





UNIVERZITET U NIŠU  
MEDICINSKI FAKULTET



dr Janko T. Žujović

**Klinički značaj ekspresije athezionih molekula,  
Stathmina1 i neovaskularizacije u kolorektalnom  
adenokarcinomu**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Niš, 2021.



UNIVERSITY OF NIŠU  
FACULTY OF MEDICINE



**dr Janko T. Žujović**

**Clinical Significance of Expression of Adhesion  
Molecules, Stathmin1 and Neovascularization in  
Colorectal Adenocarcinoma**

DOCTORAL DISERTATION

Niš, 2021.

## Podaci o doktorskoj disertaciji

Mentor:	Prof. dr Miroslav Stojanović Katedra za hirurgiju Medicinski fakultet, Univerzitet u Nišu
Naslov:	Klinički značaj ekspresije athezionih molekula, Stathmin1 i neovaskularizacije u kolorektalnom adenokarcinomu
Rezime:	<p>Cilj našeg istraživanja je ispitivanje povezanosti ekspresije Ki67, E-cadherina, Stathmin1, VEGF i CD105 sa kliničko-patološkim parametrima kolorektalnog adenokarcinoma. Korišćen je biopsijski operativni material Centra za abdominalnu hirurgiju Kliničkog Centra Crne Gore (KCCG), dobijen resekcijom kolorektalnog carcinoma. Ispitivanu grupu su činile operativne biopsije kolorektalnog adenokarcinoma (n=72), a kontrolnu grupu (n=72) su činile operativne biopsije ne-tumorskog tkiva iz okoline tumora, Nakon rutinske obrade tkiva ikalupljenja u paraffin, na presecima debljine 4<math>\mu</math>m su primenjene klasična HE metoda i imunohistohemijska ABC metoda sa anti-Ki67, Stathmin1, E-cadherin, VEGF i CD105 antitelima. Za analizu dobijenih rezultata korišćen je programski paket SPSS za Windows (ver.19.0 IBM Corp). Nijedan od ispitivanih proteina ne zavisi od pola, starosnog doba, lokalizacije tumora u kolonu, načina tumorskog rasta i histološkog gradusa. Ekspresija E-cadherina, Stathmin1, Ki67, VEGF i CD105 su visoko značajno povezani sa Astler-Coller stadijumom (<math>r=0.875, 0.865, 0.818, 0.872</math> i <math>0.630</math>) i sa metastazama u limfnim čvorovima (<math>r=-0.729, 0.725, 0.766, 0.612</math> i <math>0.553</math>). Ovi biomarkeri su značajno, ali nešto nižim koeficijentima korelacije povezani sa pT statusom tumora, limfovaskularnom i perineuralnom invazijom, i udaljenim metastazama. Stepwise regresionom analizom je pokazano da najveći značaj za predikciju progresije kolorektalnog karcinoma imaju E-cadherin, Stathmin1 i Ki67 u kombinaciji sa pT statusom i udaljenim metastazama. ROC analiza je pokazala da najveće dijagnostičke performanse ima Stathmin1 (senzitivnost 97.3% i specifičnost 91.4%), a zatim slede Ki67 i CD105. Naši rezultati ukazuju da, od ispitivanih biomarkera, najjači prediktorni značaj za progresiju kolorektalnog karcinoma imaju ekspresija E-cadherina, Stathmin1 i Ki67. Na osnovu ekspresije ovih proteina je moguće identifikovati agresivan fenotip kolorektalnog karcinoma, što pruža mogućnost personalizovanog pristupa antitumorskom tretmanu, primenom antagonista E-cadherina, Stathmin1 i Ki67.</p>

Naučna oblast:	Medicinske nauke
Naučna disciplina:	Hirurgija
Ključne reči:	kolorektalni karcinom, ekspresija Ki67, Stathmin1, E-cadherin, VEGF, CD105, prediktori progresije tumora, dijagnostički značaj
UDK:	616.348/.351-006.6-089:576.3(043.3)
CERIF klasifikacija:	B 600 Hirurgija, ortopedija, traumatologija B 200 Citologija, onkologija, kancerologija
Tip licence	
Kreativne zajednice:	CC BY-NC-ND

## Data on Doctoral Dissertation

Doctoral  
Supervisor:

Prof. Miroslav Stojanović, MD, PhD  
Department of surgery  
Medicinski fakultet, Univerzitet u Nišu

Title:

Clinical significance of expression of adhesion molecules, Stathmin1 and neovascularization in colorectal adenocarcinoma

Abstract:

The aim of our study was to examine the association of the expression of Ki67, E-cadherin, Stathmin1, VEGF and CD105 with clinical-pathological parameters of colorectal adenocarcinoma. In our study was used biopsy operative material from the Center for Abdominal Surgery of the Clinical Center of Montenegro (KCCG) obtained by resection of colorectal cancer. The study group consisted of operative biopsies of colorectal adenocarcinoma (n = 72), and the control group (n = 72) consisted of operative biopsies of non-tumor tissue from the tumor environment. After routine tissue processing and molding into paraffin, the classical HE method and immunohistochemical ABC method with anti-Ki67, Stathmin1, E-cadherin. VEGF and CD105 antibodies were applied on sections 4µm thick tissue. The SPSS software package for Windows was used to analyze the obtained results (ver.19.0 IBM Corp). None of the examined proteins depends on the sex or age of the patient, location of the tumor in the colon, mode of tumor growth or histological grade. Expression of E - cadherina, Stathmin1, Ki67, VEGF and CD105 are significantly associated with Astler-Coller stage (r = 0.875,0.865,0.818,0.872 and 0.630) and with lymph node metastases (r = -0.729,0.725,0.766,0.612 and 0.553). These biomarkers are significantly, but with slightly lower correlation coefficients, associated with pT tumor status, lymphovascular and perineural invasion, and metastases. Stepwise regression analysis showed that E-cadherin, Stathmin1 and Ki67 in combination with with pT status and distant metastases have a the greatest significance for prediction of colorectal cancer progression. ROC analysis showed that the greatest diagnostic performance has Stathmin1 (sensitivity 97.3% and specificity 91.4%), followed by Ki67 and CD105. Our results indicate that, of the examined biomarkers, the strongest prediction significance for progression of colorectal cancer have the expression of E-cadherin, Stathmin1 and Ki67. Based on expression of these proteins it is possible to identify the aggressive phenotype of colorectal cancer, which provides possibility of personalized approach to antitumor treatment, using antagonists of E-cadherina, Stathmin1 and Ki67.

Scientific Field:

Medical sciences

Scientific Discipline:

Surgery

Key Words:

colorectal cancer, Ki67 expression, Stathmin1, E-cadherin, VEGF, CD105, predictors of tumor progression, diagnostic significance

UDC:

616.348/.351-006.6-089:576.3(043.3)

CERIF Classification:

B 600 Surgery, orthopaedics, traumatology  
B 200 Cytology, oncology, cancerology

Creative Commons

License Type:

CC BY-NC-ND

## ZAHVALNICA

*Zahvaljujem se svojim mentorima, Prof. dr Miroslavu Stojanoviću i Prof. dr Snežani Jančić, što su bili uz mene u svakom trenutku tokom ovog istraživanja. Najpre su me sa mnogo strpljenja uveli u naučno-istraživački rad, a zatim bili tu da pomognu i daju savjete svaki put kada bih naišao na prepreku. Bez njihovog usmeravanja, podrške i pomoći, ne bih stigao do cilja.*

*Veliku zahvalnost dugujem kolektivu Digestivne hirurgije Kliničkog centra Crne Gore, posebno Prof. dr Ranku Lazoviću, koji mi je nesebično prenio svoje dragocjeno hirurško iskustvo i znanje, pokazao mi kako na visoko profesionalan način i pedantnim pristupom treba da se pristupa radu i ukazao na mnoge detalje koji su mi bili i biće od neprocenjivog značaja.*

*Najveću zahvalnost dugujem svojoj porodici, ćerkama Kseniji i Dariji, koje me svakodnevno čine boljim čovjekom, koje mi daju snagu i motiv da sve što započnem i završim, supruzi Ani hvala na strpljenju, posvećenosti i velikoj ljubavi, te roditeljima i sestrama koji su uvek bili tu za mene, i sa mnogo razumevanja pružali bezrezervnu podršku.*

# SADRŽAJ

<b>1.UVOD</b> .....	1
<b>2.PREGLED LITERATURE</b> .....	4
<b>2.1.Morfološke i funkcionalne karakteristike debelog creva</b> .....	4
2.1.1. Anatomija debelog creva.....	4
2.1.2. Histološka organizacija debelog creva.....	9
2.1.3. Funkcionalne karakteristike debelog creva.....	11
<b>2.2. Kolorektalni karcinom</b> .....	13
2.2.1.Epidemiologija.....	13
2.2.2.Faktori rizika za nastanak kolorektalnog karcinoma .....	14
2.2.2.1.Nepromenljivi faktori rizika .....	15
2.2.2.1.1.Pol i starosno doba .....	15
2.2.2.1.2. Rasna i etnička pripadnost .....	16
2.2.2.1.3. Pozitivna lična anamneza.....	16
2.2.2.1.4.Inflamativne bolesti kolona.....	17
2.2.2.2. Promenljivi faktori rizika .....	18
2.2.2.2.1.Način ishrane .....	18
2.2.2.2.2.Navike i način života .....	20
2.2.3.Kolorektalna karcinogeneza.....	21
2.2.3.1. Hromozomska nestabilnost (CIN) - mutacije u APC genu.....	22
2.2.3.2. Mikrosatelitska nestabilnost (MSI).....	24
2.2.3.3. Metilacija CpG sekvenci (CIMP)-epigenetski put.....	25
2.2.4. Kliničke karakteristike kolorektalnog karcinoma.....	26

2.2.4.1. Klinička slika .....	26
2.2.4.2. Lokalizacija i način rasta tumora .....	27
2.2.5. Dijagnostičke procedure .....	29
2.2.5.1. Klinička dijagnostika .....	29
2.2.5.1.1. Anamneza, klinički i laboratorijski pregled .....	30
2.2.5.1.2. Kolonoskopija .....	31
2.2.5.1.3. Radiološke dijagnostičke procedure .....	32
2.2.5.2. Mikromorfološka dijagnostika .....	35
2.2.5.2.1. Patohistološka dijagnoza .....	35
2.2.5.2.2. Histopatološki subtip kolorektalnog adenokarcinoma .....	36
2.2.5.2.3. Histochemijske i imunohistochemijske osobine karcinoma kolorektuma .....	39
2.2.5.2.4. Molekulogenetičke i ultrastrukturne osobine kolorektalnog karcinoma .....	42
2.2.5.2. Patološki prognostički faktori .....	46
2.2.5.2.1. Patološki stadijum bolesti .....	47
2.2.5.2.2. Dubina invazije tumora (pT-kategorija) .....	51
2.2.5.2.3. Limfonodalni status tumora (pN-kategorija) .....	52
2.2.5.2.4. Udaljene metastaze (pM-kategorija) .....	53
2.2.5.2.5. Rezidualni status (R-kategorija) .....	53
2.2.5.2.6. Mikrometastaze ( kategorija LN <sub>(mi)</sub> +) .....	54
2.2.5.2.7. Vaskularna invazija (pV-kategorija) .....	54
2.2.5.2.8. Tumorski depoziti (TD.kategorija) .....	55
2.2.5.2.9. Stepen histološkog maligniteta / histološki gradus tumora .....	56
2.2.5.2.10. Cirkumferentna resekciona margina (CRM- status) .....	57
2.2.5.2.11. Perineuralna invazija (PNI- status) .....	58
2.2.5.2.12. Tumorsko pupljenje (Tumor budding-Bd) .....	59
2.2.5.2.13. Imunološki odgovor domaćina .....	60



2.2.6. Terapija kolorektalnog karcinoma .....	60
2.2.6.1. Hirurška terapija.....	61
2.2.6.1.1. Laparoscopska kolektomija (Minimalno invazivna kolektomija) .....	63
2.2.6.1.2. Hirurško lečenje metastaza .....	64
2.2.6.2. Radioterapija.....	65
2.2.6.3. Hemoterapija.....	66
2.2.6.4. Hemoradioterapija.....	67
2.2.6.5. Ciljana terapija .....	68
<b>2.3. Biomarkeri .....</b>	<b>70</b>
2.3.1. Stathmin 1 (STMN1) .....	70
2.3.1.1. Struktura i biološke osobine.....	70
2.3.1.2. Funkcija i prognostički značaj Stathmin 1 .....	71
2.3.2. Proliferativni Ki67 antigen .....	73
2.3.2.1. Struktura i biološke osobine.....	73
2.3.2.2. Funkcija i prognostički značaj Ki67 .....	74
2.3.3. E-cadherin (Uvomodulin) .....	75
2.3.3.1. Struktura i biološke osobine.....	75
2.3.3.2. Funkcija i prognostički značaj E-cadherina .....	77
2.3.4. Angiogeneza .....	78
2.3.4.1. Vaskularni endotelni factor rasta (VEGF).....	79
2.3.4.2. CD105 (Endoglin)i MVD (microvessel density).....	81
<b>3. CILJ ISTRAŽIVANJA.....</b>	<b>84</b>
<b>4. MATERIJAL I METODE.....</b>	<b>85</b>
<b>4.1. Ispitivani uzorak.....</b>	<b>85</b>
4.2.1. Pacijenti.....	85
4.2.2. Tkivni uzorci.....	86

