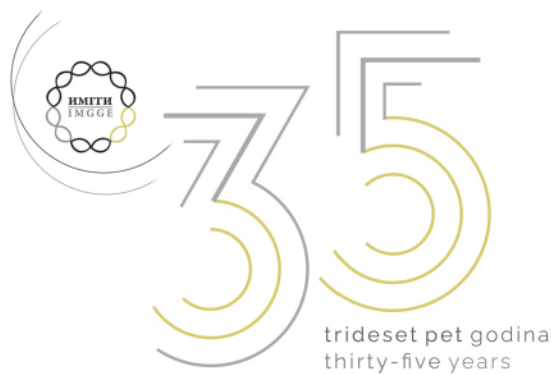


Broj 1 • septembar 2021. N° 1 • September 2021.



Trendovi u **molekularnoj biologiji**
Trends in **Molecular Biology**



Beograd • Belgrade • 2021.
IMGGI • IMGGE

Sadržaj • Content

Personalizovana medicina i COVID-19: značaj genomskog profilisanja pacijenata i bioinformatike Branka Zukić, Biljana Stanković, Nikola Kotur	6	Personalized medicine and COVID-19: the importance of genomic host profiling and bioinformatics
Izotermalna amplifikacija posredovana petljom (LAMP) kao metoda za terensku detekciju SARS-CoV-2 virusa Mila Djisalov, Teodora Knežić, Ljiljana Janjušević, Željko D. Popović, Petar Kosijer, Ivana Gadjanski	21	Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) as a point-of-care SARS-CoV-2 detection method
CRISPR-Cas9 tehnologija: od osnovnih istraživanja do kliničke prakse Marko Panić	33	CRISPR-Cas9 technology: from basic research to clinical application
Primena CRISPR/Cas9 tehnologije u otkrivanju novih molekularnih terapeutika Anita Skakić, Maja Stojilković	42	Application of CRISPR/Cas9 technology in the discovery of new molecular therapeutics
Nova paradigma u dijagnostici retkih bolesti Milica Keckarević Marković, Miljana Kecmanović, Dušan Keckarević	54	Diagnostics of rare diseases: New paradigm
Genetička i epigenetička karakterizacija varijantnih <i>DMPK</i> ekspanzija kao modifikatora fenotipa miotonične distrofije tipa 1 Jovan Pešović, Stojan Perić, Lana Radenković, Vidosava Rakočević-Stojanović, Dušanka Savić-Pavićević	60	Genetic and epigenetic characterization of variant <i>DMPK</i> expansions as a modifier of phenotype in myotonic dystrophy type 1
Molekularna osnova primarne cilijarne diskinezije Marina Anđelković	71	Molecular basis of primary ciliary dyskinesia
Molekularna osnova monogenetskog dijabetesa Jovana Komazec, Milena Ugrin	84	The Molecular Basis of Monogenic Diabetes
Diferencijalna dijagnoza eozinofilnog infiltrata u sluznici jednjaka primenom molekularno-bioloških metoda Nina Ristić, Tijana Išić Denčić, Radmila Janković	96	Differential diagnosis of eosinophilic infiltrate in esophageal mucosa by applying molecular biology methods
Molekularni markeri u sistemskoj sklerozii: geni kandidati i terapijski modaliteti Vesna Spasovski, Miša Vreća	107	Molecular markers in systemic sclerosis: candidate genes and therapeutic modalities
Duga nekodirajuća RNK GAS5 kao novi biomarker u onkologiji Vladimir Gašić, Nataša Tošić	113	Long noncoding RNA GAS5 as a new biomarker in oncology
Prediktivna i prognostička uloga gena p16INK4a, p14ARF i KRAS u karcinomu rektuma čoveka Bojana Kožik, Milena Krajnović, Nikola Kokanov	123	Predictive and prognostic role of p16INK4a, p14ARF and KRAS genes in human rectal carcinoma
Savremena molekularno-biološka ispitivanja prognostičkih faktora papilarnog tiroidnog karcinoma i mogućnost njihove primene u kliničkoj praksi Ilona Đorić, Jelena Janković Miljuš, Sonja Šelemetjev	133	Contemporary molecular-biological investigations of papillary thyroid carcinoma prognostic factors and their potential for application in clinical practice
Nekodirajuće RNK kao perspektiva u dijagnostici i lečenju kardiovaskularnih bolesti Ljiljana Rakićević	146	Non-coding RNAs as a prospect in diagnostics and treatment of cardiovascular diseases
Biološko delovanje polifenola nara na komponente metaboličkog sindroma: implikacije na oksidativni stres Milica Kojadinović i Aleksandra Arsić	152	Biological effect of pomegranate polyphenols on the components of metabolic syndrome: implications on oxidative stress
Biogeni utišavači virulencije vrste <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Milka Malešević, Branko Jovčić	166	Biogenic silencers of <i>Pseudomonas aeruginosa</i> virulence
Silicijum kao antistres element za biljke izložene toksičnim koncentracijama bakra Dragana Bosnić, Dragana Nikolić, Jelena Samardžić	180	Silicon as an anti-stress element for plants exposed to toxic copper

PREDGOVOR

Molekularna biologija doživljava svoj procvat u XXI veku. Od naučne discipline koja je početkom 1930-ih bila u povojima, i koja je nastojala da objedini genetiku, biohemiju i biofiziku kako bi rasvetlila tajne života, izrasla je u nauku čija su postignuća doprinela velikom napretku u medicini, veterini, poljoprivredi i farmaciji. Uz informaciono komunikacione tehnologije, molekularna biologija je najperspektivnija oblast istraživanja, od koje se očekuje da značajno doprinese boljitku života ljudi u budućnosti.

U Srbiji je molekularna biologija prepoznata relativno rano, pre nego na mnogim drugim meridijanima. Već u školskoj 1972/73. se na Biološkom fakultetu u Beogradu (tada Prirodno-matematički fakultet) osniva smer- molekularna biologija i fiziologija. U našoj zemlji se tako edukuju generacije molekularnih biologa već pola veka. I veliki naučni instituti u Srbiji osnivaju laboratorije u kojima istraživanja prate, a ponekad i predvode, svetske trendove u molekularnoj biologiji. Jedna od tih naučnih institucija je Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo (IMGGI), osnovan 1986. godine u Beogradu. Već 35 godina naučnici iz IMGGI stavljaju najmodernije teme iz molekularne biologije u fokus svojih istraživanja.

Ovaj Tematski zbornik ima za cilj da prikaže aktuelne teme i postignuća iz oblasti molekularne biologije u prethodnoj, 2020. godini i da svedoči o tome kako su naučnici u Srbiji učestvovali u tim svetskim trendovima. Poglavlja su rezultat doktorskih teza mladih molekularnih biologa ali i prikaz aktuelnih istraživanja u kojima je istaknut doprinos naših naučnika. Od godine 2020. se očekivao veliki napredak u mnogim disciplinama zahvaljujući novim saznanjima iz molekularne biologije. Početak godine je doneo pandemiju KOVID-19 bolesti, koja je imala sve karakteristike epidemija iz ranijih vekova. Bili smo na pragu velikog razočaranja. A onda je molekularna biologija upotrebila sve svoje kapacitete, tako što je omogućila karakterizaciju virusa, uzročnika bolesti, za izuzetno kratko vreme. Iz tog razloga metode za detekciju virusa su bile razvijene u rekordnom roku, te je brza i efikasna dijagnostika postala dostupna lekarima. A potom su se pojavile vakcine, rezultat modernih metoda genetičkog inženjerstva. I tako je 2020. godina ipak bila jedinstvena u istoriji, jer je odgovor na epidemiju bio brz i efikasan, zahvaljujući, u velikoj meri, molekularnoj biologiji. Iste godine, Nobelova nagrada za hemiju je dodeljena metodi koja efikasno i tačno edituje humani genom. Vrata medicine budućnosti su se širom otvorila.

Ova sveska bi trebalo da bude prva u nizu godišnjih tematskih zbornika posvećenih aktuelnim temama iz molekularne biologije. Svesni smo kako će ovi rezultati izgledati za deceniju ili dve. Ali, ovo su „znakovi pored puta“ koje je naše vreme ostavilo, osvetljavajući put kojim se ide napred. Mi smo zadivljeni napretkom naše nauke, kad pogledamo u prošlost, ali smo i svesni koji su njeni dometi u odnosu na ono čemu nauka stremi. Radujemo se budućim sveskama i verujemo da će one otvarati nove perspektive i trasirati put napretka.

Nadamo se da će ovaj Tematski zbornik naći put do mladih ljudi, da će ih inspirisati da se opredele za naučni rad, posebno za molekularnu biologiju. Verujemo da će buduće generacije uvideti da naučni rad i u ovoj zemlji može dati doprinos svetskoj nauci a pri tome i dovesti do poboljšanja života ljudi u našoj zemlji. Od svih koji su učestvovali u stvaranju ovog svedočenja o našem vremenu, poruka za vas koji dolazite je:

„Hoćemo li na molekularnu?!“

Sonja Pavlović

IZ RECENZIJA TEMATSKOG ZBORNIKA

Trendovi u molekularnoj biologiji

Tematski zbornik *Trendovi u molekularnoj biologiji* oslikava trenutno stanje i fokus istraživanja u molekularnoj biologiji u Srbiji. Izabrane tematske oblasti i reprezentativni radovi jasno govore o mogućnostima i dometima ove naučne oblasti i spremnosti istraživača u Srbiji da prate trendove i savremene naučne pristupe.

Osim trenutno aktuelnog COVID-19, molekularna biologija je unapredila i obogatila istraživanja u medicini kroz oblast biomedicine. Težište ovog Tematskog zbornika je na rezultatima istraživanja molekularne osnove kompleksnih i retkih bolesti. Proučavanje prokariota dovelo je do mnogih fundamentalnih i revolucionarnih otkrića u molekularnoj biologiji, koja su otvorila put ka biotehnološkoj primeni. Jedno od takvih otkrića je i CRISPR/Cas9 tehnologija za editovanje genoma. Veoma važna oblast istraživanja je i potraga za inovativnim načinima kontrole infekcija izazvanih bakterijama koje su rezistentne na konvencionalne antibiotike. O ovim temama se takođe govori u Tematskom zborniku. Istraživanja u molekularnoj biologiji biljaka ne samo da su proširila znanja o ovim organizmima, već su otvorila put ka primeni savremenih metoda za poboljšanje osobina biljaka i povećanje prinosa. U tom smislu je veoma zanimljiv i ilustrativan rad koji je prikazan u ovom Zborniku.

