in mismatch repair proficient and deficient colorectal cancer. *Oncotarget*. 2016;7: 46509–46527.

18. Liao F, He W, Jiang C, Yin C, Guo G, Chen X, Qiu H, Rong Y, Zhang B, Xu D, Xia L. A high LDL-C to HDL-C ratio predicts poor prognosis for initially metastatic colorectal cancer patients with elevations in LDL-C. *OncoTargets and therapy*.2015; 8:3135-3142.
19. Yao X, Tian Z. Dyslipidemia and colorectal cancer risk: a meta-analysis of prospective studies. *Cancer causes & control*.2015; 26:257-268.
20. Chandler PD, Song Y, Lin J, Zhang S, Sesso HD, Mora S, Giovannucci EL, Rexrode KE, Moorthy MV, Li C, Ridker PM et al. Lipid biomarkers and long-term risk of cancer in the Women's Health Study. *The American journal of clinical nutrition*.2016;103:1397-1407.
21. Kunnen S, Van Eck M, Lecithin: cholesterol acyltransferase: old friend or foe in atherosclerosis?. *Journal of Lipid Research*.2012; 53:1783-1799.
22. Tall AR. Functions of cholesterol ester transfer protein and relationship to coronary artery disease risk. *Journal of clinical lipidology*.2010; 4:389-393.
23. Brites F, Martin M, Guillas I, Kontush A. Antioxidative activity of high-density lipoprotein (HDL): Mechanistic insights into potential clinical benefit. *BBA Clinical*. 2017; 8:66-77.
24. De Nardo D, Labzin L, Kono H, Seki R, Schmidt S, Vogelhuber J, Kraut M, Kerksiek A, Krebs W, Bode N, Grebe A. 63: Investigating the anti-inflammatory effects of HDL in macrophages. *Cytokine*. 2013; 63:258.
25. Manolescu BN, Busu C, Badita D, Stanculescu R, Berteanu M. Paraoxonase 1—an update of the antioxidant properties of high-density lipoproteins. *Maedica*. 2015; 10:173-177.
26. Kontush A. HDL-mediated mechanisms of protection in cardiovascular disease. *Cardiovascular research*. 2014;103:341-349.
27. Wang Y, Sun XQ, Lin HC, Wang DS, Wang ZQ, Shao Q, Wang FH, Yan SM, Liang JY, Zeng ZL, Ju HQ et al. Correlation between immune signature and high-density lipoprotein cholesterol level in stage II/III colorectal cancer. *Cancer medicine*. 2019; 8:1209-1217.
28. Gwangwa MV, Joubert AM, Visagie MH. Crosstalk between the Warburg effect, redox regulation and autophagy induction in tumourigenesis. *Cellular & molecular biology letters*. 2018; 23:1-9.
29. Klatt P, Lamas S. Regulation of protein function by S-glutathiolation in response to oxidative and nitrosative stress. *European Journal of Biochemistry*. 2000;267:4928-4944.
30. Liu H, Liu X, Zhang C, Zhu H, Xu Q, Bu Y, Lei Y. Redox imbalance in the development of colorectal cancer. *Journal of Cancer*. 2017;8:1586-1597.
31. Strzelczyk JK, Wielkoszyński T, Krakowczyk Ł, Adamek B, Zalewska-Ziob M, Gawron K, Kasperczyk J, Wiczowski A. The activity of antioxidant enzymes in colorectal adenocarcinoma and corresponding normal mucosa. *Acta Biochimica Polonica*.2012; 59:549-556.