<b>4.2. Metode</b> .....	86
4.2.1. Imunohistochemijski metod .....	86
4.2.1.1. Izvođenje imunohistochemijske reakcije .....	87
4.2.1.2. Evaluacija imunohistochemijske ekspresije .....	88
4.2.1.3. Kontrola kvaliteta i specifičnosti imunohistochemijskog bojenja .....	89
4.2.3. Statistička analiza .....	89
<b>5. REZULTATI</b> .....	90
<b>5.1. Deskriptivna makro- i mikroskopska analiza</b> .....	90
5.1.1. Deskriptivna makroskopska analiza .....	90
5.1.2. Deskriptivna mikroskopska analiza .....	92
5.1.2.1. Mikromorfološke karakteristike kolorektalnog adenokarcinoma .....	92
5.1.2.2. Imunoekspresija Ki67/indeks proliferacije .....	93
5.1.2.3. Imunoekspresija E-cadherina .....	94
5.1.2.4. Imunoekspresija Stathmin1 .....	95
5.1.2.5. Imunoekspresija Vascular endothelial growth factor (VEGF) .....	96
5.1.2.6. Imunoekspresija Endoglina (CD105) .....	97
<b>5.2. Statistička analiza</b> .....	98
5.2.1. Demografske karakteristike ispitanika .....	98
5.2.1.1. Pol ispitanika .....	98
5.2.1.2. Starosno doba ispitanika .....	98
5.2.2. Kliničko-patološke karakteristike .....	100
5.2.2.1. Lokalizacija tumora u kolonu .....	100
5.2.2.2. Način rasta tumora (makroskopski tip) .....	101
5.2.2.3. pT stadijum tumora .....	102
5.2.2.4. Metastaze u limfnim čvorovima (pN status) .....	103
5.2.2.5. Udaljene metastaze .....	104

5.2.2.6.Histološki gradus tumora .....	104
5.2.2.7.Invazija limfnih sudova.....	105
5.2.2.8. Invazija krvnih sudova.....	106
5.2.2.9.Perineuralna invazija.....	106
5.2.2.10. Astler Coller stadijum tumorske bolesti.....	107
5.2.3. Imunohistochemijsko ispitivanje ekspresije Ki67,Stathmin1,E-cadherina,VEGF i CD105.....	108
5.2.3.1. Ekspresija Nuklearnog proliferativnog antigena Ki67 .....	108
5.2.3.2. Ekspresija Stathmin1 (STMN1).....	109
5.2.3.3. Ekspresija E-cadherina.....	110
5.2.3.4. Ekspresija Vascular endothelial growth factor VEGF .....	111
5.2.3.5. Ekspresija Endoglina (CD105) .....	112
5.2.4. Ekspresija Ki67, Stathmin1, E-cadherina, VEGF i CD105 u odnosu na kliničko-patološke karakteristike .....	114
5.2.4.1.Ekspresija biomarkera u odnosu na pol ispitanika.....	114
5.2.4.2.Ekspresija biomarkera u odnosu na starosno doba ispitanika.....	115
5.2.4.3.Ekspresija biomarkera u odnosu na lokalizaciju tumora u kolonu .....	115
5.2.4.4.Ekspresija biomarkera u odnosu na način rasta tumora (makroskopski tip) .....	117
5.2.4.5.Ekspresija biomarkera u odnosu na pT stadijum tumora.....	118
5.2.4.6. Ekspresija biomarkera u odnosu na histološki gradus tumora.....	120
5.2.4.7. Ekspresija biomarkera u odnosu na invaziju limfnih sudova .....	121
5.2.4.8. Ekspresija biomarkera u odnosu na invaziju krvnih sudova.....	123
5.2.4.9. Ekspresija biomarkera u odnosu na perineuralnu invaziju .....	124
5.2.4.10.Ekspresija biomarkera u odnosu na metastaze u limfnim čvorovima.....	125
5.2.4.11.Ekspresija biomarkera u odnosu na udaljene metastaze .....	126
5.2.4.12.Ekspresija biomarkera u odnosu na Astler Coller stadijum .....	127
5.2.5. Korelacija ekspresije Ki67,Stathmin1, E-cadherina,	

VEGF i CD105 sa kliničko-patološkim parametrima .....	129
5.2.6. ROC analiza (dijagnostička vrednost ekspresije Stathmin1, Ki67 i CD105) .....	132
5.2.7. Regresiona analiza .....	134
<b>6. DISKUSIJA .....</b>	<b>138</b>
<b>6.1. Kliničko-patološke karakteristike kolorektalnog karcinoma .....</b>	<b>138</b>
<b>6.2. Ekspresija korišćenih biomarkera u ispitivanim grupama .....</b>	<b>142</b>
6.2.1. Ekspresija Ki67/proliferativni indeks (prpIDX) .....	142
6.2.2. Ekspresija Stathmin1 (STMN1) .....	143
6.2.3. Ekspresija E-cadherina .....	144
6.2.4. Ekspresija Vascular endothelial growth factor (VEGF) .....	145
6.2.5. Ekspresija Endoglina (CD105) .....	146
<b>6.3. Ekspresija korišćenih biomarkera u odnosu na kliničko-patološke parametre kolorektalnog karcinoma .....</b>	<b>147</b>
6.3.1. Ekspresija korišćenih markera u odnosu na pol i starosno doba ispitanika .....	147
6.3.2. Ekspresija korišćenih markera u odnosu na lokalizaciju i način rasta tumora .....	148
6.3.3. Ekspresija korišćenih markera u odnosu na pT status tumora .....	150
6.3.4. Ekspresija korišćenih makera u odnosu na histološki gradus tumora .....	153
6.3.5. Ekspresija korišćenih markera u odnosu na limfovaskularnu invazije (LVI) .....	154
6.3.6. Ekspresija korišćenih markera u odnosu na perineuralnu invaziju (PNI) .....	155
6.3.7. Ekspresija korišćenih markera u odnosu na metastaze u limfnim čvorovima i udaljene metastaze .....	156
6.3.8. Ekspresija korišćenih markera u odnosu na Astler Coller stadijum tumora .....	159
<b>6.4. Uzajamni odnosi ispitivanih varijabli .....</b>	<b>163</b>
6.4.1. Međusobna povezanost korišćenih biomarkera i kliničkopatoloških parametara .....	163
6.4.2. ROC-analiza (dijagnostička validnost ekspresije Stathmin1, Ki67 i CD105) .....	166

6.4.3. Regresiona multivarijantna stepwise analiza .....	167
<b>7. ZAKLJUČAK</b> .....	170
<b>8. OPŠTI ZAKLJUČAK</b> .....	172
<b>9. LITERATURA</b> .....	173



## 1. U V O D

Kolorektalni karcinom je Internacionalna agencija za ispitivanje karcinoma (IARK) uvrstila među tri najfrekventnije maligne neoplazme u humanoj onkologiji (1). Alarmantan je podatak da su incidenca i mortalitet, za ovaj tumor, poslednje tri decenije u stalnom porastu, sa prosečnom godišnjom stopom rasta od oko 3% ili sa više od 400.000 novoobolelih u toku jedne godine. Upadljivo povećanje incidence je zabeleženo u zemljama u tranziciji, Australiji/Novom Zelandu, Evropi i Severnoj Americi (2).

Kolorektalna karcinogeneza je višestepni proces, tokom koga kumulativne mutacije gena dovode do promena fenotipa što se manifestuje rastom crevne sluznice, displastičnim promenama i na kraju invazivnom neoplazijom (3). Tokom karcinogeneze se dešavaju poremećaji ćelijske proliferacije, atezije transdukcije signala i diferencijacije sa akumulacijom različitih genskih alteracija (3)

Danas se zna da postoje tri patogenetski različita mehanizma nastanka kolorektalnog karcinoma. Prvi je APC/ $\beta$  kateninski put (sekvenca adenom-karcinom), drugi mehanizam je popravka pogrešno uparene DNK (ili mikrosatelitska nestabilnost) i treći je hipermetilacija genoma. Adenom-karcinom sekvenca je najčešći oblik genomske nestabilnosti i nalazi se u oko 85% kolorektalnih karcinoma. Karakteriše se postojanjem hromozomskih nestabilnosti koje su udružene sa postepenim nagomilavanjem mutacija u brojnim protoonkogenima i tumor supresivnim genima (3,4).

Jedan od onkoproteina koji je sporadično ispitivan u kolorektalnoj karcinogenezi je Stathmin1, mikrotubularni regulatorni protein sa važnom ulogom u montaži i demontaži deobnog vretena (5). Ekspresija Stathmin 1 u kancerskim ćelijama je povezana sa njihovom proliferacijom i metastaziranjem. Visoko je eksprimiran u širokom spektru humanih karcinoma, pa predstavlja atraktivnu metu za antikancersku terapiju (6,7). Zhang i saradnici su nedavno saopštili značajnu povezanost Stathmin1 sa metastazama u limfnim čvorovima, sa TNM-stadijumom tumora, sa dužinom preživljavanja i zaključili da je ekspresija Stathmin 1 nezavistan prognostički faktor koji je prediktor rasta, invazije i metastaziranja karcinoma kolona (5). U literaturi postoji i zapažanje o pozitivnoj korelaciji ekspresije Stathmin 1 sa metastazama i o njegovoj inverznoj povezanosti sa dužinom preživljavanja kod difuznog tipa želudačnog karcinoma (7).

Proliferacija ćelija je proporcionalna tumorskom rastu i progresiji, a tradicionalno korišćen marker proliferacije je proliferativni nuklearni antigen- Ki67. On obeležava ne samo ćelije u deobi već i sve one u sintetičkoj fazi ciklusa (u G1, S, G2 i M fazi) (8).

Poznato je da ćelijska adhezija ima važnu ulogu u regulaciji rasta, diferencijaciji i migraciji

ćelija. Ključnu ulogu u ćelijskoj adheziji i u održavanju normalnih struktura tkiva imaju athezioni molekuli kadherini (9). Ćelijski adhezioni molekul E-cadherin je identifikovan kao supresor tumorske invazije i metastaziranja. Gubitak E-kadherinskih adhezivnih molekula je povezan sa poremećajem citoskeleta, dediferencijacijom i povećanom migratornom sposobnošću ćelija što omogućava njihovo odvajanje od tumora i povećava njegov metastatski potencijal, a samim tim determinše i loš klinički ishod (9,10). U karcinomu želuca je pokazano da je redukcija ekspresije E-cadherina signifikantno udružena sa tumorskom infiltracijom, metastazama u limfnim nodusima i lošom prognozom (11). Kod pacijenata sa inoperabilnim kolorektalnim karcinomom gubitak E-cadherina je povezan i sa rezistencijom na hemoterapiju, što sugeriše da on može biti značajan prognostički faktor i u proceni ishoda hemoterapije (9).

U nekontrolisanoj proliferaciji ćelija, preživljavanju malignih ćelija i tumorskoj invaziji ključnu ulogu ima neoangiogeneza (12). Neovaskularizacija tumora se može dešavati pomoću različitih mehanizama, zavisno od tipa tumora, stadijuma razvoja tumora i od anatomske lokalizacije. Indukcija angiogeneze se događa kada se poremeti balans između proangiogenih i antiangiogenih faktora. Najpotentniji predstavnik proangiogenih faktora je Vaskularni endotelni faktor rasta (VEGF). VEGF, poznat kao prvi i najznačajniji stimulator angiogeneze, predstavlja ključni molekul koji determinše formiranje vaskularne mreže. Sekretuje ga veliki broj ćelija uključujući i tumorske ćelije (13). VEGF uzrokuje proliferaciju, migraciju i diferencijaciju endotelnih ćelija (14) koje smo markirali monoklonalnim CD105 antitelom. Step eneoangiogeneze, izražen kroz mikrovaskularnu gustinu (MVD), je priznati nezavistan parametar metastatskog potencijala. Za procenu stepena angiogeneze/mikrovaskularne gustine se koriste različiti markeri, a najčešće korišćeni su CD34 i CD105 (Endoglin). Smatra se da je CD105 senzitivniji i specifičniji marker od CD34. Dokazano je da se anti CD105 antitela vezuju za sve novostvorene endotelne ćelije i krvne sudove i da se vezuju samo za oko 20% prethodno formiranih ne-neoplastičnih krvnih sudova (15,16). Takođe je zapaženo da se CD105 ne vezuje za zapaljenske i stromalne ćelije što smanjuje broj lažno pozitivnih rezultata (17). MVD (microvessel density) određen upotrebom CD105 antitela može da ukaže na povećan rizik za razvoj lokoregionalne rekurentne bolesti (18). Brojni izveštaji ukazuju na prediktorni značaj mikrovaskularne gustine (MVD) u različitim malignim tumorima (16,17,18,19,20,21).

Zahvaljujući intenzivnom proučavanju angiogeneze, razvili su se brojni modeli anti-angiogene „target“ terapije za različite tipove karcinoma (19,20). Prema sadašnjim saznanjima CD105 predstavlja odličnu metu za primenu antiangiogene terapije i dobar je pokazatelj tumorske prognoze (21).

Zbog svega navedenog zadatak ove studije je ispitivanje korelacije ekspresije athezivnih molekula, proliferativnog indeksa i indeksa neoangiogeneze sa kliničkim i patohistološkim karakteristikama kolorektalnog karcinoma.



## 2. PREGLED LITERATURE

### 2.1. Morfološke i funkcionalne karakteristike debelog creva

#### 2.1.1. Anatomija debelog creva

Debelo crevo je završni deo organa za varenje i pruža se od ileocealnog ušća (*ostium ileocecale*) do zupčaste linije u analnom kanalu. Dužine je oko 150cm, ima oblik znaka pitanja koji svojim konkavitom, okrenutim naniže, obuhvata vijuge tankog creva. Najveći deo kolona leži u postmezokoličnom spratu trbušne duplje, a samo rektum se nalazi u maloj karlici. Anatomski izdvojeni delovi debelog creva su crvuljak (*appendix vermiformis*), slepo crevo (*caecum*), ushodni kolon (*colon ascendens*), hepatična fleksura (*flexura coli hepatis*), poprečni kolon (*colon transversum*), lijenalna fleksura (*flexura coli lienalis*), nishodni kolon (*colon descendens*), sigmoidni kolon (*colon sigmoideum*) i čmarno crevo (*rectum*) (22,23). Poprečni i sigmoidni kolon imaju svoj mezenterijum (peritonealna duplikatura), dok ushodni i nishodni kolon imaju svoj mezenterijum samo u 12-22% ljudi, inače su slepljeni za zadnji trbušni zid (24).

Početak debelog creva je smešten u donjem desnom kvadrantu abdomena, slepo je zatvoren i naziva se cekum. Dužine je oko 7-8 cm, a prečnika oko 8-10 cm. Na posteromedijalnom delu zida cekuma se uliva završni deo ileuma i stvara strukturu poznatu kao Bauchinijeva valvula (25). Od ove valvule se naviše pruža uzlazni kolon (*colon ascedens*), koji prolazi superiorno i desnom stranom trbušne duplje do desnog režnja jetre, gde skreće u levo, u desnu hepatičnu fleksuru (*flexura colli*). Ascendentni kolon je uži od cekuma, dužine je oko 15cm, prekriven je peritoneumom sa prednje i lateralne strane i odvojen je od anterolateralnog abdominalnog zida omentumom majusom (26).