Tematski zbornik *Trendovi u molekularnoj biologiji* jasno je ukazao na naučni i širi društveni značaj istraživanja u molekularnoj biologiji. Ovim prvim brojem nagoveštava se da će Zbornik ne samo pratiti i dokumentovati najznačajnija dostignuća u molekularnoj biologiji, već da će biti podstrek i inspiracija istraživačima u Srbiji.

Prof. Svetlana Radović, redovni profesor Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu

Tematski zbornik „Trendovi u molekularnoj biologiji“ je sačinjen od 17 poglavlja u kojima su predstavljeni naučni rezultati iz oblasti molekularne biologije koje su ostvarili naučnici iz Srbije. Veliki broj poglavlja iz Zbornika je posvećen istraživanjima iz oblasti biomedicine. Doprinos koji je molekularna biologija dala modernoj medicini je izuzetno veliki. Danas su u kliničkoj praksi mnogobrojni dijagnostički, prognostički i terapijskih molekularni markeri. Posebno je značajno što je medicina u Srbiji pratila svetske trendove, i to zahvaljujući i velikim naporima molekularnih biologa u našoj zemlji.

Najbolji primer postignuća molekularne biomedicine je odgovor ove nauke na pandemiju KOVID-19. Dijagnostika je omogućena uzuzetno brzo jer je molekularna biologija bila spremna za ovaj zadatak. Ipak je razvoj vakcina u fascinantnom roku najveće postignuće ove nauke. Molekularna biologija je pokazala svoju snagu u pravom trenutku i postala najznačajnija nauka u kriznim momentima za čovečanstvo, kako u svetu, tako i u našoj zemlji.

Sigurno je da će ovako koncipiran Tematski zbornik imati budućnost, jer je napredak medicine nemoguće zamisliti bez novih dostignuća molekularne biologije.

Prof. dr Vesna Škodrić-Trifunović, redovni profesor Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

Ovaj Tematski zbornik kroz četiri celine daje pregled najznačajnijih ostvarenja u molekularnoj biologiji u svetu, a kojima se bave i istraživači u Srbiji. U okviru 17 preglednih radova prikazani su različiti rezultati - od onih koji su obeležili prethodnu godinu (posvećeni COVID-19 i CRISPR/Cas9 tehnologiji), preko novih dostignuća u biomedicini (retkih i kompleksnih bolesti), do molekularno bioloških istraživanja prokariota i biljaka.

Značaj ovog Zbornika je višestruk, ogleda se ne samo u činjenici da su najrelevantnija saznanja iz navedenih oblasti objedinjena i postala dostupna široj javnosti na maternjem jeziku, već i zbog toga što su radove napisali istraživači iz različitih naučnih instituta (6), fakulteta (3) i klinika (2) iz Srbije, u kojima se ta istraživanja aktivno sprovode. Naime, saznanja o SARS-CoV-2 koronavirusu, uzročniku nove bolesti COVID-19, se kontinuirano uvećavaju i veoma je važno što i naučnici iz naše zemlje daju doprinos u razumevanju ove pandemije. Isto se odnosi i na najnovije tehnologije za manipulaciju molekula DNK, koje su dovele do revolucionarnih pomaka u biomedicinskim naukama. Stoga, prikazana istraživanja molekularne osnove različitih bolesti najsavremenijim metodološkim pristupima, primena dobijenih rezultata u dijagnozi, preciznom predviđanju progresije bolesti i lečenju, kao i razvoju novih molekularnih terapeutika, daju realnu osnovu očekivanjima da će personalizovana medicina uskoro postati široko dostupna.

Dr Gordana Nikčević, naučni savetnik Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Univerzitet u Beogradu

Prediktivna i prognostička uloga gena *p16INK4a*, *p14ARF* i *KRAS* u karcinomu rektuma čoveka

Bojana Kožik, Milena Krajnović, Nikola Kokanov

Institut za nuklearne nauke "Vinča", Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerzitet u Beogradu

Kontakt: bojana86@vin.bg.ac.rs

Apstrakt

Karcinom rektuma (KR) čini oko 30% svih slučajeva kolorektalnih karcinoma (KRK), koji se u zadnje vreme proučava kao zaseban klinički entitet. Aktuelan terapijski pristup u lečenju lokalno uznapredovalih stadijuma KR podrazumeva primenu preoperativne hemioradioterapije (HRT), nakon koje sledi hirurško uklanjanje tumora. Iako se ovim tretmanom postiže bolja lokalna kontrola bolesti, individualni odgovor na primenjenu terapiju je varijabilan i ukazuje na značajnu biološku heterogenost tumora u okviru istog kliničkog stadijuma. Stoga je u cilju kreiranja i primene personalizovane terapije neophodno definisati prediktivne i prognostičke molekularne parametre. Primenom PCR metode specifične za metilaciju (MSP), ispitivan je metilacioni status gena *p16INK4a* i *p14ARF*, dok je automatskim sekvenciranjem analiziran mutacioni status gena *KRAS* u pre-tretmanskim biopsijama tumorskog tkiva obolelih od KR u lokalno uznapredovalom stadijumu, kao bi se utvrdio njihov potencijalni prediktivni i prognostički značaj. Rezultati ove studije su pokazali da ispitivane promene u genima *p16INK4a*, *p14ARF* i *KRAS* pojedinačno gledano, nisu značajni prediktivni i prognostički faktori kod obolelih od KR, mada je istovremeno prisustvo metilacije gena *p14ARF* i mutacije gena *KRAS* povezano sa agresivnijim ponašanjem tumora, dok je istovremeno prisustvo izmena u sva tri ispitivana gena povezano sa kraćim ukupnim preživljavanjem. Međutim, kombinovane analize genetičkih, epigenetičkih i imunohistohemijskih parametara (EGFR, VEGF, Bcl-2 i Ki-67), mogu imati klinički značaj u identifikaciji podgrupa obolelih, koje se međusobno razlikuju kako prema odgovoru na HRT, tako i prema toku i ishodu bolesti.

Ključne reči: karcinom rektuma (KR), metilacija, mutacija, *p16INK4a*, *p14ARF*, *KRAS*

Predictive and prognostic role of *p16INK4a*, *p14ARF* and *KRAS* genes in human rectal carcinoma

Bojana Kožik, Milena Krajnović, Nikola Kokanov

Vinča Institute of Nuclear Sciences, National Institute of Republic of Serbia, University of Belgrade

Correspondence: bojana86@vin.bg.ac.rs

Abstract

Rectal carcinoma (RC) represents approximately 30% cases of colorectal carcinomas (CRC), which is nowadays studied as a distinct clinical entity. The current management of locally advanced rectal carcinoma involves neoadjuvant chemoradiotherapy (CRT) prior to surgery. Despite improved local control rate, individual patient response to CRT is variable and may reflect heterogeneous biological properties among tumors of the same clinical stage. So, there is utility to define predictive and prognostic molecular parameters of response and to personalize therapeutic approach. Methylation-specific polymerase chain reaction (MSP) was used to examine *p16INK4a* and *p14ARF* methylation status, while *KRAS* mutation status was analyzed by direct sequencing in pretreatment tumor biopsies of patients with locally advanced RC, in order to evaluate its potential predictive and/or prognostic role. According to the results of this study, examined molecular changes of *p16INK4a*, *p14ARF* and *KRAS* genes, considering separately, were not proven to be significant predictive and prognostic factors in RC patients, although simultaneous presence of *p14ARF* methylation and *KRAS* mutation was associated with more aggressive tumor behavior, while concurrent presence of genetic/epigenetic alteration in all three examined genes was correlated with shorter overall survival. However, combined analyses of genetic, epigenetic and immunohistochemical parameters (EGFR, VEGF, Bcl-2 and Ki-67), could have important clinical relevance in identification of RC patients subgroups, with distinct pattern of response to CRT and disease outcome.

Keywords: Rectal Carcinoma (RC), Methylation, Mutation, *p16INK4a*, *p14ARF*, *KRAS*

UVOD

Kolorektalni karcinom (KRK) predstavlja jedno od najčešćih malignih oboljenja gastrointestinalnog trakta, čija učestalost je u stalnom porastu, pogotovo u razvijenijim zemljama. Ovaj tip tumora je trenutno na drugom mestu kao uzročnik smrtnosti od malignih bolesti u svetu [1], te stoga predstavlja globalni zdravstveni problem. Generalno gledano, KRK se može definisati kao skup oboljenja sa različitim kliničkim manifestacijama, u čijoj osnovi leži izrazita heterogenost na molekularnom nivou [2-4]. Poseban klinički izazov jesu uznapredovali stadijumi KRK, koje odlikuje značajna hemiorezistentnost i visok stepen pojave recidiva [5, 6]. S obzirom da aktuelni terapijski pristupi nisu dovoljno efikasni, od posebnog bi značaja bilo pronaći odgovarajući model koji bi predvideo odgovor obolelih na primenjenu terapiju.

KARCINOM REKTUMA

Karcinom rektuma (KR) je posle karcinoma proksimalnog kolona drugi najčešći oblik tumora debelog creva i obuhvata između 28-35% svih slučajeva kolorektalnih karcinoma [7]. Iako se karcinom kolona i karcinom rektuma u epidemiološkim studijama proučavaju kao jedan klinički entitet, sve je više podataka koji ukazuju na to da KR predstavlja zaseban klinički entitet sa znatnim specifičnostima u pogledu patogeneze koji zahteva drugačiji terapijski pristup u odnosu na karcinom kolona [8, 9].

TERAPIJSKI PRISTUP U LEČENJU KARCINOMA REKTUMA

Osnovni i najvažniji vid lečenja kolorektalnih karcinoma je odstranjivanje tumora hirurškim putem. U slučaju lokalne proširenosti bolesti, kombinovana primena hirurgije, radioterapije i hemioterapije predstavlja „zlatni standard“ u lečenju obolelih. Aktuelan terapijski pristup u lečenju lokalno uznapredovalih stadijuma KR podrazumeva primenu preoperativne (neoadjuvantne) hemioradioterapije (HRT), nakon koje sledi operativni tretman [10, 11]. Pored toga što je primena preoperativne HRT manje toksična i što znatno smanjuje tumorsku masu i olakšava operativni zahvat, efikasnost ovog tretmana se ogleda i u značajno smanjenoj učestalosti lokalnih recidiva i dužem ukupnom preživljavanju obolelih [10, 12]. Međutim, individualni odgovor pacijenata na preoperativnu HRT je varijabilan. Kompletan patološki odgovor (pKO), odnosno redukcija tumorske mase, postiže se kod samo 10-20% ispitanika [13, 14], dok u 30% slučajeva odgovor u potpunosti izostaje [15, 16].