32. Skrzydlewska E, Sulkowski S, Koda M, Zalewski B, Kanczuga-Koda L, Sulkowska M, Lipid peroxidation and antioxidant status in colorectal cancer. *World Journal of Gastroenterology*. 2005; 11:403-406.
33. Alamdari DH, Paletas K, Pegiou T, Sarigianni M, Befani C, Koliakos G. A novel assay for the evaluation of the prooxidant–antioxidant balance, before and after antioxidant vitamin administration in type II diabetes patients. *Clinical Biochemistry*. 2007;40:248-254.
34. Yang G, Fan W, Luo B, Xu Z, Wang P, Tang S, Xu P, Yu M. Circulating resistin levels and risk of colorectal cancer: a meta-analysis. *BioMed research international*. 2016;2016. <https://doi.org/10.1155/2016/7367485>
35. Dalamaga M, Diakopoulos KN, Mantzoros CS. The role of adiponectin in cancer: a review of current evidence. *Endocrine reviews*. 2012; 33:547-594.
36. Otake S, Takeda H, Fujishima S, Fukui T, Orii T, Sato T, Sasaki Y, Nishise S, Kawata S. Decreased levels of plasma adiponectin associated with increased risk of colorectal cancer. *World Journal of Gastroenterology*. 2010; 16: 1252-1257.
37. Jamaluddin MS, Weakley SM, Yao Q, Chen C. Resistin: functional roles and therapeutic considerations for cardiovascular disease. *British journal of pharmacology*. 2012;165:622-632.
38. Singh S, Chouhan S, Mohammad N, Bhat MK. Resistin causes G1 arrest in colon cancer cells through upregulation of SOCS 3. *FEBS letters*. 2017;591:1371-1382.
39. Shabani M, Naseri J, Shokri F. Receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 1: a novel target for cancer immunotherapy. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*. 2015;19:941-955.
40. Lee S, Lee HC, Kwon YW, Lee SE, Cho Y, Kim J, Lee S, Kim JY, Lee J, Yang HM, Mook-Jung I et al. Adenylyl cyclase-associated protein 1 is a receptor for human resistin and mediates inflammatory actions of human monocytes. *Cell metabolism*. 2014;19:484-497.
41. Zhang H, Zhou G. CAP1 (cyclase-associated protein 1) exerts distinct functions in the proliferation and metastatic potential of breast Cancer cells mediated by ERK. *Scientific Reports*. 2016;6:25933. <https://doi.org/10.1038/srep25933>
42. Xie S, Shen C, Zhou S, Xiong M, Tan M, Song X, Wang C. Role of adenylate cyclase-associated protein 1 in cancers. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*. 2018;11:3086–3099.
43. Golubnitschaja O, Baban B, Boniolo G, Wang W, Bubnov R, Kapalla M, Krapfenbauer K, Mozaffari M, Costigliola V. Medicine in the early twenty-first century: paradigm and anticipation - EPMA position paper. *EPMA J*. 2016;7:23. <https://doi.org/10.1186/s13167-016-0072-4>
44. Alharithy RN. Polymorphisms in RETN gene and susceptibility to colon cancer in Saudi patients. *Annals of Saudi Medicine*. 2014;34:334-339.