Arterijsku vaskularizaciju uzlaznog kolona i desnoj hepatičnoj fleksuri daju ogranci *a. mesentericae superior*, *a. ileocolica* i *a. colica dextra*. Ove arterije prave anastomoze sa desnim ogrankom *a. colicae mediae*, prve iz reda anastomotičnih lukova na koju se nastavljaju lukovi levih količnih i sigmoidnih arterija gradeći jukstakoličnu arteriju. Pritoke gornje mezenterične vene, ileokolična i desna količna vena odvode krv iz uzlaznog kolona.

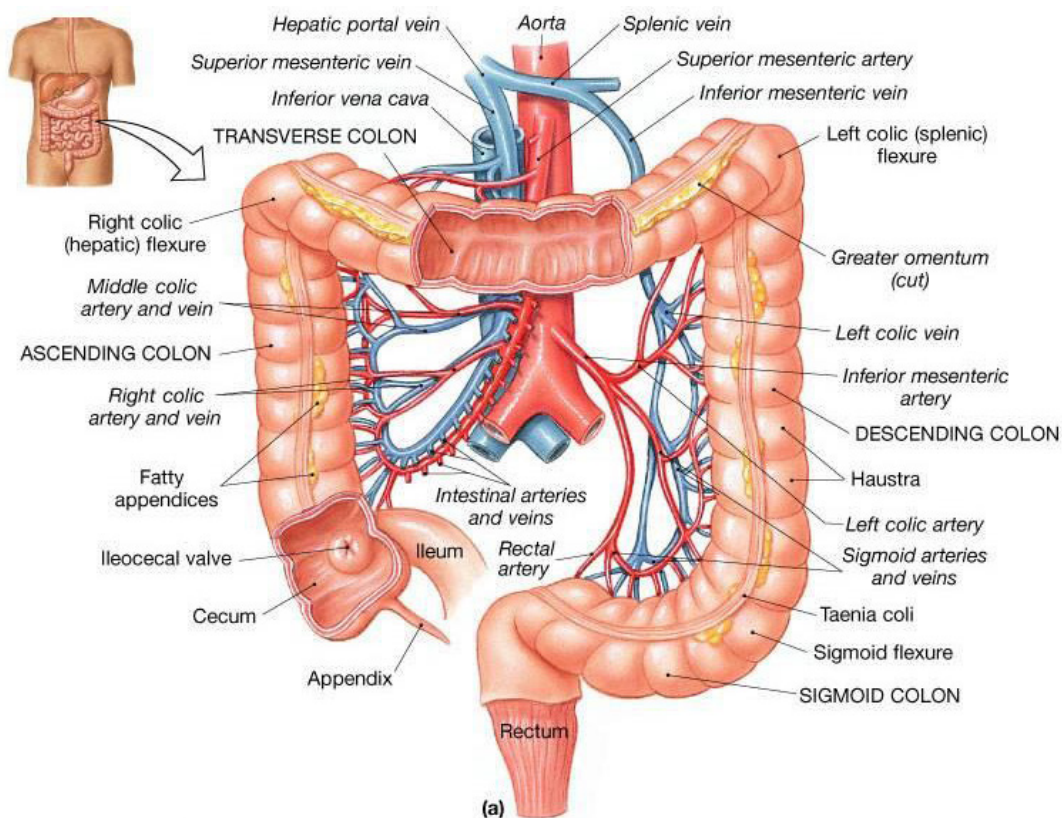
Limfni sudovi se ulivaju u epikolične i parakolične limfne čvorove, u ileokolične i intermedijarne desne količne limfne čvorove, a iz njih u gornje mezenterične limfne čvorove. Nervi za ascendentni kolon potiču iz gornjeg mezenteričnog nervnog plexusa (27).

Poprečni kolon se pruža poprečno kroz trbušnu duplju od desne do leve količne fleksure do ispod levog rebarnog luka pa se savija nadole i prelazi u silazno debelo crevo. Poprečni kolon je dužine

oko 50cm, kalibra oko 5cm, a obzirom da je pokretljiv njegova pozicija je varijabilna. Arterijska vaskularizacija poprečnog kolona potiče od gornje mezenterične arterije, ali ponekad može da prima krv i iz leve i desne količne arterije putem anastomoza (25,27). Venska drenaža se odvija preko gornje mesenterične vene, a limfa se drenira u srednje količne limfne čvorove, koji se ulivaju u gornje mesenterične limfne čvorove. Nervi potiču iz gornjeg mesenteričnog nervnog plexusa. Oni sadrže simpatička, parasimpatička i visceralna aferentna nervna vlakna (26,28).

Silazno debelo crevo (*colon descendens*) se nalazi u levom bočnom delu trbušne duplje. Prostire se naniže iza samog trbušnog zida, a ispred lateralne ivice levog bubrega i skreće medijalno, ali i dalje ide naniže do spoja sa sigmoidnim kolonom na ulazu u malu karlicu. Dužine je oko 25cm a kalibra oko 3-4cm. Prednja i obe bočne strane silaznog kolona su položene intraperitonealno, a njegov distalni deo je obično povezan priraslicama za peritoneum zadnjeg dela trbušnog zida (26,29).

Na descendentni kolon se nastavlja sigmoidni kolon koji ima oblik slova „S“, a pruža se najpre kroz levu ilijačnu jamu, a zatim silazi u malu karlicu do sakralnog promontorijuma gde počinje pravo crevo ili rektum. Dužina sigmoidnog kolona je promenljiva i može iznositi od 15 do 50 cm, a kalibar mu je oko 3cm. Sigmoidni kolon ima veoma dugačak mezenterijum, pa je zato relativno pokretan, posebno u srednjem delu (29). Početak sigmoidnog mezokolona se širi najpre medijalno i superiorno prateći ilijačne krvne sudove, a zatim medijalno i inferiorno od bifurkacije zajedničkih ilijačnih arterija do prednje površine sakruma. Levi ureter i bifurkacija leve zajedničke ilijačne arterije leže retroperitonealno i posteriorno od vrha korena sigmoidnog kolona (30). Unutar mezosigme se nalaze sigmoidne i gornja rektalna arterija sa pratećim venama, limfaticima i autonomnim nervima. Arterije descendentnog i sigmoidnog kolona potiču od *a.colicaesinistrae* i sigmoidnih arterija, ogranaka donje mezenterične arterije. Na levoj fleksuri kolona se događa druga vaskularizacija abdominalnog dela digestivnog sistema, odnosno od gornje mezenterične arterije za deo creva proksimalno od fleksure (embrionalno srednje crevo), na donju mezenteričnu arteriju, za deo creva distalno od leve fleksure (embrionalno zadnje crevo). Sigmoidne arterije spuštaju se koso ulevo gde se dele na silazne i uzlazne grane (27).



Slika 1. Anatomija debelog creva i rektuma (Izvor: NetterF.H: AtlasofHumanAnatomy, Saunders, Philadelphia, 2010)

Superiorna grana sigmoidne arterije anastomozira se sa silaznom granom leve količne arterije gradeći deo marginalne arterije (Drummond-ova arterija). Ova arterija predstavlja vezu između gornje i donje mesenterične arterije i ona je skoro uvek prisutna, tako da prilikom ligiranja donje mesenterične arterije vaskularizacija u većine slučajeva ostaje očuvana (25). Donja mesenterična vena vraća krv iz descendentnog i sigmoidnog kolona i uliva se obično u spleničnu venu, a zatim u portalnu venu koja odvodi krv u jetru. Limfni sudovi iz silaznog i sigmoidnog kolona se ulivaju u epikolične i parakolične limfne čvorove, a zatim u intermedijarne količne limfne čvorove duž a.colicae sinistrae, a limfa iz čvorova odlazi u donje mesenterične limfne čvorove (28).

Simpatička inervacija silaznog i sigmoidnog kolona potiče iz lumbalnog dela simpatičnog trunkusa, preko lumbalnih (abdominopelvičnih) splanhičkih nerava, superiornog mesenteričnog plexusa i periarterijskih plexusa koji prate a.mesenterica inferior i njene grane. Parasimpatička inervacija potiče od pelvičnih splanhičkih nerava preko donjih hipogastričnih plexusa i nerava, koji se penju retroperitonealno (25,30).

Proksimalno od srednjeg dela sigmoidnog debelog creva visceralna aferentna vlakna sprovode bol retrogradno sa simpatičkim vlaknima u torakolumbalne spinalne ganglione, dok vlakna koja nose refleksne informacije putuju sa parasimpatičkim vlaknima u vagalne ganglione. Distalno od sredine sigmoidnog kolona sva visceralna aferentna vlakna prate parasimpatična vlakna retrogradno u ganglione spinalnih živaca S2-S4 (29).

Sigmoidni kolon se nastavlja na pravo crevo (*rectum*) koje ga spaja sa analnim kanalom. Po

shvatanju hirurga rektum nastaje u visini promontorijuma, a po klasičnom shvatanju anatoma rektum počinje na rektosigmoidnom prelazu u visini trećeg sakralnog pršljena. Dužina rektuma iznosi od 12-15 cm, a varijabilnog je kalibra (25). Rektum u sagitalnoj ravni gradi luk, konkavan put napred tako da ispunjava sakrokocigealno udubljenje. Pri prolasku kroz karlični pod rektum gradi anorektalni ugao konkavan put nazad. Ukoliko se rektum gleda sa prednje strane on gradi tri fleksure (krivine), od kojih su gornja i donja konveksne u desno, a srednja u levo. U lumenu rektuma ovim krivinama odgovaraju valvule tkz. *Hustonovi nabori* koje formiraju cirkularni mišićni sloj i sluzokoža. Pošto sluzokoža nije čvrsto vezana za mišićni sloj ovi nabori se gube prilikom distenzije rektuma (29). U srednjem delu, koji se nalazi iznad karlične prečage (*diaphragma pelvis*), lumen rektuma je proširen u tkz. ampulu rektuma (*ampulla recti*). Ampula prima i zadržava nakupljenu fekalnu masu pre eliminacije kroz anus. Sposobnost ampule da se relaksira kako bi se prilagodila kasnijem dolasku fekalnih masa predstavlja važan proces očuvanja fekalnog kontinuiteta (23,28).

Peritonijum pokriva prednju i lateralne površine gornje trećine rektuma. Kod muškaraca peritoneum se proteže od rektuma do zadnjeg zida bešike gde gradi gornji deo rektovezikalnog špaga. Kod žena se peritoneum proteže od rektuma do zadnjeg zida forniksa vagine gde gradi gornji zid rektouterinog špaga (26).

Gornja trećina rektuma je vaskularizovana preko donje mezenterične arterije (*a. mesentericae inferior*), kroz njene grane: *a. colica sinistra*, *aa. sigmoideae* i *a. rectalis superior*. Donje dve trećine rektuma ishranjuju *a. rectalis media* i *a. rectalis inferior*, grane *a. iliaca interna*. Krv iz rektuma dreniraju gornje, srednje i donje rektalne vene. Između portalne i sistemskih vena u zidu analnog kanala postoje portokavalne anastomoze koje su klinički veoma važne (31).

Limfa se iz gornje polovine rektuma drenira kroz pararektalne limfne čvorove koji su smešteni u mišićnom sloju rektuma. Odavde se limfa prenosi do donjih mesenteričnih limfnih čvorova, a odatle odlazi u lumbalne limfne čvorove. Iz donje polovine rektuma limfa odlazi direktno u sakralne limfne čvorove ili prati srednje rektalne krvne sudove i uliva se u ilijačne limfne čvorove (24,26,27).

Rektum inervišu simpatična i parasimpatična nervna vlakna vegetativnog nervnog sistema. Simpatična vlakna potiču iz lumbalnog dela kičmene moždine preko lumbalnih splanhničnih nerava i hipogastrično/pelvičnog plexusa, zatim preko periarterijalnog plexusa donje mesenterične i gornje rektalne arterije. Parasimpatična vlakna doleže iz S2-S4 segmenta kičmene moždine prolaze preko splanhničkih nerava i donjeg hipogastričnog plexusa do rektalnog plexusa. Visceralna aferentna vlakna prate parasimpatička vlakna retrogradno do S2-S4 spinalnih senzitivnih gangliona (31).

Na površini kolona su prisutne karakteristične morfološke strukture (24,32,33) :

- uzdužne pantljike (*taeniae coli*) koje su sačinjene od snopova longitudinalnih mišićnih vlakana. Postoje tri uzdužne pantljike (*taenia libera*, *taenia omentalis* i *taenia mesocolica*) koje se pružaju od cekuma, penju se u ushodni kolon, idu duž poprečnog, nishodnog i sigmoidnog kolona i iščezavaju u predelu čmarnog creva.

-mehurasta ispupčenja (*haustrea coli*) koja se nalaze između tenija i debelom crevu daju

karakterističan klobučast izgled, tako što u vidu mehura uzdižu delove crevnog zida

-poprečni žljebovi (*sulci transversi*) su strukture koje odvajaju dva susedna mehurasta ispupčenja na spoljnoj površini debelog creva. Na luminalnoj strani debelog creva poprečni žljebovi stvaraju polumesečaste grebene (*plica semilunares*)

-masne resice (*appendices epiplocae*) se nalaze duž uzdužnih traka, a predstavljaju peritonealne izvrate u vidu prsta na rukavici, koji su ispunjeni mašću.

Cekum, ascedentni i poprečni kolon imaju tri uzdužne pantljičke, a descedentni kolon i sigma dve. Na rektumu longitudinalni mišićni sloj ponovo obuhvata celu cirkumferenciju creva, tako da uzdužne pantljičke više ne postoje (24,32).