124 PREDIKTIVNI FAKTORI TUMORSKOG ODGOVORA NA PREOPERATIVNU HRT

S obzirom da odgovor na preoperativnu HRT nije uniforman, od kliničke važnosti je identifikovati pacijente kojima će primenjeni tretman biti od koristi u daljem toku lečenja, a sa druge strane izbeći neželjene efekte zračenja i hemioterapeutika kod pacijenta sa tumorom rezistentnim na terapiju [17]. Brojni ispitivani biomarkeri dovode se u vezu sa stadijumom bolesti i krajnjim ishodom, a kategorisani su kao prediktivni i prognostički parametri. U eri napretka personalizovane medicine, krajnji cilj je definisati molekularne biomarkere u pre-tretmanskim biopsijama KR, koji će pored standardnih kliničko-patoloških parametara, doprineti boljoj stratifikaciji pacijenata i optimizaciji terapijskog režima za svakog pacijenta posebno [18, 19].

Poslednjih godina znatno se ispituje prediktivna uloga brojnih molekularnih parametara u pretretmanskim biopsijama, kao što je nivo ekspresije receptora za epidermalni faktora rasta - EGFR (eng. Epidermal Growth Factor Receptor), vaskularnog endotelnog faktora rasta - VEGF, TP53, timidilat sintaze - TS, Ki-67 (eng. Proliferation - Related Ki-67 Antigen, MKI67), p21 (eng. p21 Protein-Activated Kinase 2; PAK2), Bcl-2 (eng. B-Cell CLL/Lymphoma 2, BCL2), APAF-1 (eng. Apoptotic Protease Activating Factor 1, APAF1) i mnogih drugih [20-22]. Međutim, rezultati istraživanja potencijalnih biomarkera su često kontradiktorni i potrebna je usaglašenost u metodologiji i interpretaciji rezultata da bi ispitivani parametri dobili kliničku primenu [22].

ULOGA METILACIJE GENA *P16INK4A* I *P14ARF* U KOLOREKTALNOJ KANCEROGENEZI

Intezivna istraživanja molekularne patogeneze tumora čoveka u poslednje tri decenije, nedvosmisleno pokazuju da u osnovi etiologije malignih oboljenja leže kako genetičke, tako i epigenetičke promene [5, 23]. Genetičke i epigenetičke aberacije koje leže u osnovi kancerogeneze tumora debelog creva su kompleksne i nisu u potpunosti razjašnjene, ali je opšte prihvaćeno da su različiti molekularni procesi odgovorni za nastanak i razvoj tumora u različitim delovima kolona i rektuma [24]. Najviše ispitivana epigenetička modifikacija kod KRK jeste proces metilacije molekula DNK, pod kojim se podrazumeva kovalentno dodavanje metil grupe na C5 poziciju citozinskog prstena u okviru CpG dinuleotida [25]. Aberantna *de novo* metilacija inače nemetilovanih CpG ostrvaca u okviru promotorskog regiona gena

predstavlja snažan mehanizam suprimiranja njihove ekspresije. Geni *p16INK4a* (eng. Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 2A, p16INK4a) i *p14ARF* (eng. Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2A, CDKN2A alias symbol p14ARF) se nalaze u okviru INK4a/ARF lokusa na hromozomskoj poziciji 9p21, koji je često deletiran ili metilovan u različitim tipovima tumora [26]. Svoju tumor-supresorsku ulogu, kao regulatori ćelijskog ciklusa ostvaruju u okviru dva komplementarna signalna puta, P16INK4a/pRb i P14ARF/p53. Protein P16INK4a je ciklin-zavisni inhibitor koji sprečava fosforilaciju proteina pRb i samim tim zaustavlja ćelijski ciklus u G1 fazi [27]. Protein P14ARF indirektno pokreće zastoj ćelijskog ciklusa i pokreće proces apoptoze, tako što ostvaruje interakciju sa proteinom MDM2, koji obeležava protein p53 za degradaciju [28]. Inaktivacija ova dva gena putem hipermetilacije promotorskih regiona rani je i relativno čest događaj tokom kolorektalne kancerogeneze [29-32] i predstavlja važan događaj za patogenezu tumora debelog creva [33, 34]. Međutim, mali je broj studija koje su se bavile ispitivanjem potencijalnih metilacionih markera u cilju predikcije odgovora na preoperativnu HRT kod obolelih od KR [35], tako da prediktivna i prognostička uloga metilacionog statusa gena *p16INK4a* i *p14ARF* kod karcinoma rektuma, kao posebnog entiteta nije u potpunosti utvrđena.

ULOGA MUTACIJE GENA *KRAS* U KOLOREKTALNOJ KANCEROGENEZI

Molekularnu patogenezu tumora debelog creva odlikuju i somatske mutacije proto-onkogeno *KRAS* (eng. *Kirsten Rat Sarcoma 2 Viral Oncogene Homolog*, *KRAS*) [36], koji kodira mali membrano-vezujući protein sa GTP-aznom aktivnošću i putem prenosa signala preko kinaze MAP ostvaruje važnu ulogu u rastu i deobi ćelija. Kod 30-40% slučajeva KRK detektovane su tačkaste mutacije u genu *KRAS*, najčešće locirane u 12-om i 13-om kodonu egzona 2 [37]. Kao posledica mutacija sintetiše se konstitutivno aktiviran produkt gena *KRAS* sa trajno inhibiranom GTP-aznom funkcijom, što indirektno doprinosi inicijaciji tumora, kao i rastu tumorskih ćelija, njihovom preživljavanju, invaziji okolnog tkiva, angiogenezi i formiranju metastaza. Mutacije u genu *KRAS* smatraju se ranim događajem u kolorektalnoj kancerogenezi [36], a s obzirom da je onkogeno aktivacija RAS/RAF/MAP signalnog puta uključena u mnoge aspekte malignog procesa, pretpostavlja se da mutacioni status gena *KRAS* može biti prognostički faktor u KRK. Međutim, podaci o prognostičkom značaju mutacionog statusa gena *KRAS* u KRK su kontroverzni i zahtevaju dodatna ispitivanja. Mutacioni status gena *KRAS* koristi se kao molekularni marker odgovora na ciljanu terapiju metastatskog KRK monoklonskim antitelima usmerenim na inhibiciju receptora EGFR [38, 39], dok potencijalni klinički značaj mutacionog statusa gena *KRAS* za predikciju odgovora na HRT kod karcinoma rektuma nije u potpunosti razjašnjen [40-44].

POTENCIJALNI KLINIČKI ZNAČAJ GENA *P16INK4A*, *P14ARF* I *KRAS* U KARCINOMU REKTUMA

Put prenosa signala kinaze MAP [45], kao i regulacija aktivnosti proteina koji maskira pRb [46] i proteina p53 [47] su tri najčešće narušena ćelijska puta u tumorima čoveka. Analiza glavnih učesnika ova tri signalna puta, kao i ispitivanje međuzavisnosti genetičkih/epigenetičkih promena u genima *KRAS*, *p16INK4a* i *p14ARF*, moglo bi značajno doprineti razumevanju molekularne patogeneze karcinoma rektuma kao posebnog entiteta. Rezultati studija kolorektalnog karcinoma su pokazali da protein P14ARF može da reguliše stabilnost proteina P16INK4a [48], kao i da samo prisustvo mutacije u genu *KRAS* može indirektno posredovati u metilaciji INK4a/ARF lokusa [49]. Pored toga, literaturni podaci ukazuju da onkogeno aktivacija gena *KRAS*, indukuje zaštitne mehanizme u tumorskoj ćeliji, kao što su onkogenom-indukovana senescencija preko P16INK4a/pRb puta [50], i onkogenom-indukovano zaustavljanje ćelijskog rasta i pokretanje procesa ćelijskog umiranja po tipu apoptoze preko P14ARF/p53 puta [51, 52].

Imajući u vidu gorenavedene činjenice, u ovoj studiji [53] predložen je model istovremene analize epigenetičkih (metilacija gena *p16INK4a* i *p14ARF*) i genetičkih promena (mutacije gena *KRAS*) i nivoa ekspresije odabranih proteina uključenih u proces kancerogeneze (EGFR, VEGF, Bcl-2 i Ki67) u pre-tretmanskim biopsijama tumorskog tkiva obolelih od KR u lokalno uznapredovalom stadijumu. Dobijeni rezultati mogu biti od kliničkog značaja za identifikaciju podgrupa obolelih, koje se međusobno razlikuju kako prema odgovoru na preoperativnu hemioradioterapiju, tako i prema toku i ishodu bolesti.

ISPITIVANJE METILACIONOG STATUSA GENA *P16INK4A* I *P14ARF* U UZORCIMA TKIVA KR

Rezultati naše studije koja je obuhvatala 63 uzorka [54] su pokazali da je metilacija gena *p16INK4a* odnosno gena *p14ARF* detektovana kod oko 40% (43,3% odnosno 39,6%) ispitanika i učestalost ovih epigenetičkih događaja je u skladu sa drugim studijama na kolorektalnim karcinomima [33, 55-59]. Pored toga, metilacija bar jednog ispitivanog gena detektovana je kod 60,3% ispitanika, dok je istovremena metilacija gena *p16INK4a* i *p14ARF* bila prisutna kod skoro petine obolelih, što ukazuje na to da je epigenetička alteracija ova dva gena relativno čest događaj koji može imati potencijalno važnu ulogu u patogenezi karcinoma rektuma. Podaci iz literature pokazuju da se prisustvo

metilacije gena *p16INK4a* kod KRK uglavnom povezuje sa agresivnijim tokom maligne bolesti i da je metilacija ovog gena zapravo nepovoljan prognostički parametar kod KRK [57, 60, 61]. Slična situacija je i sa prisustvom metilacije gena *p14ARF* koja u jednoj studiji koreliše sa kraćim ukupnim preživljavanjem obolelih od KRK [62], dok rezultati studije Chaar i sar., (2014) sugerišu da bi metilacija gena *p14ARF* mogla biti marker invazivnijih tipova KRK, sa sklonošću ka daljoj progresiji tumora i formiranju lokalnih recidiva i metastaza [63]. Međutim, ispitivanjem potencijalne prediktivne i prognostičke uloge metilacionog stausa gena *p16INK4a* i *p14ARF* u našoj studiji, pokazano je da metilacija ovih gena nije povezana sa odgovorom na primenjenu HRT, pojavom lokalnih recidiva i/ili metastaza i ukupnim preživljavanjem obolelih od KR. Problem u interpretaciji dobijenih rezultata leži u činjenici da podaci o zastupljenosti i ulozi metilacije gena *p16INK4a* i *p14ARF* u kancerogenezi potiču iz studija koje su razmatrale karcinom kolona i karcinom rektuma kao jedan entitet. Za bolje razumevanje uloge metilacionog statusa ispitivanih gena u predikciji odgovora na standardan tretman KR, neophodna je, pre svega, analiza na većem broju uzoraka, pri čemu je bitna usaglašenost u terapijskim režimima, načinu evaluacije odgovora na HRT, kao i stadijumima bolesti ispitanika uključenih u studije, ali i standardizacija metodologije ispitivanja metilacionog statusa.