45. Zayani N, Hamdouni H, Boumaiza I, Achour O, Neffati F, Omezzine A, Najjar MF, Bouslama A. Resistin polymorphisms, plasma resistin levels and obesity in Tunisian volunteers. *Journal of clinical laboratory analysis*. 2018;32(2):e22227.
46. Luo Y, Liu M. Adiponectin: a versatile player of innate immunity. *Journal of molecular cell biology*. 2016;8:120-128.
47. Balsan GA, Vieira JL, Oliveira AM, Portal VL. Relationship between adiponectin, obesity and insulin resistance. *Revista da Associação Médica Brasileira*. 2015;61:72-80.
48. Zazzo E, Polito R, Bartollino S, Nigro E, Porcile C, Bianco A, Daniele A, Moncharmont B. Adiponectin as Link Factor between Adipose Tissue and Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019; 20:839.
49. Jiayang Y, Li J, Changliang W, Aiqun L, Sufei M, Lianying G. Three ADIPOR1 Polymorphisms and Cancer Risk: A Meta-Analysis of Case-Control Studies. *PLoS One*. 2015; ;10(6):e0127253
50. Zhou L, Feng Zhang H, Ning W, Song X, Liu X, Liu Ji-Xi. Associations of adiponectin receptor 2 (AdipoR2) gene polymorphisms and AdipoR2 protein expression levels with the risk of colorectal cancer: A case-control study. *Molecular Medicine Reports*. 2017; 16: 3983–3993.
51. Katira A, Peng T. Evolving role of adiponectin in cancer-controversies and update. *Cancer Biology and Medicine*. 2016;13:101–119.
52. Zhao P, Zhang Z. TNF- α promotes colon cancer cell migration and invasion by upregulating TROP-2. *Oncology Letters*. 2018;15:3820-3827.
53. Christou N, Perraud A, Blondy S, Jauberteau M, Battu S, Mathonnet M. E-cadherin: A potential biomarker of colorectal cancer prognosis. *Oncology Letters*. 2017;13:4571–4576.
54. Smyth D, Leung G, Fernando M, McKay DM. Reduced surface expression of epithelial E-cadherin evoked by interferon-gamma is Fyn kinase-dependent. *PLoS One*. 2012;7:e38441. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038441>
55. Suarez-Carmona M, Lesage J, Cataldo D, Gilles Ch. EMT and inflammation: inseparable actors of cancer progression. *Molecular Oncology*. 2017;11:805–823.
56. Tae CH, Kim SE, Jung SA, Joo YH, Shim KN, Jung HK, Kim TH, Cho MS, Kim KH, Kim JS. Involvement of adiponectin in early stage of colorectal carcinogenesis. *BMC Cancer*. 2014; 811. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-14-811>
57. Brahmkhatri V, Prasanna C, Atreya H. Insulin-Like Growth Factor System in Cancer: Novel Targeted Therapies. *BioMed Research International*. 2015; 2015:1-24
58. AsghariHanjani N, Vafa M. The role of IGF-1 in obesity, cardiovascular disease, and cancer. *Medical journal of the Islamic Republic of Iran*. 2019;33:56. <https://doi.org/10.34171/mjiri.33.56>

59. Yosry A, Omran D, Yousef M, Salah M, Omar H, Hamdy S, Shaker O, Elsherif Y, Marie MS. SNPs in the Insulin-Like Growth Factor Gene and Obesity Impact on Colorectal Cancer in Egyptians. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 2017;18:2959-2964.
60. Schirripa M, Zhang W, Heinemann V, Cao S, Okazaki S, Yang D, Loupakis F, Berger MD, Ning Y, Miyamoto Y, Suenaga M et al. Single nucleotide polymorphisms in the IGF-IRS pathway are associated with outcome in mCRC patients enrolled in the FIRE-3 trial. *International Journal of Cancer*. 2017;141:383-392.
61. Playford MP, Bicknell D, Bodmer WF, Macaulay VM. Insulin-like growth factor 1 regulates the location, stability, and transcriptional activity of beta-catenin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 2000;97:12103-12108.

F. Očekivani rezultati

Na osnovu rezultata prethodnih istraživanja, u ovoj studiji možemo očekivati značajne razlike u koncentracijama lipidnih markera između pacijenata i kontrolne grupe, a pre svega snižene koncentracije HDL-holesterola kod pacijenata sa CRC. Imajući u vidu uloge enzima LCAT, CETP i PON1 u metabolizmu HDL, očekujemo smanjenje aktivnosti LCAT i PON1 i rast aktivnosti CETP u CRC. Ovakav nalaz bi mogao da ukaže na prisustvo nedovoljno zrelih HDL čestica obogaćenih TG, koje nisu sposobne da ostvare svoje protektivne uloge. Bez obzira na aktivnost, masena koncentracija CETP u velikoj meri zavisi od funkcionalnog statusa jetre koji je narušen u odmaklim stadijumima CRC, tako da bi zaključke u vezi sa ovim proteinom trebalo donositi uzimajući u obzir i koncentraciju i aktivnost, ali i stadijum bolesti. Literaturno se ističe i značaj reaktivnih kiseoničnih i nitratnih vrsta za etiopatogenezu CRC, pa shodno tome očekujemo da će se pacijenti nalaziti u stanju povišenog oksidativnog stresa i redukovane antioksidativne zaštite.