U ranim fazama embrionalnog razvoja debelo crevo je, osim rektuma, u potpunosti obavijeno peritoneumom. Ushodni i nishodni kolon se kasnije priljubljuju uz zadnji trbušni zid i postaju sekundarno retroperitonealni organi. Po završetku embrionalnog razvoja debelo crevo je delom intraperitonealan (slepo crevo i sigmoidni kolon), delimično sekundarno retroperitonealan (ushodni i nishodni kolon), a delom i subperitonealan organ (*rektum*) (32). Intraperitonealni delovi debelog creva imaju svoju peritonealnu peteljku. Ona ih spaja sa zadnjim trbušnim zidom i omogućava njihovu pokretljivost. Sekundarno retroperitonealni delovi debelog creva su nepokretni i vezani su za zadnji trbušni zid Toldt-ovim fascijama (31).

## 2.1.2 Histološka organizacija debelog creva

Najveći deo digestivnog sistema izuzev usne duplje se razvija iz primitivnog creva. Debelo crevo se razvija iz završnog dela srednjeg i zadnjeg creva, u drugoj polovini fetalnog razvoja. Derivati srednjeg creva su distalni deo duodenuma, jejunum, ileum, cekum, apendiks, ascedentni kolon i 2/3 transferzalnog kolona. Derivati zadnjeg creva su leva trećina transverzalnog kolona, descedentni, sigmoidni kolon i rektum. Oko 11,12 nedelje fetusnog života se javljaju tenije i haustre creva (32).

U zidu kolona se razlikuju četiri sloja: sluzokoža (*tunica mucosae*), podsluzokoža (*tunica submucosae*), mišićni sloj (*tunica muscularis*) i seroza (*tunica serosae*) (33). Sluzokoža se sastoji od lamina epithelialis koju čini jednorodni cilindrični epitel, u kome se nalaze enterociti sa rudimentiranim mikrovilima, endokrine ćelije i peharaste ćelije koje stvaraju sluz. Epitel formira uvratae (Lieberkühn-ove kripte) u podepitelni sloj koji se pružaju vertikalno na dole celom debljinom sluzokože, i svojim dnom dopiru do laminae muscularis mucosae (34). Dužina kripte je oko 500µm i u njima dominiraju peharaste ćelije. Peharastih ćelija ima sve više ka distalnom delu kolona, enterociti su prisutni na površinama između kripte, a enteroendokrine ćelije su retke i brojnije su u proksimalnim delovima debelog creva. Na dnu kripte se nalaze matične ćelije koje se konstantno dele, i čiji se „potomci“ diferenciraju u enterocite ili peharaste ćelije. Životni ciklus epitela traje od 2-4 a najviše 6 dana, a endokrinih ćelija oko 30 dana (35,36).

U podepitelnom sloju mukoze (*lamina propria*) se mogu naći oskudni limfociti, plazmociti,

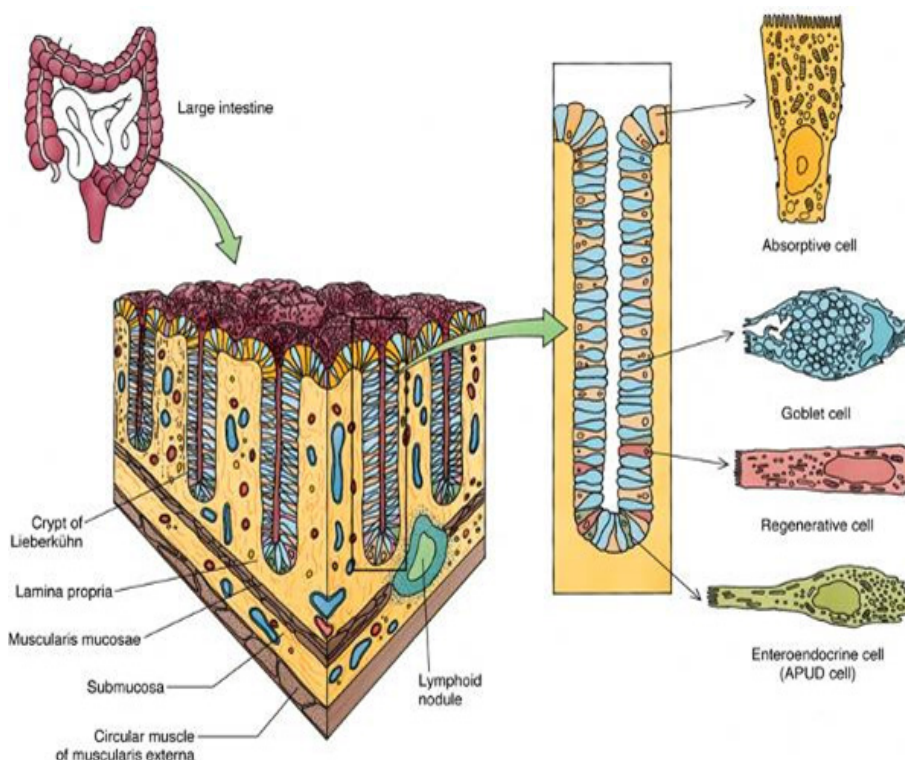
histiociti i mastociti. Ovaj sloj ne sadrži limfne sudove tako da maligni tumori ove oblasti ne daju limfogene metastaze sve dok ne infiltrišu submukozu. U podepitelu dominiraju vezivne ćelije, a tu su smešteni i neuroni i nervna vlakna submukoznog nervnog plexusa (*plexus submucosus Meissneri*). Ispod podepitela je tanak mišićni sloj (*lamina muscularis mucosae*) (34,35).

Podsluzokoža (*tunica submucosae*) je sastavljena iz rastresitog vezivnog tkiva u kome se nalaze krvni i limfni sudovi, submukozni nervni splet i dosta masnih ćelija (33).

Mišićni sloj (*tunica muscularis*) zida kolona koji ima dva podsloja glatkih mišićnih ćelija: longitudinalni, koji postoji samo kao deo tenija, i cirkularni podsloj, koji obuhvata ceo lumen kolona. Između ovih slojeva smešten je mienterički nervni plexus (*plexus myentericus Auerbachi*). Mišićni sloj prouzrokuje dve vrste crevnih kontrakcija: lokalne kontrakcije ili segmentacije i masivne peristaltičke kontrakcije (33).

Serozni sloj pokriva čitav kolon osim njegovog retroperitoneumskog dela. Sastoji se od vezivnog tkiva, prekrivenog jednim slojem mezotelnih ćelija, a ispod visceralnog peritoneuma postoje naslage masnog tkiva (*appendices epiploicae*) koje se nalaze pretežno duž tenija. (33,34).

Završno crevo-rektum je u svom gornjem delu građeno slično kao i ostali delovi debelog creva. Na njegovoj sluznici se umesto kružnih nabora nalaze tri do četiri polumesečasta nabora (*plicae transversales*). Liberkinove kripte su veoma duboke (600-800 µm ) i sadrže veliki broj peharastih ćelija (24).



Slika 2. Šematski prikaz histološke organizacije kolona  
(Izvor: Gulwani H:Colon nontumor histology,Pathology Outlines.com)

Na prelazu između rektuma i anusa, rektalni jednoredni cilindrični epitel prelazi u skvamozni anusni epitel bez orožavanja, a taj prelaz se naziva anorektalna linija. U donjem analnom delu rektuma

se izdvajaju tri zone: zona columnaris, zona intermedia i zona cutanea (35).

Zona kolumnaris sadrži 5-10 uzdužnih nabora sluznice, a u njima se nalazi mreža venskih sudova iz kojih krv ide u hemoroidalne vene (32,35). Kolumne se u donjem delu spajaju i obrazuju poprečne nabore od čije donje granice počinje zona intermedija. Zona intermedija je širine oko 1cm i čini prelaz između sluzokože i kože. Na njenoj donjoj granici nekeratinizujući skvamozni epitel prelazi u keratinizujući skvamozni epitel (epidermis) zone cutanee, a granična linija se naziva linea anocutanea. U zoni intermediji je submukoza takođe prožeta venama unutrašnjeg hemoroidalnog plexusa. U ovoj zoni se završava unutrašnji analni svinkter. Zona cutanea je predstavljena uskim pojasom oko analnog otvora i obložena je umereno orožalim i pigmentisanim epidermisom. U ovoj zoni se nalaze folikuli dlaka, lojne i znojne žlezde (34).

### 2.1.3. Funkcionalne karakteristike debelog creva

Osnovne funkcije debelog creva su: a) apsorpcija vode, elektrolita, vitamina i sekrecija sluzi čiji mucini uobličavaju vodenast sadržaj u suhu fekalnu masu, b) normalna bakterijska flora kolona ima važnu zaštitnu i metaboličku ulogu ovog organa, c) ima ulogu rezervoara, obzirom na deponovanje sadržaja u kolonu, d) transport i evakuacija neapsorbovanog fekalnog sadržaja (37).

U proksimalnom delu kolona (ushodni i poprečni kolon) se apsorbuje najveći deo tečnosti i elektrolita i nastaje bakterijska fermentacija. Distalni kolon (descendentni i rektosigmoidni) obezbeđuje uobličavanje fekalnog sadržaja i služi kao rezervoar pre defekacije. Maksimalni volumen rektuma kod zdravih osoba je oko 400 ml.(38).

Svoje funkcije kolon ostvaruje kroz procese sekrecije, apsorpcije, bakterijske fermentacije (digestije) i motorne aktivnosti (37).

Sluznica debelog creva sekretuje mukoidnu alkalnu tečnost, sačinjenu od vode i sluzi sa velikom količinom bikarbonatnih jona i enzima (50). Osnovni impuls za lučenje sluzi predstavlja kontakti nadražaj peharastih ćelija. Ovim se sprečava mehaničko oštećenje sluzokože creva pod dejstvom himusnog sadržaja i kiselina digestivnih bakterija. Epitel kolona ima i ekskretornu funkciju, čime se objašnjava izlučivanje teških metala (olovo, živa, bizmut itd.) pri trovanju (24).

Procesom apsorpcije i sekrecije tečnosti i elektrolita pomoću bakterijske flore kolona se dnevno proizvede oko 200 grama čvrstog fekalnog sadržaja. Apsorpcija se odvija u ascendentnom kolonu, mada se neke aminokiseline (poput triptofana) mogu u malim količinama apsorbovati kroz sluznicu kolona (38). U kolorektumu se nalazi veliki broj bakterija koje su kod zdrave sluzokože saprofiti. U slučaju narušenog kontinuiteta sluzokože brzo dolazi do izražaja njihova patogenost, naročito ako se nađu u ugrušcima krvi ili sekreta. Postoji mišljenje da su kolon i rektum glavno stanište *Bacteriodes fragilis*, bakterija koje su česti izazivači komplikacija u hirurgiji kolorektuma (25,30).

Bakterije kolona učestvuju u varenju hrane. One razgrađuju proteine, aminokiseline i žučne boje do produkata koji su odgovorni za miris i boju (indol, skatol, masne kiseline, vodonik-sulfid)

stolice. Osim *Clostridium Welchii* koja se u slučaju crevne opstrukcije razmnožava i može izazvati gangrenu kolona, ostale bakterije naseljene u kolonu obično nisu patogene jer ne sekretuju toksine. Međutim, pod dejstvom bakterijske flore kolona se stvaraju i neke važne materije poput vitamina K, vitamina V12, tiamina, riboflavina i dr (32,38). U kolonu postoje dvostruke peristaltičke kontrakcije- nepropulzivne i propulzivne.

Nepropulzivne kontrakcije su plitke, retrogradne i pendulske. One nastaju kontrakcijom tenija pri čemu se haustre naizmenično skupljaju i šire pa se tako presipa, meša i zadržava crevni sadržaj u segmentima čime je omogućen bolji kontakt sadržaja sa sluznicom i lakša apsorpcija. Propulzivne kontrakcije potiskuju crevni sadržaj sve do terminalnog dela debelog creva. Samo u kolonu postoji i treći tip kontrakcija („*mass movements*“) koje su refleksne, nastaju rastezanjem želuca i duodenuma i prenose se mienteričnim pleksusom. Zapaženo je da ove kontrakcije mogu da izazovu i nadražaj samog kolona, čime se delimično objašnjavaju dijareje u bolesnika sa ulceroznim kolitisom (24 32).

U fiziološkim uslovima kolon ima minimalnu digestivnu ulogu. Međutim, kod opsežne resekcije tankog creva u kolonu se, pomoću bakterijskih enzima, mogu razgraditi male količine skroba, belančevina i masti (32,37).

## **2.2. KOLOREKTALNI KARCINOM**

### **2.2.1. Epidemiologija**

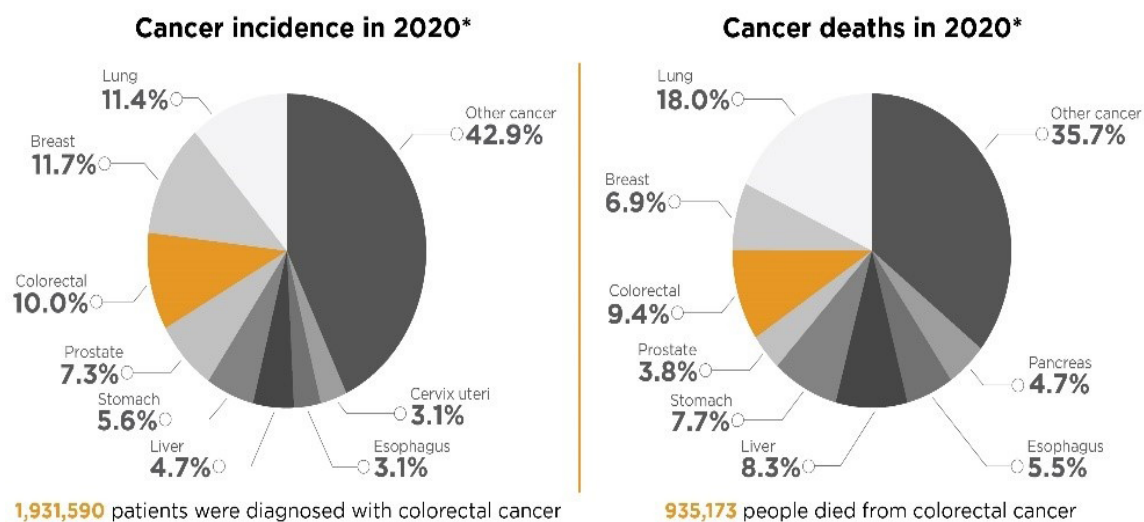
Kolorektalni karcinom je sa 1.360.602 novoobolelih i oko 700.000 smrtnih slučajeva, samo tokom 2012god., treći najčešće dijagnostikovani maligni tumor i četvrti vodeći uzrok smrti od malignih bolesti širom sveta. Incidenca kolorektalnog karcinoma je skoro tri puta veća u visoko nego u srednje i slabo ekonomski razvijenim zemljama (39,40).