ISPITIVANJE MUTACIONOG STATUSA GENA *KRAS* U UZORCIMA TKIVA KR

Procenat detektovanih mutacija u genu *KRAS* u našoj studiji [64] je takođe visok (35%) i u skladu sa rezultatima drugih studija, prema kojima su mutacije u ovom genu prisutne kod 19-48% obolelih od KR [41, 43, 44, 65]. Najčešće detektovani tip mutacije (36%) bila je transverzija G u T na drugoj poziciji kodona 12, što rezultuje u zameni glicina valinom (G12V). Ovaj rezultat je u saglasnosti sa prethodno objavljenim studijama sprovedenim na obolelima od KRK sa našeg geografskog područja, prema kojima se najveća učestalost ovog tipa mutacije u genu *KRAS* pripisuje izloženosti region-specifičnim karcinogenima [66, 67]. Iako je mutaciona aktivacija gena *KRAS* jedan je od najispitivanijih onkogenih događaja u patogenezi KRK, njegova prognostička i prediktivna uloga u karcinomu rektuma nije u potpunosti definisana. Rezultati studija koje su ispitivale potencijalnu ulogu mutacionog statusa gena *KRAS* kao prediktora odgovora obolelih od karcinoma rektuma na preoperativnu HRT su kontradiktorni. Dok je u određenom broju studija uočena povezanost prisustva mutacija u genu *KRAS* sa nepovoljnijim odgovorom na HRT [68, 43, 44], postoje studije kod kojih ovakve asocijacije nisu uočene [41, 69]. Ipak, treba naglasiti da u ovakvim studijama nisu primenjivani uvek isti hemioterapeutici, kao i da su postojali različiti principi definisanja tumorskog odgovora. Pored toga, često su u analizu mutacionog statusa uključeni i drugi kodoni pored standardnog 12. i 13. kodona gena *KRAS*. U našoj studiji, prisustvo mutacija u genu *KRAS* nije bilo povezano sa odgovorom na HRT, kao ni sa tokom i krajnjim ishodom bolesti. Međutim, kada se posmatraju specifični tipovi mutacija, prisustvo transverzije G u C na drugoj poziciji 12. kodona (G12A) značajno koreliše sa povoljnijim odgovorom na HRT, u poređenju sa ostalim tipovima detektovanih mutacija u ispitivanim kodonima ($p=0,017$). Bez obzira na mali broj uzoraka sa prisutnom mutacijom G12A u ovoj studiji, rezultat je vredan pažnje i zahteva dodatna ispitivanja na većem broju uzoraka. Prethodno objavljeni rezultati su pokazali da različiti tipovi mutacija gena *KRAS* imaju i različit transformišući potencijal na ćelijskom nivou. Rezultati studije Garassino i sar., (2011) pokazali su da različit tip mutacije u okviru 12. kodona gena *KRAS* može biti povezan sa različitim nivoom hemiosenzitivnosti, što se na ćelijskom nivou ogleda u aktivaciji različitih nishodnih puteva prenosa signala u odgovoru na primenjeni hemioterapeutik [69]. Pored toga, postoji mogućnost da tumori sa određenim tipom mutacije u genu *KRAS* mogu biti povezani sa različitim dodatnim genetičkim alteracijama. Međutim, nema mnogo podataka o uticaju i značaju mutacije tipa G12A (transverzija G u C) u progresiji tumora, verovatno zato što ovaj tip mutacije nije tako čest događaj i predstavlja svega 11% svih detektovanih tipova mutacija u genu *KRAS* kod KRK-a [70]. Kao što je poznato, kolon i rektum kao različite anatomske celine debelog creva izloženi su različitim sredinskim faktorima, a različit tip mutacija može nastati usled dejstva različitih karcinogenih [71, 72]. Imajući u vidu navedene činjenice, pretpostavka je da različiti karcinogeni dovode do različitih promena u genomu i doprinose u većoj ili manjoj meri tumorskoj progresiji i inavzivnosti, što se reflektuje kroz različit tip detektovanih mutacija u genu *KRAS*.

POVEZANOST METILACIJE GENA *P16INK4A* I *P14ARF* SA MUTACIJAMA U GENU *KRAS* U UZORCIMA TKIVA KR

Dobijeni rezultati analize metilacionog statusa gena *p16INK4a* i *p14ARF*, kao i mutacionog statusa gena *KRAS* u našoj studiji sugerišu da treba sagledati globalni genetički, odnosno epigenetički status tumorskih ćelija, ne samo uticaj pojedinačnih molekularnih događaja na razvoj i progresiju tumora, kao i odgovor tumorskih ćelija na primenjenu terapiju. Imajući u vidu činjenicu da je inaktivacija lokusa *INK4a/ARF* zabeležena kod 70% slučajeva KRK sa istovremeno prisutnom mutacijom u genu *KRAS* [73-76], ispitivali smo i međusobnu povezanost detektovanih epigenetičkih odnosno genetičkih promena u našoj grupi uzoraka. Iako nije uočena direktna veza između metilacionog statusa gena

p16INK4a, metilacionog statusa gena *p14ARF* i mutacionog statusa gena *KRAS*, pri analizi kombinovanog uticaja promena u navedenim genima na odgovor na HRT, tok i ishod bolesti zabeležena su dva značajna rezultata (Tabela 1.).

Podgrupe ispitanika koje se međusobno razlikuju po odgovoru na terapiju, toku i ishodu bolesti		
1.	mut <i>KRAS</i> (G12A)	Povoljniji odgovor na HRT
2.	mut <i>KRAS</i> + met <i>p14ARF</i>	Češća pojava lokalnih recidiva
3.	mut <i>KRAS</i> + met <i>p16INK4a</i> + met <i>p14ARF</i>	Kraće ukupno preživljavanje
4.	met <i>p16INK4a</i> + visoka eksp. VEGF	Nepovoljniji odgovor na HRT
		Češća pojava lokalnih recidiva Kraće ukupno preživljavanje
5.	mut <i>KRAS</i> + visoka eksp. VEGF	Nepovoljniji odgovor na HRT
		Češća pojava lokalnih recidiva Kraće ukupno preživljavanje
6.	met <i>p14ARF</i> + visoka eksp. VEGF	Nepovoljniji odgovor na HRT
		Češća pojava lokalnih recidiva
7.	met <i>p16INK4a</i> + visoka eksp. EGFR	Povoljniji odgovor na HRT
8.	met <i>p16INK4a</i> + visoka eksp. EGFR + niska eksp. VEGF	Ređa pojava lokalnih recidiva
9.	mut <i>KRAS</i> + visoka eksp. Bcl-2	Nepovoljniji odgovor na HRT
		Nepovoljniji odgovor na HRT
10.	mut <i>KRAS</i> + visoka eksp. Ki-67	Češća pojava lokalnih recidiva

mut - mutacija; met - metilacija; HRT - hemioradioterapija; eksp. - ekspresija.

Tabela 1. Rezultati kombinovane analize metilacije gena *p16INK4a* i *p14ARF*, odnosno mutacije gena *KRAS* i nivoa ekspresije proteina EGFR, VEGF, Bcl-2 i Ki-67

Pre svega, izdvojila se podgrupa ispitanika sa istovremeno prisutnom metilacijom gena *p14ARF* i mutacijom gena *KRAS*, kod kojih su značajno češće detekovani lokalni recidivi i/ili metastaze ($p=0,027$). U prethodnim studijama karcinoma rektuma pokazano je da prisustvo mutacije *KRAS* u ranim stadijumima tumora asocira sa pojavom udaljenih recidiva u kasnijim fazama bolesti [77]. Detekcija mutacije ovog gena kod tumora u lokalno uznapredovalim stadijumima KR jeste česta pojava, ali mutacioni status gena *KRAS* nije dovoljan za predikciju agresivnijeg ponašanja tumora i potrebna je analiza i drugih parametara koji bi ukazivali na potencijalni rizik za razvoj recidiva [78]. Efekat istovremenog prisustva metilacije gena *p14ARF* i mutacije gena *KRAS* može se objasniti dobro poznatom funkcijom proteinskog produkta gena *p14ARF* u supresiji ćelijskog rasta u odgovoru na aktivaciju onkogena [51, 52]. Dobijeni rezultat ukazuje na potencijalno sadejstvo promena u ova dva gena u nastanku agresivnije forme tumora. S jedne strane aktivacija onkogena *KRAS* kao inicijalni događaj dovodi do nekontrolisane deobe tumorskih ćelija i daljeg rasta potencijalno invazivnog tumora. S druge strane, metilacionom inaktivacijom gena *p14ARF* izostaje zaustavljanje ćelijskog ciklusa i indukovanje apoptoze kao tumor-supresornih mehanizama, što omogućava dalju propagaciju tumora i formiranje lokalnih recidiva. Ovakav model onkogeneze adenokarcinoma duktusa pankreasa pokazan je eksperimentalno na miševima, kod kojih mutacija gena *KRAS* u kombinaciji sa inaktivacijom lokusa *INK4a/ARF* dovodi do ranog formiranja premalignih lezija koje brzo propagiraju ka invazivnim i metastatskim oblicima tumora, dok pojedinačno ovi molekularni događaji ne dovode do formiranja agresivnih formi tumora [79]. Pored toga, među ispitanicima obuhvaćenim ovom studijom izdvojila se i podgrupa obolelih sa istovremeno prisutnom metilacijom gena *p16INK4a* i *p14ARF* i mutacijom u genu *KRAS* kod kojih je zabeleženo statistički značajno kraće ukupno preživljavanje u odnosu na ostale podgrupe pacijenata ($p=0,011$). Iako je broj uzoraka sa navedenim promenama u genima *p16INK4a*, *p14ARF* i *KRAS* mali (svega 4), dobijeni rezultat nije zanemarljiv i može imati potencijalni prognostički

značaj kod obolelih od KR, uz dodatno ispitivanje na većem broju uzoraka. U studiji autora Serra i saradnika iz 2014. godine, koja je rađena na ćelijskim linijama KRK, otkriven je molekularni mehanizam, odnosno signalni protein koji posreduje u metilacionoj inaktivaciji lokusa INK4a/ARF u odgovoru na onkogenu aktivaciju gena *KRAS* [80]. U pitanju je protein ZNF304 (eng. *Zinc Finger Protein 304*, ZNF304) koji funkcioniše kao transkripcioni represor, odnosno regrutuje represioni proteinski kompleks, uključujući i enzim DNMT1 koji vrši metilaciju i utišavanje ekspresije kompletnog lokusa INK4a/ARF. Pokazano je da ovaj regulatorni protein transkripcije može da indukuje i metilacionu inaktivaciju ekspresije i drugih tumor-supresornih gena uključenih u kancerogenezu KRK.