S obzirom na savremena saznanja u vezi sa mehanizmima regulacije genske ekspresije, u ovoj studiji se očekuje da bi izabrani genski polimorfizmi značajni za razvoj CRC mogli biti povezani sa promenama nivoa ekspresije gena za adiponektinske receptore, CAP-1, TNF- α i rezistin. Takođe, imajući u vidu do sada rasvetljene mehanizme povezanosti metaboličkih puteva u nastanku CRC, kod nosilaca određenih alela očekuju se promene kako u koncentraciji ciljnih proteina, tako i u markerima lipidne homeostaze.

Na osnovu prethodnih istraživanja mogu se očekivati povišene koncentracije cirkulišućeg rezistina i IGF-1, te snižene koncentracije E-kadherina u CRC. Međutim u sklopu tumačenja ovih rezultata treba uzeti u obzir više činilaca, a prvenstveno glavna mesta sinteze ovih proteina, stepen progresije tumora i zahvaćenost udaljenih tkiva i organa. Naime uočeno je da osobe sa narušenom

sintetskom funkcijom jetre imaju niže koncentracije IGF-1, dok pacijenti sa uznapredovalim formama karcinoma imaju povišene koncentracije E-kadherina. Dosadašnji napori u evaluiranju nivoa ekspresije Adipor1 i Adipor2 i TNF- α u CRC su rezultovali oprečnim rezultatima. Nishodno regulisana genska ekspresija adiponektinskih receptora bi mogla da ukaže na izostanak protektivnih efekata adiponektina, što zajedno sa ostalim pokazateljima narušene metaboličke ravnoteže doprinosi razumevanju kompleksne etiopatogeneze CRC. Evaluacija nivoa ekspresije gena za TNF- α mogla bi da dodatno rasvetli imunološki aspekt promenjene homeostaze u CRC.

Najznačajniji rezultati ovog istraživanja odnose se na evaluaciju dijagnostičkog i prediktivnog potencijala predloženih novih biomarkera CRC, ali i formiranih multimarkerskih modela. Ukoliko bi se u preliminarnom istraživanju pokazao kao uspešan, multimarkerski pristup bi značajno doprineo predviđanju razvoja i dijagnostici CRC. S obzirom na povezanost metaboličkih procesa u kojima učestvuju parametri selektovani u ovom istraživanju, očekuje se da se identifikuju značajne korelacije između njih. Ova međuzavisnost će se iskoristiti kao osnova za definisanje multimarkerskih panela značajnih za predikciju i dijagnozu CRC iz uzoraka krvi. Na osnovu svega rečenog, očekujemo da bi, zbog sveobuhvatnog pristupa, multimarkerski modeli u ROC analizi i ispitivanju prediktivnog kapaciteta ostvarili bolje rezultate u predviđanju prisustva bolesti i identifikaciji obolelih u odnosu na pojedinačne parametre.

G. Zaključak

Predložena tema doktorske disertacije nudi inovativni pristup u proceni potencijalnih biomarkera CRC. Originalnost istraživanja se ogleda u integrativnoj analizi parametara lipidnog statusa i inflamacije, pri čemu se teži ka sveobuhvatnom ispitivanju svakog pojedinačnog biomarkera sa biohemijskog i genetskog aspekta. U tom smislu, predloženo istraživanje bi se na potpuno novi način bavilo evaluacijom prediktivnog i dijagnostičkog kapaciteta pojedinačnih i udruženih biomarkera CRC. Ukoliko se potvrdi prednost multimarkerskih modela u odnosu na pojedinačne biomarkere, oni bi se mogli primenjivati za pouzdanu identifikaciju osoba sa povišenim rizikom za nastanak CRC, kao i za ranu dijagnostiku ovog oboljenja. Takođe, ispitivanje povezanosti biohemijskih i genetskih biomarkera daje doprinos temeljnom razumevanju etiopatogeneze CRC, ali i otvara vrata personalizovanom pristupu u laboratorijskoj dijagnostici. Posebno treba naglasiti orijentaciju predloženog istraživanja na one parametre koji su dostupni iz uzoraka venske krvi, što je naročito značajno imajući u vidu invazivnost postojećih dijagnostičkih procedura za CRC i potrebu za definisanjem pouzdanih neinvazivnih biomarkera. Konačno, formiranjem multimarkerskih panela identifikuju se ključni cirkulišući parametri sa najvećim potencijalom za predikciju i dijagnozu CRC,

ali omogućava i otkrivanje kritičnih tačaka metabolizma na koje bi potencijalno u budućnosti mogle biti usmerene preventivne ili terapijske mere.