Najveće stope obolevanja od kolorektalnog karcinoma se beleže u Mađarskoj, Sloveniji, Holandiji, Norveškoj, Australiji, Novom Zelandu, Severnoj Americi i Istočnoj Aziji (Japan i Republika Koreja). Incidenca kolorektalnog karcinoma je niska u većini regiona Afrike i Južne Azije (2). Postoji procena da će broj obolelih od kolorektalnog karcinoma do 2030. godine porasti za 60%, što će iznositi oko 2,2 miliona novih slučajeva i 1,1 milion smrtnih ishoda od raka kolorektuma godišnje (40).

U literaturi je istaknuto da se kolorektalni karcinom može smatrati pokazateljom socioekonomskog razvoja u zemljama u tranziciji, u kojima se zajedno sa ekonomskim promenama usvaja i zapadnjački način života (*western lifestyles*), što utiče da se stope incidence ravnomerno povećavaju sa porastom indeksa ljudskog razvoja (engl. Human Development Index-HDI) (2).

Kolorektalni karcinom je u Srbiji drugi najčešći maligni tumor. Tokom 2015. godine je samo u Centralnoj Srbiji registrovano 1947 novoobolelih muškaraca i 1247 novoobolelih žena. U istoj godini je kolorektalni karcinom sa stopom mortaliteta od 13.4% za muškarce i 10.1% za žene, predstavljao drugi najčešći uzrok smrti iza karcinoma pluća za muškarce i iza karcinoma dojke za žene (41).





Slika 3. Incidenca i mortalitet od kolorektalnog karcinoma u Svetu u odnosu na druge tumore (Izvor: GLOBOCAN 2020/IARC 2020)

Petogodišnje preživljavanje od kolorektalnog karcinoma je oko 60% u razvijenim zemljama i oko 40% u Brazilu i zemljama Istočne Evrope (42). Arnold i sar. 2017., su zapazili da poslednjih decenija postoji porast incidence i mortaliteta u baltičkim zemljama, Rusiji, Kini i u Brazilu, povećanje incidence ali smanjenje mortaliteta u Kanadi, Velikoj Britaniji, Danskoj i Singapuru i pad incidence i smanjenje mortaliteta u Sjedinjenim Državama, Japanu i Francuskoj (40). Ovi podaci govore u prilog činjenice da je, stalan program skrininga i ranog otkrivanja, poput onog u Sjedinjenih Državama, koji je sproveden tokom devedesetih godina, imao uticaja na smanjenje incidence kolorektalnog karcinoma i to za 3% godišnje kod muškaraca i za 2,3% kod žena (39).

Incidenca kolorektalnog karcinoma je veća kod muškaraca u odnosu na žensku populaciju (1,4:1), a više od 90% obolelih je starije od 55 godina kod oba pola (3). Kolorektalni karcinom se retko javlja ispod 40-te godine, a najčešće se dijagnostikuje u sedmoj deceniji života. Zapaženo je da sa godinama raste i rizik tako da je kod osoba životne dobi oko 80-85 godina rizik za nastanak ovog tumora 7-8 puta veći nego kod osoba starosti od 50-55 godina. Međutim poslednjih decenija se registruje povećana incidenca ovog tumora u mlađoj populaciji (43). Primećeno je da su kolorektalni karcinomi kod mlađih osoba najčešće posledica perzistirajućeg ulceroznog kolitisa ili nekog od FAP sindroma. Takođe je zapaženo da mlađe osobe češće imaju desnostranu lokalizaciju ovog tumora i čini se da učestalost rektalnog i rektosigmoidnog karcinoma raste kod pacijenata mlađih od 40 godina (44).

## 2.2.2 Faktori rizika za nastanak kolorektalnog karcinoma

Kolorektalni karcinom je multifaktorska bolest uzrokovana uzajamnim dejstvom genetskih, epigenetskih i faktora okoline. Faktori rizika za nastanak ovog tumora su klasifikovani u dve grupe: nepromenljive faktore rizika i promenljive, odnosno faktore rizika podložne prevenciji (1,40,42).

### **2.2.2.1. Nepromenljivi faktori rizika**

Nepromenljivi faktori rizika, koji nisu podložni prevenciji su: pol, starosna dob, rasna i etnička pripadnost, lična anamneza za polipozu i rak kolorektuma i inflamatorna oboljenja kolona (3,45).

#### **2.2.2.1.1. Pol i starosno doba**

Incidenca kolorektalnog karcinoma je oko 30% veća kod muškaraca nego kod žena, dok je mortalitet veći za oko 40%. Tako je u SAD incidenca karcinoma kolona 64/100000 za muškarce i 46/100000 za žene (46), dok je u Srbiji stopa incidence 33.5/100000 za muškarce i 21.6/100000 za žene (41). Postoji mišljenje da ovu razliku u incidenci uslovljavaju razlike u izloženosti faktorima rizika (konzumacija alkohola, pušenje cigareta, polni hormoni idr.) i interakcije između faktora rizika (46).

Uočene su razlike u lokalizaciji kolorektalnog karcinoma u odnosu na pol. Kod žena, odnos karcinoma kolona i karcinoma rektuma iznosi 3:1, a kod muškaraca 2:1. Takođe je zapaženo da je kod žena češća desnostrana lokalizacija kolorektalnog karcinoma (47,46).

Jedan od najznačajnijih faktora rizika za nastanak kolorektalnog karcinoma je životno doba pacijenta. Dokazano je da se rizik za nastanak ovog tumora povećava sa godinama starosti. Oko 91% novoobolelih i oko 94% umrlih ima više od 50 godina, dok je incidenca za pojavu kolorektalnog karcinoma 15 puta veća kod osoba preko 50 godina u odnosu na osobe starosti između 20 i 49 godina (48,49). Smatra se da sa godinama nastaje pad imunobiološke otpornosti organizma, što izaziva kumulacije mutacija koje uspevaju da izbegnu reper mehanizme i postaju žarište karcinogeneze (1,3).

Iako je zapaženo da učestalost kolorektalnog karcinoma u ukupnoj populaciji u SAD opada, što je posledica povećanja kolonoskopskog skrininga, ipak stopa kolorektalnog karcinoma raste među adolescentima i mladima (50). Zapaženo je da je 5.7% pacijenata sa novodijagnostikovanim tumorom mlađe od 45 god., a 20.5% mlađe od 55god. Kod osoba mlađih od 50 godina incidenca kolorektalnog karcinoma je u periodu od 2000. do 2013. godine porasla za 22%, uglavnom zbog tumora distalnog creva i rektuma (51). Siegel i sar. 2017. su izvestili da je u periodu od 1970. do 2014. god. u SAD umrlo 242.637 ljudi starosti od 20 do 54 godina, u srednjoj životnoj dobi od 49god (52). U našoj zemlji i u zemljama u okruženju se takođe uočava porast broja obolelih kod osoba mlađih od 40 godina (45).

#### **2.2.2.1.2. Rasna i etnička pripadnost**

Izveštaji o uticaju rasnih i etničkih razlika na incidencu i mortalitet kolorektalnog karcinoma su oskudni i kontradiktorni. Američka asocijacija za rak (American Cancer Society) je saopštila da su stope incidence i smrtnosti od kolorektalnog karcinoma u populaciji crnaca koji žive SAD 20-50% veće u odnosu na populaciju belaca i azijata (53). Međutim po izveštaju Siegel i sar. 2017. koji

su ispitivali stopu mortaliteta u periodu od 1970. do 2014. god se zapaža da su se stope smrtnosti od kolorektalnog karcinoma smanjile od 1970. kod crnaca starosti od 20-54. godine, a od 1995. god. porasle kod osoba bele rase u starosnoj dobi od 30-39 god. Po ovoj studiji stopa smrtnosti je u beloj populaciji porasla od 3.6% u 2004. na 4.1% u 2014. godini, dok se u crnoj populaciji smanjila od 8.1% u 1970. na 6.1 u 2014. godini (52). Važno je istaći da je veoma teško izdvojiti uticaj rasne pripadnosti na incidencu kolorektalnog karcinoma jer se različiti rasni obrasci sukobljavaju sa glavnim faktorima rizika koji su slični kod belih i crnih osoba (npr. gojaznost).

### 2.2.2.1.3. Pozitivna lična anamneza

U brojnim studijama je pokazano da nasledni faktori imaju važnu ulogu u razvoju kolorektalnog karcinoma. U odnosu na etiopatogenezu postoje nasledni i sporadični kolorektalni karcinomi. Sporadični karcinomi kolona čine 85-90% svih malignih tumora debelog creva. Genetski faktori nemaju presudan značaj u patogenezi sporadičnog kolorektalnog karcinoma kao kod naslednih formi, ali se smatra da je rizik za nastanak ovog tumora veći u osoba sa pozitivnim porodičnim anamnezama (49).

Nasledni kolorektalni karcinomi se javljaju u okviru različitih naslednih sindroma kao što su adenomatozni polipozni sindromi (FAP, Gardnerov sindrom, Turcotov sindrom), hereditarni nepolipozni kolorektalni karcinom HNPCC (Lynch I i II, Myrr-Torre sindrom), hamartomatozni polipozni sindromi, MAP sindrom (bilateralna mutacija DNK gena -hMYH) i porodični kolorektalni karcinom (54).

**Familijarna adenomatozna polipoza** (*Familial adenomatous polyposis*-FAP) se karakteriše prisustvom mnogobrojnih adenoma u svim segmentima kolona. Broj adenoma je varijabilan od 100 do preko 2500, prosečno više od 1000 koji pokrivaju površinu sluznice. Adenomi su različitog oblika i obično su manji od 1cm (1,3). Nosioци mutacije APC (Adenomatous Polyposis Coli) gena koja uzrokuje familijarnu adenomatoznu polipozu imaju 100% rizik za nastanak kolorektalnog karcinoma posle 40. godine (55).

**Gardnerov sindrom** je varijanta FAP sindroma, prenosi se autozomno dominantno. Karakteriše se adenomatoznom polipozom creva i ekstrakoličnim manifestacijama u vidu multipnih koštanih tumora lobanje, gornje i donje vilice i tumora kože i potkožnog masnog tkiva. Adenomi kod ovog sindroma su otkriveni i u nadbubregu, pankreasu i štitastoj žlezdi (1). Ukoliko se intestinalni polipi ne leče, u 100% slučajeva postoji mogućnost njihove maligne alteracije (56).

**Turcotov sindrom** predstavlja težak oblik FAP sindroma praćen pojavom malignih tumora mozga. Kod pacijenata sa meduloblastomom su otkrivene mutacije APC gena, dok su kod bolesnika sa glioblastomom multiforme zapažene mutacije hMLH1 i hPMS2 gena (57).

**Lynch sindrom.** U osnovi ovog sindroma (Hereditary nonpolyposis colon cancer syndrome, HNPCC) postoje visoko penetrantne genske mutacije nekog od gena „mismatch repair“ (MMR)

sistema (hMLH1, hMSH2, hMSH6, hPMS1, hPMS2) koji je neophodan za održavanje genomske stabilnosti i omogućuje korekciju replikacionih grešaka (1,58). Smatra se da osobe sa ovim sindromom poseduju oko 40-80% povećan rizik za nastanak kolorektalnog karcinoma (1,58).

Hamatomatozni polipozni sindromi (Peutz-Jeghers, Cowden sindrom i juvenilna polipoza) su odgovorni za oko 1% kolorektalnih karcinoma (59).

#### **2.2.2.1.4. Inflamatorne bolesti kolona**

U ovu grupu oboljenja spadaju ulcerozni kolitis i Kronova bolest (morbus Chron), za koje se ranije smatralo da predstavljaju manifestacije jedne iste bolesti. Danas se zna da se radi o dve različite bolesti koje se u oko 10-15% pacijenata ne mogu jasno izdiferencirati, budući da imaju brojne zajedničke osobine (60). Obe bolesti nastaju kod genetski predisponiranih osoba usled patološkog lokalnog imunskog odgovora usmerenog na normalnu crevnu floru (1,61). Osnovna razlika između ove dve bolesti je u tome što je ulcerozni kolitis negranulomatozno zapaljenje ograničeno na debelo crevo, a Kronova bolest je nekazeifikujuće granulomatozno zapaljenje koje može da se javi u bilo kom delu gastrointestinalnog trakta od jednjaka do anusa, ali najčešće u ileumu (3).

**Ulcerozni kolitis** započinje u rektumu i širi se proksimalno ponekad zahvatajući čitavo debelo crevo. Predstavlja sistemski poremećaj koji je kod nekih osoba povezan sa migratornim poliartritisom, spondilitisom, uveitisom, nodoznim eritemom i oštećenjima jetre (1,61).

Komplikacije ulceroznog kolitisa su toksični megakolon, perforacije kolona, krvavljenje, striktura kolona i karcinom koji se javlja u oko 30% bolesnika kod kojih je bolest počela u mlađoj životnoj dobi i traje duže od 15 godina (62).

**Kronova bolest** može da se javi na bilo kom nivou alimentarnog trakta, a smatra se da predstavlja sistemsko zapaljenjsko oboljenje koje pretežno zahvata gastrointestinalni sistem. Aktivna faza bolesti je praćena komplikacijama imunog sistema izvan creva (uveitis, migratorni poliartritis, nodozni eritem, urolitijaza, opstruktivna uropatija) (3).

Ova bolest se morfološki karakteriše postojanjem nekazeifikujućih granuloma i fistula. Granulomi se mogu naći bilo gde u gastrointestinalnom traktu. Zapaljenje je jasno ograničeno i transmuralno zahvata zid creva i oštećuje sluznicu. Osnovna karakteristika Kronove bolesti je jasna demarkacija obolelih segmenata creva od susednih zdravih, tako da se zdravi segmenti koji se nalaze između dva obolela segmenta (lezije „na preskok“ – skip lesion) (63).