KOMBINOVANE ANALIZE METILACIJE GENA *P16INK4A* I *P14ARF*, ODNOSNO MUTACIJE GENA *KRAS* I NIVOA EKSPRESIJE PROTEINA EGFR, VEGF, BCL-2 I KI-67U UZORCIMA TKIVA KR

S obzirom da promene u ispitivanim genima pojedinačno ne utiču značajno na odgovor na HRT, tok i ishod bolesti, u daljem istraživanju smo analizirali da li istovremeno prisustvo metilacije gena *p16INK4a* ili *p14ARF*, mutacije gena *KRAS* i izmenjene ekspresije proteina EGFR, VEGF, Bcl-2 i/ili Ki-67 može doprineti definisanju podgrupa obolelih kod kojih će ispitivani molekularni događaji imati precizniju prediktivnu i prognostičku ulogu. U kombinovanoj analizi metilacije gena *p16INK4a* i *p14ARF*, kao i mutacije gena *KRAS* i različitog nivoa ekspresije odabranih proteina dobijeni su rezultati vredni pažnje koji su sumirani u Tabeli 1.

Rezultati kombinovane analize pokazali su da je istovremeno prisustvo kako metilacije gena *p16INK4a*, tako i gena *p14ARF* i povišene ekspresije proteina VEGF značajno povezano sa agresivnijim ponašanjem tumora, odnosno sa nepovoljnijim odgovorom obolelih na HRT ($p=0,001$, odnosno $p=0,038$) i trendom ka češćoj pojavi lokalnih recidiva i/ili metastaza ($p=0,072$, odnosno $p=0,075$). Vaskularni endotelni faktor rasta (VEGF) ima glavnu ulogu u procesu nastanka i razvoja krvnih sudova, kao i u regulaciji permeabilnosti vaskularnih endotelnih ćelija [81]. Proces neovaskularizacije, praćen je povećanom ekspresijom VEGF i ključan je za dalji rast i širenje tumorskih ćelija [82]. Prema podacima iz literature, kod KRK ekspresija proteina VEGF obično je asocirana sa agresivnijim ponašanjem tumora i lošom prognozom bolesti [83, 84]. Dobijeni rezultati posebno naglašavaju važnu ulogu proteina VEGF u nastanku tumora, kao i ulogu gena *p16INK4a* i *p14ARF* u supresiji tumorskog rasta. Poznato je da su produkti ova dva gena supresori procesa angiogeneze, odnosno suprimiraju ekspresiju gena *VEGF* putem inhibicije glavnog regulatornog proteina njegove ekspresije, HIF-1 α (eng. *Hypoxia-Inducible Factor-1 α* , HIF-1 α) [85]. Iako u našoj studiji nije utvrđena direktna povezanost ekspresije proteina VEGF sa metilacionim statusom gena *p16INK4a* i *p14ARF*, dobijeni rezultati sugerišu da istovremeno povišena ekspresija ovog faktora i inaktivacija gena *p16INK4a* ili *p14ARF* može indukovati hemiorezistenciju tumorskih ćelija na primenjenu HRT. Poznato je da se stvaranjem novih krvnih sudova usled povišene ekspresije VEGF povećava i njihova permeabilnost, što za posledicu ima smanjenu efikasnost usvajanja hemioterapeutika od strane tumorskog tkiva [86]. Pored toga, uočeni trendovi ka češćoj pojavi lokalnih recidiva i/ili metastaza ukazuju da se tumori sa ovakvim molekularnim promenama brže razvijaju i imaju veći invazivni potencijal. Osim toga, uočeno je i značajno kraće ukupno preživljavanje obolelih u našoj studiji kod kojih je istovremeno prisutna metilacija gena *p16INK4a* i visoka ekspresija proteina VEGF ($p=0,010$). Kombinovan uticaj ova dva molekularna događaja na ukupno preživljavanje ispitanika obuhvaćenih našom studijom može se objasniti time da inaktivacija gena *p16INK4a* dovodi do nekontrolisane proliferacije tumorskih ćelija i brže progresije ka invazivnijim stadijumima bolesti. Sa druge strane, povišena ekspresija proteina VEGF, koja je inače nezavisan parameter kraćeg ukupnog preživljavanja u našoj studiji, indirektno utiče na krajnji ishod bolesti tako što promovise stvaranje novih krvnih sudova i dalju invaziju tumorskih ćelija u okolno tkivo. Takođe, ispitanici kod kojih je detektovana mutacija gena *KRAS* i istovremeno visok nivo ekspresije proteina VEGF ispoljavaju značajno nepovoljniji odgovor na primenjenu HRT ($p<0,001$), dolazi do češće pojave lokalnih recidiva i/ili metastaza ($p=0,003$), a zabeleženo je i kraće ukupno preživljavanje ($p=0,001$). Prethodno je uočeno da onkogeno aktivacija gena *KRAS* u tumorskim ćelijama dovodi značajnog povećanja ekspresije proteina VEGF [87, 88] iako u našoj studiji nije zabeležena značajna asocijacija između mutacionog statusa gena *KRAS* i nivoa ekspresije proteina VEGF. U svakom slučaju, dobijeni rezultat sugeriše na mogućnost da istovremeno prisustvo oba navedena molekularna događaja doprinosi agresivnijem ponašanju tumorskih ćelija, usled pojačanog inteziteta proliferacije kao posledice mutacije u genu *KRAS* sa jedne strane i pokretanja procesa neovaskularizacije kao rezultat povišene ekspresije faktora VEGF sa druge strane.

Kombinovanim analizama u našoj studiji uočena je i grupa ispitanika kod kojih je istovremeno prisutna metilacija gena *p16INK4a* i visoka ekspresija proteina EGFR povezana sa ređom pojavom lokalnih recidiva i udaljenih metastaza ($p=0,038$). Pored toga, identifikovali smo grupu obolelih kod kojih je simultano prisustvo metilacije gena *p16INK4a*, niske ekspresije proteina VEGF i visoke ekspresije proteina EGFR povezano sa povoljnijim odgovorom na terapiju ($p=0,024$). Dobijeni rezultati nisu još uvek razjašnjeni i zahtevaju detaljnije analize. Receptor za epidermalni faktor rasta (EGFR) pripada ErbB familiji tirozin-kinaznih receptora i ključan je u regulaciji osnovnih ćelijskih procesa kao što su proliferacija, preživljavanje, diferencijacija i migracija [89]. U nekoliko studija pokazano je da bazalni nivo ekspresije

proteina EGFR asocira sa lošom prognozom, slabijim odgovorom tumorskog tkiva na terapiju, kao i češćom pojavom recidiva [90-92], što nije slučaj u našoj studiji. Pored toga, u radu autora Zlobec i saradnika iz 2008. godine, pokazano je da je verovatnoća za postizanje kompletnog patološkog odgovora na HRT šest puta veća kod karcinoma rektuma sa pozitivnom ekspresijom proteina EGFR [93]. Takođe je identifikovana grupa ispitanika kod kojih tumori sa pozitivnom ekspresijom proteina VEGF i negativnom ekspresijom proteina EGFR ispoljavaju hemiorezistentnost na terapiju. U studiji koja je obuhvatala obolele od mišićno-invazivnog tumora bešike, ekspresija proteina EGFR isto se pokazala kao povoljan prognostički faktor, odnosno povećan nivo ekspresija ovog proteina bio je značajno povezan sa dužim ukupnim preživljavanjem i ređom pojavom udaljenih metastaza [94]. Rezultati ovih studija sugerišu da povećana ekspresija proteina EGFR utiče na bolju senzitivnost tumorskih ćelija na hemioradioterapiju, što se odražava i na bolji odgovor na HRT. Visok nivo ekspresije proteina EGFR generalno nije povoljan događaj jer dovodi do ubrzane proliferacije tumorskih ćelija. Iako naši rezultati sugerišu da nivo ekspresije ova dva proteina u kombinaciji sa metilacionim statusom gena *p16INK4a* mogu poslužiti u predikciji podgrupe obolelih sa manje agresivnom formom karcinoma rektuma, potrebna su dalja ispitivanja za potvrdu zapaženih asocijacija.

Nepovoljan odgovor na primenjenu HRT u našoj studiji zabeležen je i kod obolelih sa istovremeno prisutnom mutacijom gena *KRAS* i visokom ekspresijom proteina Bcl-2 ($p=0,022$). Bcl-2 pripada familiji proteina koji imaju važnu ulogu u regulaciji programirane ćelijske smrti, apoptoze [95]. Svoju anti-apoptotsku funkciju ostvaruje na spoljašnjoj membrani mitohondrija, sprečavajući oslobađanje proapoptotičkih faktora koji aktiviraju kaspaze i tako indirektno štiti ćeliju od prerane smrti [96]. Pokazano je da povećana ekspresija ovog proteina predstavlja mehanizam kojim se ćelija štiti od radioterapijom-indukovane apoptoze [22], sa posledičnom pojavom radiorezistencije kod tretiranih ćelija [97-99]. Međutim, nema mnogo podataka kojima se objašnjava uticaj simultanog dejstva onkogene aktivacije gena *KRAS* i povišene ekspresije proteina Bcl-2 na odgovor na HRT. Iako u našoj studiji nije uočena direktna veza između mutacionog statusa gena *KRAS* i ekspresije proteina Bcl-2, poznato je da su tumorske ćelije sa mutacijom ovog proto-onkogene otpornije na apoptozu [100]. U cilju boljeg razumevanja našeg rezultata, neophodno je ispitati i druge molekularne regulatore procesa apoptoze, pre svega mutacioni status gena *p53*, za koji je pokazano da ima dominantniju ulogu u patogenezi karcinoma rektuma kao posebnom entitetu, nego kod karcinoma kolona [101].