Na osnovu izloženog Komisija smatra da kandidat magistar farmacije-medicinski biohemičar Marija Mihajlović ispunjava sve uslove za izradu doktorske disertacije, a da je tema naučno zasnovana i aktuelna. Komisija predlaže Nastavno-naučnom veću Farmaceutskog fakulteta da prihvati predloženu prijavu teme doktorske disertacije pod nazivom: „Multimarkerski pristup u proceni značaja potencijalnih lipidnih i inflamatornih biomarkera kolorektalnog karcinoma” i odobri kandidatu izradu doktorske disertacije.

Članovi komisije

dr sc. Aleksandra Zeljković, mentor, vanredni profesor,
Univerzitet u Beogradu-Farmaceutski fakultet

dr sc. Vesna Spasojević-Kalimanovska, redovni profesor,
Univerzitet u Beogradu-Farmaceutski fakultet

dr sc. Ana Ninić, vanredni profesor,
Univerzitet u Beogradu-Farmaceutski fakultet

dr sc. Aleksandra Stefanović, vanredni profesor,
Univerzitet u Beogradu-Farmaceutski fakultet

dr sc. Bratislav Trifunović, vanredni profesor
Medicinski fakultet Vojnomedicinske akademije Univerziteta odbrane u Beogradu

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ
ФАРМАЦЕУТСКИ ФАКУЛТЕТ
Војводе Степе 450
11000 Београд
Бр. 2262/2
Датум: 20.11.2015.

На основу чл. 19 Правилника о раду Етичког комитета за биомедицинска истраживања Фармацеутског факултета у Београду, Етички комитет за биомедицинска истраживања Фармацеутског факултета у Београду, на седници одржаној 20.11.2015. године донео је

ОДЛУКУ

ДАЈЕ СЕ САГЛАСНОСТ за спровођење истраживања под називом „Испитивање наследних и стечених фактора ризика за настанак и развој кардиоваскуларних болести, метаболичког синдрома и колоректалног карцинома повезаних са дислипидемијом, оксидативним стресом, инфламацијом, статусом витамина Д и теломера-теломераза системом код здравих особа“, које се изводи у оквиру научноистраживачког пројекта основних истраживања Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије под називом „Интерактивна улога дислипидемије, оксидативног стреса и инфламације у атеросклерози и другим болестима: генетички и биохемијски маркери“ (бр. 175035), чији је носилац Фармацеутски факултет у Београду, а руководилац др Зорана Јелић-Ивановић, редовни професор Фармацеутског факултета у Београду.

Подносиоци молбе за истраживање из става 1 ове одлуке су др Зорана Јелић-Ивановић, редовни професор Фармацеутског факултета у Београду и студенти докторских академских студија модул медицинска биохемија на Фармацеутском факултету у Београду и то:

1. mr sc ph Весна Вуковић
2. dipl ph Јелена Јанаћ
3. mr ph Марија Михајловић
4. mr ph Александра Вукашиновић
5. mr ph Сандра Владимиров
6. mr ph Милица Стевановић.

Истраживање из става 1 ове одлуке ће бити саставни део докторских дисертација докторанада именованих у ставу 2 ове одлуке.

Одлуку доставити: председнику Комитета, подносиоцима молбе, председнику Комисије за последипломску наставу-докторске студије, секретару, шефу Одсека за правне и опште послове, Одсеку за наставу и студентска питања, Одсеку за правне и опште послове, пословном секретару и архиви



ПРЕДСЕДНИК ЕТИЧКОГ КОМИТЕТА
ЗА БИОМЕДИЦИНСКА ИСТРАЖИВАЊА
Проф. др Слађана Шобајић

S. Šobajić