Posledice zapaljenjskih promena su abdominalni apscesi, strikture creva, a retke ali pogubne komplikacije su masivno krvarenje u crevima, toksična dilatacija debelog creva i karcinom kolona (64).

Postoji mišljenje da ukoliko zapaljenjske bolesti kolona traju kraće od 10 godina nema rizika za razvoj kolorektalnog karcinoma, ali da ukoliko evolucija bolesti traje duže od 10 godina rizik raste za 0.5-1% svake naredne godine (59).

### **2.2.2.2. Promenljivi faktori rizika**

Promenljivim faktorima rizika ili faktorima rizika koji su podložni prevenciji pripadaju način ishrane, prekomerna telesna težina, fizička neaktivnost i konzumiranje alkohola i cigareta.

#### **2.2.2.2.1. Način ishrane**

Obzirom da je kolon u stalnom kontaktu sa produktima varenja različite epidemiološke studije ukazuju da način ishrane ima veliki značaj u kolorektalnoj karcinogenezi (1,65,66). Smatra se da visokokalorijska ishrana bogata crvenim mesom i mastima životinjskog porekla sa smanjenim unosom vlaknastih materija i smanjenom fizičkom aktivnošću dovodi do smanjene aktivnosti kolona sa opstipacijom, pa se na zidovima kolona duže zadržava himus iz koga različite toksične materije remete ekosistem creva i iritiraju crevnu mukozu (1,65).

Brojne studije su pokazale da unošenje velikih količina crvenog mesa koje je duži vremenski period bilo obrađeno na visokim temperaturama povećava rizik za nastanak kolorektalnog karcinoma. Pripremanjem mesa na visokoj temperaturi stvaraju se heterociklični amini i policiklični aromatični hidrokarbonati za koje se zna da imaju karcinogena svojstva (67,68). Sa druge strane crveno meso je bogato gvožđem koje je poznati prooksidans, tako da može povećati produkciju slobodnih radikala u kolonu. Slobodni radikali izazivaju oksidativni stres koji dovodi do nastanka ireverzibilnih promena u ćeliji ili povećava broj mutacija. Dalje, konzumiranjem crvenog mesa nastaje endogena sinteza N-nitrozo jedinjenja od kojih su mnoga kancerogena (69). Povećan unos belančevina može dovesti do fermentacije aminokiselina u debelom crevu i oslobađanja kancerogenog amonijaka (70). Chan i sar. 2011. su u svojoj meta-analizi pokazali da na svakih 100 grama dnevno konzumiranog crvenog mesa i mesnih prerađevina rizik za nastanak karcinoma kolona raste za 25%, a za karcinom rektuma 31% (69).

Važan faktor rizika za nastanak kolorektalnog karcinoma predstavlja i način pripreme hrane. Smatra se da je hrana pržena u vreloj masti, u masti korišćenoj više puta, sušenoj ili hrana pečena na roštilju predstavlja značajan faktor rizika zbog policikličnih ugljovodonika koji su priznati karcinogeni (71).

Hrana bogata mastima dovodi do povećanja holesterola i žučnih kiselina koje se u kolonu pod uticajem bakterijske flore transformišu u snažne karcinogene. Dalje se smatra da masti u ishrani promovisu inflamatorne procese za koje se zna da stimulišu nastanak i rast tumora (59,62). U vezi ovoga postoje eksperimentalni dokazi da zasićene masne kiseline srednjeg i dugog lanca (npr. stearinska, palmitinska i lanolinska) imaju proinflamatorne efekte tako da povećavaju rizik za nastanak kolorektalnog karcinoma. Sa druge strane je pokazano da nezasićene masne kiseline, poput oleinske, imaju antiinflamatorna svojstva pa smanjuju učestalost ovog tumora (72).

Zapaženo je da hrana bogata biljnim vlaknima smanjuje rizik za nastanak kolorektalnog karcinoma. Smatra se da biljna vlakna povećavaju volumen stolice, imaju sposobnost direktnog vezivanja za toksine iz fekalne mase i smanjuju vreme prolaska fekalne mase kroz kolon, čime je

skraćeno vreme kontakta karcinogena sa sluznicom kolona (73).

Dalje, bakterijskom fermentacijom biljnih vlakana nastaju masne kiseline kratkog lanca za koje se smatra da imaju antiinflamatorna svojstva pa se smanjuje rizik za nastanak kolorektalnog karcinoma. Zapaženo je da veći unos dijetetskih vlakana štiti od povećanja telesne mase i dijabetesa tip 2, pa se predpostavlja da je protektivno dejstvo dijetetskih vlakana posredovano boljom kontrolom telesne mase i smanjenjem insulinske rezistencije (74).

#### **2.2.2.2.1. Navike i način života**

Osim napred navedenih faktora rizika za kolorektalni karcinom, promenljivi faktori rizika obuhvataju gojaznost, nedovoljnu fizičku aktivnost, pušenje cigareta i konzumaciju alkohola.

**Gojaznost** nastaje kada je unos kalorija veći od energetske potrebe, u dužem vremenskom periodu, bez adekvatnog utroška energije. Osobe sa indeksom telesne mase (BMI) preko 30kg/m<sup>2</sup> se svrstavaju u gojazne osobe. Gojaznost je hronična bolest koja se manifestuje prekomernim nakupljanjem masti u organizmu i povećanjem telesne težine (75). U literaturi postoje ubedljivi argumenti koji pokazuju povezanost mnogih histogenetski različitih malignih tumora sa gojaznošću (76,77). Smatra se da gojazne osobe imaju čak 20% veći rizik za nastanak kolorektalnog karcinoma u odnosu na osobe sa normalnom telesnom masom (77). U gojaznih osoba se razvija tolerancija na insulin pa dolazi do povećanja cirkulišućeg insulina, što ima za posledicu povećanje insulinu sličnog faktora rasta tip 1 (Insulin like Growth Factor 1, IGF-I) koji stimuliše proliferaciju ćelija intestinalne mukoze (78).

**Nedovoljna fizička aktivnost** se poslednjih decenija ističe kao važan faktor rizika za nastanak kolorektalnog karcinoma. Smatra se da fizička aktivnost utiče na redukciju telesne težine i na smanjenje insulinske rezistencije (79), a postoji mišljenje da fizička aktivnost utiče i na povećanje motiliteta creva (80). Kirkegaard i sar. 2010, su pokazali da fizički aktivne osobe imaju za 23% manji rizik za razvoj kolorektalnog karcinoma u odnosu na fizički neaktivne osobe (81).

Postoji zapažanje da fizička aktivnost ima veći uticaj na redukciju kolorektalnih karcinoma proksimalne lokalizacije u odnosu distalno lokalizovane tumore. Takođe je zapaženo da fizička aktivnost ima veći uticaj na redukciju karcinoma kolona kod muškaraca nego kod žena (82).

**Pušenje cigareta i konzumacija alkohola.** U literaturi postoje dokazi o povezanosti pušenja cigareta sa čak 13 karcinoma različite lokalizacije, uključujući i kolorektalni karcinom (83). U duvanskom dimu je prisutno oko 4000 različitih toksičnih materija od kojih su mnoge karcinogene poput acetaldehida, benz-pirena, aromatičnih amina, N-nitrozamina i dr. Kod dugogodišnjih pušača nikotin i karcinogeni iz duvanskog dima izazivaju metilaciju DNK i mutaciju APC gena koji je odgovoran za očuvanje integriteta i funkciju kolonske mukoze (66,84,85). Postoji podatak da je oko 12 % smrtnih slučajeva od adenokarcinoma kolorektuma u vezi sa pušenjem (86). Zapaženo je da je povezanost karcinogena iz duvana sa nastankom kolorektalnog karcinoma učestalija kod žena (87).

Takođe je zapaženo da je konzumacija čak i umerenih količina alkohola povezana sa povećanim

rizikom za razvoj kolorektalnog karcinoma. U brojnim studijama je pokazano da ekscesivna konzumacija alkoholnih pića povećava rizik za nastanak kolorektalnog karcinoma za oko 23% (86,88), pri čemu je istaknuto da su metaboliti alkohola (acetaldehidi) karcinogeni za kolorektalnu sluznicu(89).

U literaturi je opisana i interakcija između konzumacije alkohola i duvana i kolorektalnog karcinoma. Postoje mišljenja da nikotin indukuje DNK-mutacije koje se teže popravljaju u prisustvu alkohola budući da alkohol pospešuje stvaranje slobodnih radikala i inhibiše reparativne enzime. Pored toga alkohol pomaže efikasniju penetraciju karcinogena u ćelije sluzokože kolona (89).

### **2.2.3. Kolorektalna karcinogeneza**

Kolorektalni karcinom je multifaktorska bolest uzrokovana interakcijom genetskih, epigenetskih i faktora okoline. Kao posledica „međuigre“ različitih onkogeni, supresornih gena i njihovih produkata sa faktorima okoline nastaje kolorektalna karcinogeneza (90,91). Ključna promena u karcinogenezi kolona, na molekularnom nivou, je gubitak genomske ili epigenomske stabilnosti. Obzirom da su ove alteracije prisutne u ranim neoplastičnim lezijama (aberantni kriptalni fokus i nazubljene polipoidne lezije) to se genomska i/ili epigenomska nestabilnost smatraju ranim događajem u kolorektalnoj karcinogenezi (91).

Akumulacija stečenih genetskih i epigenetskih promena ima za posledicu transformaciju normalne u malignu ćeliju sa metastatskim potencijalom (92). Mutacije gena i epigenetske aberacije dovode do aktivacije gena koji stimulišu ćelijsku proliferaciju ili njihovu zaštitu od apoptoze, aktiviraju onkogene i inaktiviraju tumor supresorne gene (90).

Genetska nestabilnost koja je glavna karakteristika kolorektalnog karcinoma može nastati kroz tri različita mehanizma: hromozomska nestabilnost (Chromosomal instability-CIN), mikrosatelitska nestabilnost (Microsatellite instability-MSI) i metilacija CpG sekvenci (CpG island methylator phenotype- CIMP) (90,92). Na ćelijskim događajima koji karakterišu ova tri puta karcinogeneze je bazirana molekularna klasifikacija kolorektalnih karcinoma, jer je svaki od ovih puteva definisan specifičnim genetskim i epigenetskim promenama, tipičnim kliničkim i histopatološkim osobinama i dovodi do raličitih fenotipa (93).

#### **2.2.3.1. Hromozomska nestabilnost (CIN) - mutacije u APC genu**

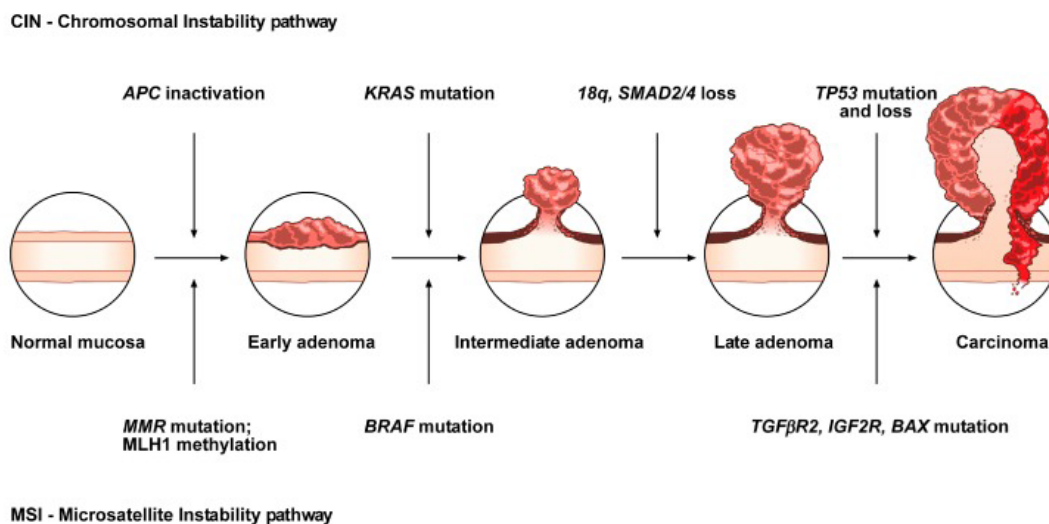
Hromozomska nestabilnost je najčešći mehanizam karcinogeneze i sreće se u oko 84% sporadičnih kolorektalnih karcinoma. Karakteriše se promenama u broju i strukturi hromozoma I hromozomskim rearanžmanima, uključujući delecije, translokacije, amplifikacije, insercije, aneuploidiju i gubitak heterozigotnosti najčešće za 5q21 (APCgen), 17p13(TP53gen) i 18 qLOH (DCC, SMAD2 i SMAD4 geni) (94).

CIN je poznata i kao adenom-karcinom sekvenca i povezana je sa aktivacijom KRAS

protoonkogeni i inaktivacijom najmanje tri supresorna gena (APC gen, p53 gen i gubitak heterozigotnosti hromozoma 18qLOH) (93).

Tumor supresorni APC gen normalno blokira tranziciju G<sub>1</sub> u S fazu ćelijskog ciklusa. APC gen ima važnu ulogu u Wnt-signalnom putu gde indukuje degradaciju β katetina, koji je važan faktor u regulaciji proliferativne aktivnosti epitelnih ćelija creva. Alteracije APC gena imaju za posledicu gubitak APC funkcije i akumulaciju β katetina u jedru epitelnih ćelija. β katetini aktiviraju transkripciju brojnih onkogeni (na pr. Cyclin D i MYC) koji pokreću ćelijsku proliferaciju u kriptama kolona i dolazi do stvaranja polipa (94,95). Inaktivaciju APC gena najčešće izazivaju germinativne i somatske mutacije. Somatske mutacije su opisane u 72% sporadičnih kolorektalnih karcinoma, u 30-70 sporadičnih adenoma i u oko 5% displastičnih aberantnih kriptalnih fokusa (ACF), dok se germinativne mutacije češće javljaju u FAP (95).