U daljim kombinovanim analizama, izdvojile su se još dve podgrupe ispitanika kod kojih istovremeno prisustvo mutacije gena *KRAS* i povišene ekspresije proteina Ki-67 asocira sa nepovoljnim odgovorom na HRT ($p=0,051$), odnosno sa češćom pojavom lokalnih recidiva i/ili metastaza ($p=0,079$). Ekspresija ovog proteina se inače koristi kao pouzdan marker proliferacije ćelija i ima potencijalnu prognostičku ulogu u određenim malignitetima, uključujući i KRK [102, 103]. U radu autora Whoo i saradnika iz 2009. godine, uočen je povećan rizik za nastanak recidiva kod obolelih od adenokarcinoma pluća kod kojih su takođe istovremeno detektovane mutacije gena *KRAS* i povišena ekspresija proteina Ki-67 [103]. Pošto u većini studija koje su se bavile ispitivanjem prediktivne uloge proteina Ki-67 kod obolelih od KR nije utvrđen uticaj izmenjene ekspresije ovog faktora na odgovor na primenjenu HRT [17], dobijeni rezultat, svakako treba dodatno proveriti, pogotovo što su uočene asocijacije statistički trendovi.

ZAKLJUČAK

Razultati naše studije su pokazali su da ispitivane promene u genima *p16INK4a*, *p14ARF* i *KRAS* pojedinačno gledano, nisu značajni prediktivni i prognostički faktori kod obolelih od KR u lokalno uznapredovalom stadijumu. Međutim, kada sumiramo kombinovane analize metilacionih, odnosno mutacionog statusa ispitivanih gena i nivoa ekspresije odabranih proteina (EGFR, VEGF, Bcl-2, Ki-67), izdvojilo se 10 podgrupa ispitanika sa potencijalnim kliničkim značajem u stratifikaciji obolelih od KR, koje se međusobno razlikuju kako prema odgovoru na HRT, tako i prema toku i ishodu bolesti (Tabela 1.). Dobijeni rezultati su vredni pažnje i ukazuju na potrebu za daljim prospektivnim studijama sa dužim periodom praćenja obolelih, gde su pored ispitivanja promena u genima *p16INK4a*, *p14ARF* i *KRAS*, uključeni i dodatni geni čiji produkti regulišu ćelijske procese kao što su proliferacija, angiogenza i apoptoza.

Kao što je prethodno naglašeno, karcinome kolona i karcinome rektuma možemo posmatrati kao dva odvojena entiteta [8, 9], koje odlikuje različit profil molekularnih promena [101]. Iako za sada ne postoje molekularni prediktori odgovora KR na primenjenu HRT, definisanje potencijalnih metilacionih markera bi moglo da predvidi odgovor na HRT, što bi doprinelo daljoj individualizaciji tretmana [35]. Međutim, klinička primena metilacionih markera zahteva pre svega usaglašenost u metodama za utvrđivanje metilacionog statusa gena, kao i precizno definisanje uloge metilacije pojedinih gena u predikciji odgovora na terapiju. Pored toga, u cilju bolje stratifikacije obolelih u pogledu predikcije odgovora i prognoze bolesti, metilacione analize treba dopuniti i analizama onih molekularnih parametara za koje je već ustanovljeno da imaju prediktivnu ulogu u KRK, kao što je mutacioni status gena *KRAS*. Standardizacija primene postojećih biomarkera u kombinaciji sa ispitivanjem novih potencijalnih genetičkih ili epigenetičkih molekularnih parametara pristup je koji vodi ka primeni personalizovane terapije KR u budućnosti.

LITERATURA

1. Rawla P, Sunkara T, Barsouk A. Epidemiology of colorectal cancer: incidence, mortality, survival, and risk factors. *Gastroenterology Rev* 2019;14: 89-103.
2. Sadanandam A, Lyssiotis CA, Homicsko K, Collisson EA, Gibb WJ, Wullschlegler S et al. A colorectal cancer classification system that associates cellular phenotype and responses to therapy. *Nat Med* 2013;19: 619-625.
3. Zhang B, Wang J, Wang X, Zhu J, Liu Q, Shi Z et al. Proteogenomic characterization of human colon and rectal cancer. *Nature* 2014;513: 382-387.
4. Guinney J, Dienstmann R, Wang X, de Reynies A, Schlicker A, Soneson C et al. The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. *Nat Med* 2015;21: 1350-1356.
5. Colussi D, Brandi G, Bazzoli F, Ricciardiello L. Molecular pathways involved in colorectal cancer: implications for disease behavior and prevention. *Int J Mol Sci* 2013;14: 16365-16385.
6. Kekelidze M, D'Errico L, Pansini M, Tyndall A, Hohmann J. Colorectal cancer: current imaging methods and future perspectives for the diagnosis, staging and therapeutic response evaluation. *World J Gastroenterol* 2013;19: 8502-8514.
7. Siegel R, Desantis C, Jemal A. Colorectal cancer statistics. *Cancer J Clin* 2014;64: 104- 117.
8. Carethers JM. One colon lumen but two organs. *Gastroenterology* 2011;141: 411-412.
9. Schmoll HJ, Van Cutsem E, Stein A, Valentini V, Glimelius B, Haustermans K et al. ESMO Consensus Guidelines for management of patients with colon and rectal cancer. A personalized approach to clinical decision making. *Ann Oncol* 2012;23: 2479-2516.
10. Sauer R, Becker H, Hohenberger W, Rödel C, Wittekind C, Fietkau R et al. Preoperative versus postoperative chemoradiotherapy for rectal cancer. *N Engl J Med* 2004;351: 1731-1740.
11. Bosset JF, Collette L, Calais G, Mineur L, Maingon P, Radošević-Jelić Lj et al. Chemotherapy with preoperative radiotherapy in rectal cancer. *N Engl J Med* 2006;355: 1114-1123.
12. Martin ST, Heneghan HM, Winter DC. Systematic review and meta-analysis of outcomes following pathological complete response to neoadjuvant chemoradiotherapy for rectal cancer. *Br J Surg* 2012;99: 918-928.
13. Stipa F, Chessin DB, Shia J, Paty PB, Weiser M, Temple LK et al. A pathologic complete response of rectal cancer to preoperative combined-modality therapy results in improved oncological outcome compared with those who achieve no downstaging on the basis of preoperative endorectal ultrasonography. *Ann Surg Oncol* 2006;13: 1047-1053.
14. De Campos-Lobato LF, Stocchi L, da Luz Moreira A, Kalady MF, Geisler D, Dietz D et al. Downstaging without complete pathologic response after neoadjuvant treatment improves cancer outcomes for cII but not cII rectal cancers. *Ann Surg Oncol* 2010;17: 1758-1766.
15. Beddy D, Hyland JM, Winter DC, Lim C, White A, Moriarty M et al. A simplified tumor regression grade correlates with survival in locally advanced rectal carcinoma treated with neoadjuvant chemoradiotherapy. *Ann Surg Oncol* 2008;15: 3471-3477.
16. Topova L, Hellmich G, Puffer E, Schubert C, Christen N, Boldt T et al. Prognostic value of tumor response to neoadjuvant therapy in rectal carcinoma. *Dis Colon Rectum* 2011;54: 401-411.
17. Spolverato G, Pucciarelli S, Bertorelle R, De Rossi A, Nitti D. Predictive factors of the response of rectal cancer to neoadjuvant radiochemotherapy. *Cancers (Basel)* 2011;3: 2176-2194.
18. Karagkounis G, Kalady MF. Molecular biology: are we getting any closer to providing clinically useful information? *Clin Colon Rectal Surg* 2017;30: 415-422.
19. Kokelaar RF, Evans MD, Davies M, Harris DA, Beynon J. Locally advanced rectal cancer: management challenges. *Onco Targets Ther* 2016;9: 6265-6272.
20. Zeestraten EC, Kuppen PJ, van de Velde CJ, Marijnen CA. Prediction in rectal cancer. *Semin Radiat Oncol* 2012;22: 175-183.
21. Milgrom SA, García-Aguilar J. Molecular biomarkers as predictors of response to neoadjuvant chemoradiation therapy in rectal cancer. *Semin Colon Rectal Surg* 2013; 119-124.
22. García-Flórez LJ, Gómez-Álvarez G, Frunza AM, Barneo-Serra L, Martínez-Alonso C, Fresno-Forcelledo MF. Predictive markers of response to neoadjuvant therapy in rectal cancer. *J Surg Res* 2015;194 (1): 120-126.
23. Esteller M, Herman JG. Cancer as an epigenetic disease: DNA methylation and chromatin alterations in human tumors. *J Pathol* 2002;196: 1-7.
24. Dienstmann R, Vermeulen L, Guinney J, Kopetz S, Tejpar S, Tabernero J. Consensus molecular subtypes and the evolution of precision medicine in colorectal cancer. *Nat Rev Cancer* 2017;17: 79-92.
25. Bird AP. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev* 2002;16: 6-21.
26. Rocco J, Sidransky D. p16(MTS-1/CDKN2/INK4a) in cancer progression. *Exp Cell Res* 2001;264: 42-55.
27. Serrano M. The tumor suppressor protein p16INK4a. *Exp Cell Res* 1997;237: 7-13.
28. Pomerantz J, Schreiber-Agus N, Liégeois NJ, Silverman A, Alland L, Chin L et al. The Ink4a tumor suppressor gene product, p19Arf, interacts with MDM2 and neutralizes MDM2's inhibition of p53. *Cell* 1998;92: 713-723.
29. Trzeciak L, Hennig E, Kolodziejwski J, Nowacki M, Ostrowski J. Mutations, methylation and expression of CDKN2a/p16 gene in colorectal cancer and normal colonic mucosa. *Cancer Lett* 2001;163: 17-23.
30. Chan AO, Broaddus RR, Houlihan PS, Issa JP, Hamilton SR, Rashid A. CpG island methylation in aberrant crypt foci of the colorectum. *Am J Pathol* 2002;160: 1823-1830.
31. Shen L, Kondo Y, Hamilton SR, Rashid A, Issa JP. P14 methylation in human colon cancer is associated with microsatellite instability and wild-type p53. *Gastroenterology* 2003;124: 626-633.
32. Samowitz WS, Albertsen H, Herrick J, Levin TR, Sweeney C, Murtaugh MA et al. Evaluation of a large, population-based sample supports a CpG island methylator phenotype in colon cancer. *Gastroenterology* 2005;129: 837-845.
33. Xing X, Cai W, Shi H, Wang Y, Li M, Jiao J et al. The prognostic value of CDKN2A hypermethylation in colorectal cancer: a meta-analysis. *Br J Cancer* 2013;108: 2542-2548.
34. Chaar I, Amara S, Elamine OE, Khiari M, Ounissi D, Khalfallah T et al. Biological significance of promoter hypermethylation of p14/ARF gene: relationships to p53 mutational status in Tunisian population with colorectal carcinoma. *Tumour Biol* 2014;35: 1439-1449.
35. Williamson JS, Harris DA, Beynon J, Jenkins GJ. Review of the development of DNA methylation as a marker of response to neoadjuvant therapy and outcomes in rectal cancer. *Clin Epigenetics* 2015;7: 70.
36. Velho S, Moutinho C, Cirnes L, Albuquerque C, Hamelin R, Schmitt F et al. BRAF, KRAS and PIK3CA mutations in colorectal serrated polyps and cancer: primary or secondary genetic events in colorectal carcinogenesis?. *BMC Cancer*. 2008;8: 255.

37. Andreyev HJ, Norman AR, Cunningham D, Oates JR, Clarke PA. Kirsten ras mutations in patients with colorectal cancer: the multicenter "RASCAL" study. *J Natl Cancer Inst* 1998; 90: 675-684.
38. Karapetis CS, Khambata-Ford S, Jonker DJ, O'Callaghan CJ, Tu D, Tebbutt NC et al. K-ras mutations and benefit from cetuximab in advanced colorectal cancer. *N Engl J Med* 2008; 359: 1757-1765.
39. Bokemeyer C, Bondarenko I, Hartmann JT, de Braud F, Schuch G, Zobel A et al. Efficacy according to biomarker status of cetuximab plus FOLFOX-4 as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: the OPUS study. *Ann Oncol* 2011;22: 1535-1546.
40. Luna-Pérez P, Segura J, Alvarado I, Labastida S, Santiago-Payán H, Quintero A. Specific c-K-ras gene mutations as a tumor-response marker in locally advanced rectal cancer treated with preoperative chemoradiotherapy. *Ann Surg Oncol* 2000;7: 727-731.
41. Gaedcke J, Grade M, Jung K, Schirmer M, Jo P, Obermeyer C et al. KRAS and BRAF mutations in patients with rectal cancer treated with preoperative chemoradiotherapy. *Radiother Oncol* 2010;94: 76-81.
42. Davies JM, Trembath D, Deal AM, Funkhouser WK, Calvo BF, Finnegan T et al. Phospho-ERK and AKT status, but not KRAS mutation status, are associated with outcomes in rectal cancer treated with chemoradiotherapy. *Radiat Oncol* 2011;6: 114.
43. Garcia-Aguilar J, Chen Z, Smith DD, Li W, Madoff RD, Cataldo P et al. Identification of a biomarker profile associated with resistance to neoadjuvant chemoradiation therapy in rectal cancer. *Ann Surg* 2011;254: 486-492.
44. Duldulao MP, Lee W, Nelson RA, Li W, Chen Z, Kim J et al. Mutations in specific codons of the KRAS oncogene are associated with variable resistance to neoadjuvant chemoradiation therapy in patients with rectal adenocarcinoma. *Ann Surg Oncol* 2013;20: 2166-2171.
45. Braicu C, Buse M, Busuioc C, Drula R, Gulei D, Raduly L et al. A comprehensive review on MAPK: a promising therapeutic target in cancer. *Cancers (Basel)*. 2019;11: 1618.
46. Knudsen ES, Wang JY. Targeting the RB-pathway in cancer therapy. *Clin Cancer Res* 2010;16: 1094-1099.
47. Wasylshen AR, Lozano G. Attenuating the p53 pathway in human cancers: many means to the same end. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2016;6: a026211.
48. Kobayashi T, Wang J, Al-Ahmadie H, Abate-Shen C. ARF Regulates the Stability of p16 Protein Via REGy-Dependent Proteasome Degradation. *Mol. Cancer Res. highwire*; 2013;11: 828-833.
49. Serra R, Fang M, Park S, Hutchinson L, Green M. A KRAS-directed transcriptional silencing pathway that mediates the CpG island methylator phenotype. *Elife* 2014;3: e02313.
50. Bennecke M, Kriegl L, Bajbouj M, Retzlaff K, Robine S, Jung A et al. Ink4a/Arf and oncogene-induced senescence prevent tumor progression during alternative colorectal tumorigenesis. *Cancer Cell* 2010;18: 135-146.
51. Palmero I, Pantoja C, Serrano M. P19arf links the tumour suppressor p53 to Ras. *Nature* 1998;395: 125-126.
52. Berkovich E, Lamed Y, Ginsberg D. E2F and Ras synergize in transcriptionally activating p14arf expression. *Cell Cycle* 2003;2: 127-133.
53. Kožik B. Metilacioni status p16INK4a i p14ARF tumor-supresor gena i prisustvo mutacija KRAS onkogene u korelaciji sa odgovorom na preoperativnu hemioradioterapiju u lokalno uznapredovalom karcinomu rektuma čoveka. Doktorska disertacija, Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu, 2020.
54. Kožik B, Kokanov N, Knežević-Ušaj S, Nikolić I, Davidović R, Jovanović-Čupić S et al. Methylation status of p16 and p14 genes in locally advanced rectal cancer: potential clinical implication. *Arch Biol Sci* 2018;70 (4): 681-90.
55. Veganzones-de-Castro S, Rafael-Fernández S, Vidaurreta-Lázaro M, Orden V, Mediero-Valeros B, Fernández C, Maestro-de las Casas ML. p16 gene methylation in colorectal cancer patients with long-term follow-up. *Revista Española De Enfermedades Dig* 2012;104: 111-117.
56. Esteller M, Tortola S, Toyota M, Capella G, Peinado MA, Baylin SB et al. Hypermethylation-associated inactivation of p14(ARF) is independent of p16(INK4a) methylation and p53 mutational status. *Cancer Res* 2000;60: 129-133.
57. Hibi K, Nakayama H, Koike M, Kasai Y, Ito K, Akiyama S et al. Colorectal cancers with both p16 and p14 methylation show invasive characteristics. *Jpn J Cancer Res* 2002;93: 883-887.
58. Lee M, Sup Han W, Kyoung Kim O, Hee Sung S, Sun Cho M, Lee SN et al. Prognostic value of p16INK4a and p14ARF gene hypermethylation in human colon cancer. *Pathol Res Pract* 2006;202: 415-424.
59. Kang MY, Lee BB, Ji YI, Jung EH, Chun HK, Song SY et al. Association of interindividual differences in p14ARF promoter methylation with single nucleotide polymorphism in primary colorectal cancer. *Cancer* 2008;112: 1699-1707.
60. Jiang W, Wang PG, Zhan Y, Zhang D. Prognostic value of p16 promoter hypermethylation in colorectal cancer: a meta-analysis. *Cancer Invest* 2014;32: 43-52.
61. Kim JC, Choi JS, Roh SA, Cho DH, Kim TW, Kim YS. Promoter methylation of specific genes is associated with the phenotype and progression of colorectal adenocarcinomas. *Ann Surg Oncol* 2010;17: 1767-1776.
62. Nilsson TK, Lof-Ohlin Z, Sun XF. DNA methylation of the p14ARF, RASSF1A and APC1A genes as an independent prognostic factor in colorectal cancer patients. *Int J Oncol*. 2013;42: 127-133.
63. Chaar I, Amara S, Elamine OE, Khiari M, Ounissi D, Khalfallah T et al. Biological significance of promoter hypermethylation of p14/ARF gene: relationships to p53 mutational status in Tunisian population with colorectal carcinoma. *Tumour Biol* 2014;35: 1439-1449.
64. Krajnović M, Marković B, Knežević-Ušaj S, Nikolić I, Stanojević M, Nikolić V et al. Locally advanced rectal cancers with simultaneous occurrence of KRAS mutation and high VEGF expression show invasive characteristics. *Pathology Research and Practice* 2016;212 (7): 598-603.
65. Bengala C, Bettelli S, Bertolini F, Sartori G, Fontana A, Malavasi N et al. Prognostic role of EGFR gene copy number and KRAS mutation in patients with locally advanced rectal cancer treated with preoperative chemoradiotherapy. *Br J Cancer* 2010;103: 1019-1024.
66. Urošević N, Krtolica K, Škaro-Milić A, Knežević-Ušaj S, Dujčić A. Prevalence of G-to-T transversions among K-ras oncogene mutations in human colorectal tumors in Yugoslavia. *Int J Cancer* 1993;54: 249-254.
67. Krtolica K, Krajnović M, Ušaj-Knežević S, Babić D, Jovanović D, Dimitrijević B. Comethylation of p16 and MGMT genes in colorectal carcinoma: correlation with clinicopathological features and prognostic value. *World J Gastroenterol* 2007;13: 1187-1194.
68. Luna-Pérez P, Segura J, Alvarado I, Labastida S, Santiago-Payán H, Quintero A. Specific c-K-ras gene mutations as a tumor-response marker in locally advanced rectal cancer treated with preoperative chemoradiotherapy. *Ann Surg Oncol* 2000;7: 727-731.
69. Garassino MC, Marabese M, Rusconi P, Rulli E, Martelli O, Farina G et al. Different types of K-Ras mutations could affect drug sensitivity and tumour behaviour in non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol* 2011;22: 235-237.
70. Andreyev HJ, Norman AR, Cunningham D, Oates JR, Clarke PA. Kirsten ras mutations in patients with colorectal cancer: the multicenter "RASCAL" study. *J Natl Cancer Inst* 1998;90: 675-684.
71. Doll R, Peto R. The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risk of cancer in the United States today. *Natl Canc Inst* 1981;66: 1191-1308.
72. Boyle P. Some recent developments in the epidemiology of colorectal cancer. In: Bleiberg H, Rougier PH, Wilke HJ, eds. Management of