Najranije poznata prekancerozna lezija je aberantni kriptalni fokus (ACF), koji predstavlja prelaz između normalnog epitela i adenoma (91). Progresija ka adenomu ili ranom karcinomu je praćena aktivacijom KRAS protoonkogeni lociranog na 12p12 hromozomu, koji kodira KRAS protein od 21kD (94). Mutirani gen remeti funkciju KRAS proteina čime je omogućena aktivacija PI3K, AKT1 i AKT2 signalnih puteva koji stimulišu rast tumora promovišući epitelnu u mezenhimnu tranziciju (95). Mutacije KRAS gena su identifikovane u oko 30-50% kolorektalnih karcinoma i u oko 30% adenoma kolorektuma (96).



Slika 4. Konvencionalna adenom-karcinom sekvenca (Izvor: De Palma FDE, 2019)

Gen TP53, poznat kao „čuvar genoma“ ima značajnu ulogu u kontroli ćelijskog ciklusa. On kodira protein p53 koji izaziva zaustavljanje ćelijskog ciklusa u G<sub>1</sub> fazi i sprečava replikacije oštećene DNK. Ukoliko je reparacija DNK neuspešna, on aktivacijom apoptotičnih signala indukuje ćelijsku smrt. Gubitak ili mutacije TP53 gena imaju za posledicu gubitak funkcije kodiranog proteina, tako da ćelije neće biti zadržane na kontrolnoj tački, nego replikuju leziju na DNK i ona se prenosi na ćerke



ćelije koje su genetski nestabilne (97). Gubitak funkcije p53 je zapažen u 42,22% pojedinačnih i u 43,75 multiplnih kolorektalnih karcinoma (98).

Somatske mutacije gena TP53 su najčešće mutacije u humanim karcinomima. Smatra se da mutacije p53, tokom kolorektalne karcinogeneze, igraju ključnu ulogu u tranziciji adenoma u karcinom. Mutacije p53 se javljaju u 34% karcinoma debelog creva proksimalne lokalizacije i u 45% distalnih kolorektalnih karcinoma (97).

Hromozomska nestabilnost može biti izazvana i gubitkom heterozigotnosti hromozoma 18q LOH (Loss of Heterozygosity). LOH je definisan kao gubitak jednog od roditeljskih alela koji je izazvan mitotskim nerazdvajanjem, odnosno rekombinacijom dva homologna ili nehomologna hromozoma. Oko 70% kolorektalnih karcinoma pokazuje LOH u regionu gena DCC (Deleted in Colorectal Cancer, DCC) na lokaciji 18q21. DCC gen je „uslovni tumor supresorni gen“ i kodira veliki transmembranski DCC receptor od 200 kDa (94). Ligand za koji se vezuje DCC receptor je multifunkcionalni protein Netrin-1. Smatra se da Netrin-1 deluje kao selektivni mehanizam koji blokira apoptozu indukovanu DCC zavisnim receptorima. Netrin-1 se sekretuje u kriptama kolorektalne sluznice. Budući da se epitelne ćelije sluznice diferencijiraju i kreću ka površini, to se koncentracija Netrina-1 tokom diferencijacije ćelija sluznice smanjuje. Ovaj gradijent koncentracije Netrina-1 omogućuje normalne procese apoptoze i obnavljanja epitelnih ćelija sluznice kolona. Ukoliko je DCC gen mutiran, Netrin-1 se neće vezati za transmembranski receptor što rezultuje abnormalnim preživljavanjem ćelija (94,99). Na 18q21 hromozomu su pored DCC mapirani još i SMAD2 i SMAD4 geni, koji kodiraju signalne puteve za faktor transformacije rasta  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) (100).

U adenom-karcinom sekvenci su opisane i mutacije TGFBR (Transforming Growth Factor Beta Receptor) i PIK3CA (Phosphoinositide-3-kinase, catalytic, alpha) gena (94).

### **2.2.3.2. Mikrosatelitska nestabilnost (MSI)**

Za razliku od hromozomske nestabilnosti kod mikrosatelitske nestabilnosti nisu identifikovane promene u broju i strukturi hromozoma. Tumori koji nastaju ovim putem imaju oštećen mehanizam za reparaciju pogrešno uparenih baza u DNK. Za popravku pogrešno uparene DNK su odgovorni geni Mismatch Repair (MMR) sistema (101). MMR je ćelijski sistem koji uključuje mnogo proteina zaduženih za identifikaciju i popravku neusklađenih baza koje su nastale tokom replikacije DNK, genetske rekombinacije ili hemijskim i fizičkim oštećenjem. MMR geni kodiraju sledeće MMR proteine: MLH1, MLH3, MSH2, MSH3, MSH6 i PMS1 i Exo1. Proteini MMR sistema formiraju heterodimerne komplekse koji se vezuju za područja izmenjene DNK i započinju popravku (102). Na primer, MLH1 u toku aktivacije popravke regrutuje obligatnog partnera PMS2 na mesto popravke DNK i formira heterodimerni kompleks MLH1/PMS2. Ekspresija svakog proteina u heterodimeru zavisna je od ekspresije njegovog para. Ukoliko je MLH1 mutiran, gubi se iz heterodimernog kompleksa za popravku neusklađene DNK i u tom slučaju će i PMS2 biti odsutan iz proteinskog kompleksa. To se isto dešava i sa MSH2 i njegovim partnerom MSH6 (103,104). Inaktivacija nekog od ovih gena iz MMR sistema, usled somatskih i germinativnih mutacija ili epigenetskog prigušivanja rezultuje

poremećajem funkcije. Tako nastaje mutatorski fenotip poznat kao mikrosatelitska nestabilnost (MSI), koji se karakteriše rasprostranjenim polimorfizmom mikrosatelitskih sekcenci. Mikrosateliti obuhvataju 1-6 nukleotida koji čine oko 3% humanog genoma (102,105).

Mikrosatelitska nestabilnost je detektovana kod oko 13-16% sporadičnih kolorektalnih karcinoma, pri čemu najčešće nastaje gubitak MMR funkcije usled hipermetilacije MLH1 gena (106). MSI takođe predstavlja i glavnu molekularnu karakteristiku naslednog nepolipoznog kolorektalnog karcinoma (HNPCC) poznatog kao Linčov sindrom. Zapaženo je da osobe sa ovim sindromom razvijaju isključivo MSI kolorektalni karcinom, budući da sindrom nastaje kao posledica germinativnih mutacija i delecija u 19 gena uključujući i MLH1, MSH2, MSH6, PMS2, EPCAM, POLE i POLD1 (107,108).

Na bazi molekularnih obeležja kolorektalni karcinomi su podeljeni na mikrosatelitski stabilne i mikrosatelitski nestabilne tumore (103).

### **2.2.3.3. Metilacija CpG sekvenci (CIMP)-Epigenetski put**

Metilacija DNK je regulatorni mehanizam koji ćelije koriste da utišaju ekspresiju nekog gena, na primer gena za supresiju tumora. Konkretno kada se sekvenca CpG metilira u promotorskom regionu gena onda je transkripcija tog gena inhibirana. Aberantna hipermetilacija DNK se viđa u brojnim bolestima uključujući i karcinome (109).

Fenotip metilacije CpG sekvenci u kolorektalnom karcinomu je osobina koja izaziva epigenetsku nestabilnost hipermetilacijom promotera i utišavanjem gena za supresiju tumora, uključujući i MLH1, jedan od MMR gena (95). Zapaženo je da oko 40% genskih promotera sisara sadrži CpG sekvence koje su nemetilovane (110).

CIMP predstavlja poseban fenotip kolorektalnog karcinoma sa specifičnim kliničkim, patološkim i molekularnim karakteristikama. Za razliku od CIN i MSI, ovaj mehanizam kolorektalne karcinogeneze počinje od prekusornih lezija poznatih kao „sesilni nazubljeni adenomi/polip”i (sessil serrated adenoma/polyp) (111). „Zupčasti put“ je poseban put kolorektalne karcinogeneze jer je skup „zupčastih“ tumora koji steknu MSI povezan sa relativno brzim napredovanjem od prekursorske lezije do karcinoma. Karakteristična osobina ovog puta je V600E mutacija u BRAF genu. Zapaženo je da se ova mutacija javlja rano u „zupčastom putu“ i da indukuje aktivaciju MAPK-ERK puta sa posledičnom nekontrolisanom deobom ćelija. Takođe je zapaženo da je BRAF mutiran u većine „zupčastih adenoma“ i da su mutacije ovog gena retke u konvencionalnim adenomima (90). BRAF V600E mutacija je snažno povezana sa hipermetilacijom MLH1 gena u 20,3% neklasifikovanih i u 18,7% sporadičnih kolorektalnih karcinoma (112). Hipermetilacija MLH1 u MSI-sporadičnom kolorektalnom karcinomu je nađena u 83-100% slučajeva (95).

CIMP se može oceniti kao nizak (CIMP-L), visok (CIMP-H) ili negativan (CIMP-0), u zavisnosti od stepena istovremenih hipermetilacija koje se javljaju na nekoliko CpG sekvenci smeštenih u blizini

promotorskog regiona gena supresora (109). CIMP-H , koji se često lokalizuje u proksimalnom kolonu, češće se javlja kod žena i u starijem životnom dobu, pokazuje lošiju prognozu u poređenju sa CIMP-L i CIMP-0. Na molekularnom nivou CIMP-H je često MSI tumor i karakteriše ga inaktivacija WNT/ $\beta$ -catenin signalnog puta, visoka BRAF i niska stopa mutacija TP53 gena. CIMP-L je povezan sa KRAS mutacijama, a CIMP-0 karakterišu česte mutacije TP53 gena. U savremenoj dijagnostici se status hipermetilacije gena navedenih u CIMP panelima koristi kao biomarker za prognozu i procenu odgovora na hemoterapiju kolorektalnih karcinoma (109).

U različitim molekularnim subtipovima kolorektalnog karcinoma CIN, MSI i CIMP-karcinogeni mehanizmi se, ne retko preklapaju, što može imati prognostički značaj (113). Zapaženo je da CIN tumori pokazuju najveću učestalost za mutacije p53 gena, a najmanju za mutacije BRAF V600E. Sa druge strane MSI tumori su imali najučestalije mutacije BRAFV600E, a najmanju učestalost mutacija APC i KRAS gena (95). Klasifikacija tumora na bazi mutacija prisutnih u njegovom fenotipu ima važan prognostički i terapijski značaj (114).

## **2.2.4. Kliničke karakteristike kolorektalnog karcinoma**

### **2.2.4.1. Klinička slika**

Obzirom da ima dugu evoluciju kolorektalni karcinom u inicijalnom stadijumu može biti bez simptoma. Simptomi se javljaju podmuklo i često traju i godinama pre postavljanja dijagnoze, a tokom razvoja bolesti klinička slika najčešće zavisi od lokalizacije, veličine i proširenosti tumora (1,3).

Asimptomatski bolesnici često imaju okultna krvarenja, pri čemu količina krvi koja se pojavljuje u stolici raste sa porastom veličine i stepenom ulceracije tumora (115). Zbog krvarenja, često se kao prvi simptomi pojavljuju znaci anemije. Najčešći simptomi koji nastaju sa napredovanjem bolesti su malaksalost, umor, osećaj nadutosti, konstipacija, gubitak u težini, bol i palpabilna tumorska masa u abdomenu. U uznapredovanom stadijumu se javlja hepatomegalija, ascit, opstrukcija ili perforacija creva. Ukoliko dođe do infiltracije u okolne organe male karlice javljaju se genitourinarni simptomi pa i opstrukcija lumena rektuma (115).

Tumori lokalizovani u desnom kolonu su, zbog širokog lumena creva, dugo vremena bez simptoma. Najčešće se prezentuju okultnim krvarenjem, posledičnom anemijom, vrtoglavicom i dijarejom. Umor i slabost izazvana teškom anemijom mogu biti jedini simptomi, pa nekada i pre pojave simptoma, tumor toliko poraste da se može palpirati kroz trbušni zid (50).

Tumori sigme i descendentnog kolona najčešće izazivaju crevnu opstrukciju jer obično zahvataju celu cirkumferenciju creva. Najčešće se prezentuju abdominalnim kolikama koje obično naglo počinju sa progresijom jakih bolova koji se propagiraju duž kolona do mesta stenozе (tkz. Duvalove kolike). Kod ovih bolesnika se javljaju i promene u pražnjenju creva, pri čemu se učestalo pražnjenje malih količina crevnog sadržaja smenjuje sa konstipacijom. Usled suženog lumena creva stolica je suženog kalibra poput olovke (32,50).

Uzrok opstruktivnih simptoma mogu biti i karcinomi rektalne lokalizacije. Rektalni karcinomi se takođe prezentuju promenama u crevnom pražnjenju, koje se najčešće manifestuju smenom opstipacija sa tečnim stolicama. Mogu biti prisutni lažni pozivi na defekaciju i osećaj rektalne punoće. Bolovi predhode defekaciji i prezentuju se jakim kolikama (50). U kasnijoj fazi bolesti karcinomi rektalne regije mogu da infiltrišu mokraćnu bašiku, vaginu i okolne nerve, pa se prezentuju perinealnim ili sakralnim bolom (3).

U kliničkoj praksi postoje slučajevi kod kojih je rektalno krvarenje jedini manifestni simptom bolesti. U vezi sa tim, Thompson i sar, 2017 su istakli da rektalno krvarenje kod osoba iznad 60-te godine života utrostručuje sumnju na kolorektalni karcinom (116). Zapaženo je da se kod osoba sa gubitkom telesne težine, rektalnim krvarenjem i izmenjenim navikama defekacije udvostručuje verovatnoća za kolorektalni karcinom (117). Prisustvo palpabilne mase u abdomenu ili u ampuli rektuma sa velikom verovatnoćom ukazuje na bolest. Williams i sar 2016, su pokazali da palpabilna masa u rektumu u 80% , a u abdomenu u 41% slučajeva korelira sa kolorektalnim karcinomom (118).

Ne retko se kod bolesnika sa rektalnim krvarenjem dijagnostikuje hemoroidalna bolest ili se u slučajevima abdominalnog bola i promena u kalibru stolice pogrešno dijagnostikuje divertikuloza. Takođe se dešava da se promene u pražnjenju creva i abdominalni bol okarakterišu kao iritabilni crevni sindrom (115).