- colorectal cancer. Martin Dunitz Ltd, London; 1998. p. 19-54
73. Burri N, Shaw P, Bouzourene H, Sordat I, Sordat B, Gillet M et al. Methylation silencing and mutations of the p14ARF and p16INK4 genes in colon cancer. *Lab Invest* 2001;81: 217-229.
 74. Dominguez G, Silva J, Garcia JM, Silva JM, Rodriguez R, Munoz C et al. Prevalence of aberrant methylation of p14ARF over p16INK4a in some human primary tumors. *Mut Res* 2003;530: 9-17.
 75. Lind GE, Thorstensen L, Lovig T, Meling GI, Hamelin R, Rognum TO et al. A CpG island hypermethylation profile of primary colorectal carcinomas and colon cancer cell lines. *Mol Cancer* 2004;3: 28.
 76. Kaneda A, Yagi K. Two groups of DNA methylation markers to classify colorectal cancer into three epigenotypes. *Cancer Sci* 2011;102: 18-24.
 77. Sideris M, Moorhead J, Diaz-Cano S, Bjarnason I, Haji A, Papagrigroriadis S. Kras mutant status, p16 and beta-catenin expression may predict local recurrence in patients who underwent transanal endoscopic microsurgery (tems) for stage I rectal cancer. *Anticancer Res* 2016;36: 5315-5324
 78. Sideris M, Moorhead J, Diaz-Cano S, Haji A, Papagrigroriadis S. KRAS mutant status may be associated with distant recurrence in early-stage rectal cancer. *Anticancer Res* 2017;37: 1349-1357
 79. Aguirre A, Bardeesy N, Sinha M, Lopez L, Tuveson D, Horner J et al. Activated Kras and Ink4a/Arf deficiency cooperate to produce metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma. *Gene Dev* 2003;17: 3112-3126.
 80. Serra R, Fang M, Park S, Hutchinson L, Green M. A KRAS-directed transcriptional silencing pathway that mediates the CpG island methylator phenotype. *Elife* 2014;3: e02313.
 81. Breen EC. VEGF in biological control. *J Cell Biochem* 2007;102: 1358-67.
 82. Theodoropoulos GE, Lazaris AC, Theodoropoulos VE, Papatheodosiou K, Gazouli M, Bramis J et al. Hypoxia, angiogenesis and apoptosis markers in locally advanced rectal cancer. *Int J Colorectal Dis* 2006;21: 248-257.
 83. Giatromanolaki A, Sivridis E, Koukourakis MI. Angiogenesis in colorectal cancer: prognostic and therapeutic implications. *Am J Clin Oncol* 2006;29: 408-417.
 84. Giral J, Navalpotro B, Hermsilla E, de Torres I, Espin E, Reyes V et al. Prognostic significance of vascular endothelial growth factor and cyclooxygenase-2 in patients with rectal cancer treated with preoperative radiotherapy. *Oncology* 2007;71: 312-319.
 85. Lu Y, Zhang X, Zhang J. Inhibition of breast tumor cell growth by ectopic expression of p16/INK4A via combined effects of cell cycle arrest, senescence and apoptotic induction, and angiogenesis inhibition. *J Cancer* 2012;3: 333-344.
 86. Azria D, Bibeau F, Barbier N, Zouhair A, Lemanski C, Rouanet P et al. Prognostic impact of epidermal growth factor receptor (EGFR) expression on loco-regional recurrence after preoperative radiotherapy in rectal cancer. *BMC Cancer* 2005;5: 62-71.
 87. Rak J, Mitsuhashi Y, Bayko L, Filmus J, Shirasawa S, Sasazuki T et al., Mutant ras oncogenes upregulate VEGF/VPF expression: implications for induction and inhibition of tumor angiogenesis., *Cancer Res* 1995;55: 4575-4580.
 88. Figueras A, Arbos MA, Quiles MT, Viñals F, Germà JR, Capellà G. The impact of KRAS mutations on VEGF-A production and tumour vascular network. *BMC Cancer* 2013;13: 125.
 89. Schlessinger J. Receptor tyrosine kinases: legacy of the first two decades. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2014;6: a008912.
 90. Giral J, de las Heras M, Cerezo L, Eraso A, Hermsilla E, Velez D et al. The expression of epidermal growth factor receptor results in a worse prognosis for patients with rectal cancer treated with preoperative radiotherapy: A multicenter, retrospective analysis. *Radiother Oncol* 2005;74: 101-108.
 91. Kim JS, Kim JM, Li S, Yoon WH, Song KS, Kim KH et al. Epidermal growth factor receptor as a predictor of tumor downstaging in locally advanced rectal cancer patients treated with preoperative chemoradiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2006;66: 195-200.
 92. Li S, Kim JS, Kim JM, Cho MJ, Yoon WH, Song KS et al. Epidermal growth factor receptor as a prognostic factor in locally advanced rectal-cancer patients treated with preoperative chemoradiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2006;65: 705-712.
 93. Zlobec I, Vuong T, Compton CC, Lugli A, Michel R P, Hayashi S, Jass JR. Combined analysis of VEGF and EGFR predicts complete tumour response in rectal cancer treated with preoperative radiotherapy. *Br J Cancer* 2008;98: 450-456.
 94. Chakravarti A, Winter K, Wu CL, Kaufman D, Hammond E, Parliament M et al. Expression of the epidermal growth factor receptor and Her-2 are predictors of favorable outcome and reduced complete response rates, respectively, in patients with muscle-invasive bladder cancers treated by concurrent radiation and cisplatin-based chemotherapy: a report from the radiation therapy oncology group. *Int J Radiation Oncology Biol Phys* 2005;62: 309-317.
 95. Czabotar PE, Lessene G, Strasser A, Adams JM. Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2014;15: 49-63.
 96. Yang J, Liu X, Bhalla K, Kim CN, Ibrado AM, Cai J et al. Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science* 1997;275: 1129-1132.
 97. Kariya S, Ogawa Y, Yoshida S, Yabuki M, Imajo Y, Utsumi K. X-irradiation enhances the expression of Bcl-2 in HL-60 cells: the resulting effects on apoptosis and radiosensitivity. *Int J Mol Med* 1999;3: 145-152.
 98. Lee JU, Hosotani R, Wada M, Doi R, Kosiba T, Fujimoto K et al. Role of Bcl-2 family proteins (Bax, Bcl-2 and Bcl-X) on cellular susceptibility to radiation in pancreatic cancer cells. *Eur J Cancer* 1999;35: 1374-1380.
 99. Condon LT, Ashman JN, Ell SR, Stafford ND, Greenman J, Cawkwell L. Overexpression of Bcl-2 in squamous cell carcinoma of the larynx: a marker of radioresistance. *Int J Cancer* 2002;100: 472-475.
 100. Hata AN, Yeo A, Faber AC, Lifshits E, Chen Z, Cheng KA et al. Failure to induce apoptosis via BCL-2 family proteins underlies lack of efficacy of combined MEK and PI3K inhibitors for KRAS-mutant lung cancers. *Cancer Res* 2014;74: 3146-3156.
 101. Kapiteijn E, Liefers GJ, Los LC, Kranenbarg EK, Hermans J, Tollenaar RA et al. Mechanisms of oncogenesis in colon versus rectal cancer. *J Pathol* 2001;195: 171-178.
 102. Haga Y, Hiroshima K, Iyoda A, Shibuya K, Fumihiko Shimamura F, Iizasa T et al. Ki-67 expression and prognosis for smokers with resected stage I non-small cell lung cancer. *Ann Thorac Surg* 2003;75: 1727-1732.
 103. Woo T, Okudela K, Yazawa T, Wada N, Ogawa N, Ishiwa N et al. Prognostic value of KRAS mutations and Ki-67 expression in stage I lung adenocarcinomas. *Lung Cancer* 2009;65: 355-362.

IMPRESUM

Trendovi u molekularnoj biologiji, 2021.

Izdavač

**Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo,
Univerzitet u Beogradu**

Uređivački odbor

Dr **Sonja Pavlović**, naučni savetnik,
Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo
Univerzitet u Beogradu

Dr **Jelena Begović**, naučni savetnik,
Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo
Univerzitet u Beogradu

Prof. dr **Ivana Novaković**, redovni profesor,
Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

Prof. dr **Dužanka Savić Pavićević**, redovni profesor,
Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu

Dr **Ana Đorđević**, naučni savetnik,
Univerzitet u Beogradu Institut za biološka istraživanja
„Siniša Stanković“

Recenzenti

Dr **Svetlana Radović**, redovni profesor,
Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu

Dr **Vesna Škodrić Trifunović**, redovni profesor,
Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

Dr **Gordana Nikčević**, naučni savetnik,
Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo
Univerzitet u Beogradu

Dizajn i izrada korica

Ivan Strahinić

Štampa

Curent Print, Beograd

Periodičnost izlaza publikacije

Godišnje

Tiraž

200 primeraka

Autori

Anđelković Marina	71
Arsić Aleksandra.....	152
Bosnić Dragana	180
Djusalov Mila	21
Đorić Ilona	133
Gadjanski Ivana	21
Gašić Vladimir	113
Išić Denčić Tijana	96
Janjušević Ljiljana	21
Janković Miljuš Jelena	133
Janković Radmila	96
Jovčić Branko	166
Keckarević Dušan	54
Keckarević Marković Milica	54
Kecmanović Miljana	54
Knežić Teodora	21
Kojadinović Milica	152
Kokanov Nikola	123
Komazec Jovana	84
Kosijer Petar	21
Kotur Nikola	6
Kožik Bojana	123
Krajnović Milena	123
Malešević Milka	166
Nikolić Dragana	180
Panić Marko	33
Perić Stojan	60
Pešović Jovan	60
Popović D. Željko	21
Radenković Lana	60
Rakićević Ljiljana	146
Rakočević-Stojanović Vidosava	60
Ristić Nina	96
Samardžić Jelena	180
Savić-Pavićević Dužanka	60
Šelemetjev Sonja	133
Skakić Anita	42
Spasovski Vesna	107
Stanković Biljana	6
Stojiljković Maja	42
Tošić Nataša	113
Ugrin Milena	84
Vreća Miša	107
Zukić Branka	6

CIP - Каталогизacija y publikaciji
Народна библиотека Србије, Београд

577.2

TRENDOVI u molekularnoj biologiji = Trends in
Molecular Biology. - 2021, br. 1 (sep.)- . - Beograd :
Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo,
2021- (Beograd : Curent Print). - 28 cm

Godišnje. - Tekst na srp. i engl. jeziku.
ISSN 2787-2947 = Trendovi u molekularnoj biologiji
COBISS.SR-ID 45105929