Svi kolorektalni karcinomi se direktno šire u okolne organe i metastaziraju limfnim i hematogenim putem. Najčešće metastaziraju u limfne čvorove, jetru, pluća i kosti, a kasnije se šire i u druge organe. U oko 25% do 30% pacijenata se, u momentu dijagnoze, bolest proširila izvan granica izlečivosti hirurškim putem (32).

#### **2.2.4.2. Lokalizacija i način rasta**

Način rasta-makroskopski obrazac rasta kolorektalnog karcinoma zavisi od faze u kojoj se tumor nalazi u trenutku kada se otkrije. U odnosu na način rasta kolorektalni karcinomi mogu biti egzofitični, ulcerozni, stenozirajući, difuzni i neklasifikovani (119).

Egzofitični (vegetantni) rast je obično karakteristika tumora lokalizovanih u desnom kolonu. Površina ovog tipa tumora je nodularna, lobularna ili papilarna, često sa fokusima ulceracije i nekroze. Tumorska masa raste intraluminalno, većih je dimenzija i mekane konzistencije i veoma retko dovodi do opstrukcije lumena (3).

Ulcero-infiltrativni rast se karakteriše tumorskom masom pečurkastog izgleda sa ulceracijom u centru. Tumor koji raste na ovaj način ima dominantno intramuralni rast i ponekad infiltruje čitavu debljinu zida kolorektuma (119).

Tumori koji imaju stenozirajući (anularni) način rasta su najčešće lokalizovani u levom kolonu, uglavnom su malih dimenzija sa bedemastim ivicama. Svojim rastom prožimaju čitavu cirkumferenciju zida, sa opstrukcijom lumena creva i mogućim razvojem ileusa. Često su nekrotičnog

dna i obično vrše invaziju u dublje slojeve zida. Ne retko je zid creva iznad stenozе proširen i istanjen pa je moguća njegova perforacija (32,119).

Difuzni tip rasta kolorektalnog karcinoma je označen kao „Linitis plastica“ jer je tumorskim procesom zahvaćen čitav zid creva, koji je zadebljan i rigidan zbog izraženih dezmodoplastičnih procesa (119).

Bez obzira na način rasta svi karcinomi debelog creva u kasnijim fazama evolucije infiltrišu čitavu debljinu zida (1).

Oko 50% svih kolorektalnih karcinoma se javlja u sigmoidnom delu creva, u desnom kolonu se lokalizuje oko 25%, u descendentnom oko 15% i u transverzalnom kolonu oko 10% karcinoma (50). Poslednjih decenija se javlja trend porasta broja karcinoma smeštenih u proksimalnom kolonu (120).

Približno oko 5% kolorektalnih karcinoma su sinhroni karcinomi, odnosno multipni tumori koji se javljaju na više lokacija u kolonu. Oko 30% karcinoma je udruženo sa kolorektalnom polipozom (50).

U literaturi postoje brojni dokazi koji potvrđuju prediktivni i prognostički značaj primarne lokalizacije kolorektalnog karcinoma (119,32,121,122).

Zapaženo je da kolorektalni karcinomi ascendentnog kolona i cekuma češće imaju egzofitični (vegetantni) način rasta, dok tumori transverzalnog i levog kolona češće rastu endofitično ili anularno (119).

Takođe postoji zapažanje da se tumori desne polovine kolona češće javljaju kod starijih osoba, kod crnaca i kod bolesnika sa divertikulima (32). Obično se inicijalno prezentuju anemijom i smanjenjem telesne težine, dok su promene u motilitetu creva i hematohesija češće početni simptomi tumora smeštenih u levom kolonu (32). Pacijenti sa tumorom u desnom kolonu su češće žene i starije osobe. Smatra se da su tumori desnog kolona češće loše diferentovani, češće metastaziraju u peritoneum, dok oni lokalizovani u levom kolonu češće daju metastaze u jetru i pluća, a i ukupno preživljavanje je gore nego kod tumora u levom kolonu. Ishrana sa malo vlakana, pušenje i preterano unošenje alkohola su obično povezani sa tumorima u levom kolonu (121,122).

Desno i levostrano lokalizovani kolorektalni karcinomi se razlikuju i po molekularno-genetičkim osobinama. Hromozomska nestabilnost je otkrivena u oko 75% karcinoma smeštenih u levom kolonu i u oko 35% karcinoma desnostrane lokalizacije (123). Mutacija RAS i BRAF gena i fenotip CpG sekvenci (CIMP), mutacije RAS i BRAF gena su zastupljenije u karcinomima desnog kolona (124). Postoji zapažanje da se učestalost mutacija KRAS / BRAF progresivno smanjuje od cekuma prema sigmoidnom kolonu (123). Sa druge strane u tumora lokalizovanim u levom kolonu se znatno češće javljaju mutacije u APC, KRAS, SMAD4 i TP53 genima (121). Pored toga tumori ove lokalizacije su povezani sa češćom prekomernom ekspresijom Vaskularnog endotelnog faktora rasta (VEGF-1), Epidermalnog faktora rasta (EGFR) i Receptora epidermalnog faktora rasta 2 (HER2), u odnosu na karcinome desnog kolona (121,125,126).

Različite kliničke i biološke osobine karcinoma lokalizovanih u desnom i u levom kolonu sugerišu da bi lokalizacija primarnog tumora mogla imati uticaja na prognozu bolesti. U opsežnoj meta-analizi Petrelli i sar. 2017., koja je obuhvatila 1,4 miliona bolesnika sa ranim i uznapredovanim kolorektalnim karcinomom je pokazano da su bolesnici sa primarnim tumorom smeštenim u levom kolonu imali 20% smanjen rizik od smrti u poređenju sa bolesnicima kod kojih je karcinomom lokalizovan u desnom kolonu (127).

## **2.2.5. Dijagnostičke procedure**

Za dijagnostiku kolorektalnog karcinoma se koriste brojne kliničke, endoskopske, radiološke i mikromorfološke procedure u cilju detekcije prisustva tumora i uzimanja uzorka za patohistološku verifikaciju tipa, bioloških i molekulogenetskih osobina tumora. Dijagnostika treba da pruži uvid u tačnu lokalizaciju i stepen proširenosti bolesti, a istovremeno da determiniše planiranje modaliteta lečenja (128).

### **2.2.5.1. Klinička dijagnostika**

Klinička dijagnostika kolorektalnog karcinoma obuhvata klinički, laboratorijski nalaz, endoskopski i radiološki pregled. Nakon kliničkih pregleda i histopatološke dijagnoze potrebno je sprovesti procedure pomoću kojih bi se utvrdila uznapređovalost bolesti, odnosno tačna lokalizacija i veličina tumora, stepen invazije zida organa, propagaciju tumora u mezenterijum, u limfne čvorove i identifikovati udaljene metastaze. Svi ovi parametri su neophodni kriterijumi na osnovu kojih se planira terapija kolorektalnog karcinoma (128). Klasična radiografska dijagnostika, kompjuterizovana tomografija (CT), multidetektorska kompjuterizovana tomografija (MDCT), CT kolonografija (CTC), magnetna rezonanca (MRI), endoskopski ultrazvuk (ERUS) i pozitronska emisiona tomografija (PET) imaju značajnu ulogu u dijagnostici karcinoma kolona.

#### **2.2.5.1.1. Anamneza, klinički i laboratorijski pregled**

Klinička dijagnostika počinje detaljnim uzimanjem anamneze. Porodična anamneza je važan faktor rizika za kolorektalni karcinom. Rizik za nastanak bolesti je 4 puta veći ukoliko neki rođak u prvom kolenu ima dijagnostikovani karcinom debelog creva pre 45. godine života (39). Rizik je najveći kod osoba kod kojih je više srodnika u prvom kolenu bolovalo od kolorektalnog karcinoma (129). Detaljno uzeta anamneza može da ukaže i na postojanje crevne opstrukcije. Nakon toga sledi fizikalni pregled koji obuhvata inspekciju, palpaciju i perkusiju abdomena. Inspekcijom je moguće otkriti meteorizam koji najčešće zahvata čitav abdomen, a palpacijom i perkusijom se može otkriti distenzija prednjeg trbušnog zida sa bolnom osetljivošću, uvećanje jetre i prisustvo ascitesa (50).

Obzirom da oko 15% bolesnika sa karcinomom rektuma ima akutnu distalnu opstrukciju debelog creva čiji su glavni simptomi izražena distenzija i bol u stomaku indikovani i digitalni

rektalni pregled kojim se otkriva rektalna masa koja je uzrok opstrukcije. Smatra se da dobro urađen digitorektalni pregled može da otkrije više od polovinu karcinoma rektuma (130).

U kliničkoj praksi se široko koriste testovi na prisustvo krvi u stolici koji su efikasni i senzitivni za dijagnozu kolorektalnog karcinoma: FOBT (engl. Fecal Occult Blood Test) i FIT (engl. Fecal immunochemical test). Oba testa imaju iste detekcione principe. FOBT otkriva krv u stolici detekcijom peroksidacije hemoglobina i mioglobina, a FIT detektuje humani globin metodom aglutinacije (131,132). Nedavno je objavljena meta-analiza o ukupnoj osetljivosti i specifičnosti FIT za otkrivanje kolorektalnog karcinoma bez obzira na stadijum. Prijavljeni ukupni nivoi osetljivosti su 77%–94% i specifičnosti od 85%–96% (133).

Pre hirurškog lečenja neophodno je uraditi kompletnu krvnu analizu i procenu funkcije jetre i bubrega. Radi procene težine i ishoda bolesti radi se određivanje nivoa Karcinoembrionalnog antigena (CEA) i CA 19.9 u serumu. Povišen nivo CEA je u korelaciji sa uznapredovanim karcinomom, odnosno povišen je kod bolesnika kod kojih je tumor probio zid creva, kod onih koji imaju slabije diferenciran tumor i kod onih kod kojih je došlo do diseminacije tumora (32). Sentitivnost CEA u ranim stadijumima bolesti iznosi 43-69%, a povišen serumski CEA se viđa i kod bolesnika sa hroničnim bolestima jetre i bubrega, karcinomom pluća, dojke, jajnika i prostate i dr. Povišene serumske vrednosti CA 19.9 su takođe povezane sa uznapredovanim kolorektalnim karcinomom (3,116,134).

#### **2.4.5.1.2. Kolonoskopija**

Kolonoskopija je endoskopska visokospecifična metoda za skrining, dijagnosiku i terapiju nekih bolesti kolona. U kliničkoj praksi se koristi od 1963. god. i ubrzo je postala primarna dijagnostičkih procedura („zlatni standard“) za otkriće karcinoma i prekanceroznih lezija kolona. Postoji mišljenje da je senzitivnost metode veća od 95% (135). Kolonoskopijom je omogućen pregled mukoze čitavog debelog creva i istovremeno uzimanje biopsije odgovarajućim forcepsima. Tokom kolonoskopije je moguće elektro disekcijom sa dijatermijskim omčama odstraniti polipe pa čak i karcinom u inicijalnom stadijumu, ukoliko ih endoskopista tokom pregleda vizualizuje (136).

Dijagnostičke indikacije za kolonoskopiju su: krvarenje iz digestivnog trakta, pozitivan FOBT ili FIT, sideropenijska anemija, hematohezija, neobjašnjiva dijareja koja traje dugo, patološki nalaz na drugoj dijagnostičkoj metodi koji ukazuje na defekt u punjenju ili strukturi zida creva, dijagnostika zapaljenjskih bolesti creva, skrining kod osoba sa rizikom za kolorektalni karcinom, porodična anamneza karcinoma ili adenomatoznih polipa i dr. (137,138,139,140). Terapijske indikacije za kolonoskopiju su: polipektomija, dekompresija kolona, plasiranje stenda kod stenotičnih neoplazmi, ekstrakcija stranog tela itd. (136,141).

Apsolutne kontraindikacije za kolonoskopiju su: akutni peritonitis, sumnja na perforaciju creva, akutni divertikulitis, sumnja na opstrukciju creva itd. U relativne kontraindikacije spadaju nedavni infarkt miokarda, poremećaji srčanog ritma, odmakla trudnoća, skorašnja operacija kolona (142).

Kolonoskopija je relativno neinvazivna procedura tokom koje su moguće uobičajene komplikacije koje obuhvataju perforaciju, krvarenje i bolove u truhu. Druge komplikacije su veoma retke 1 do 3 na 1000 pacijenata (143). Nedavno su opisane bakterijemija i infektivni endokarditis nakon kolonoskopije (144).

Uspeh kolonoskopije zavisi od veštine i stručnosti endoskopiste, od pripreme debelog creva, ranijih operacija u maloj karlici, prisustva divertikuloze, ranijeg peritonitisa i od starosti pacijenta koji se pregleda (140).

#### **2.4.5.1.3. Radiološke dijagnostičke procedure**

**Radiografija** abdomena je klasična bezkontrasna, radiološka procedura koja predstavlja prvi korak za procenu kliničkog statusa pacijenta sa kolorektalnim karcinomom. Karakteriše je visoka dijagnostička vrednost i brzo izvođenje, bezbolna je i ne zahteva posebnu pripremu. Najviše se koristi u slučaju hitnih hirurških stanja kao što su opstrukcija ili perforacija creva, prisustvo stranog tela u crevima, akutni abdomen itd. Standardna radiografija se koristi i za detekciju plućnih metastaza (145).

**Kompjuterizovana tomografija (CT)** (engl. Computerized Tomography, CT) je radiološka, neinvazivna dijagnostička procedura kojom se kombinacijom rada rendgena i kompjuterske obrade podataka dobijaju slike unutrašnjih organa, pri čemu se nastanak slike zasniva na fenomenu slabljenja H-zraka pri prolasku kroz telo. Doza zračenja kojoj je bolesnik izložen zavisi od dužine trajanja i od vrste pregleda, ali je znatno veća nego pri klasičnom rentgen snimanju (146).

Kompjuterizovana tomografija je vredna dijagnostička metoda za preoperativno stadiranje tumora, za postoperativnu procenu toka bolesti, detekciju recidiva i udaljenih metastaza (147). Obzirom da je ovom metodom moguće identifikovati i masivne venske invazije Nakajima i sar. 2015., sugerišu da CT može biti sentinelni znak udaljenih metastaza u bolesnika sa kolorektalnim karcinomom (148). Ne retko, CT je indikovano i u slučajevima akutnih komplikacija kolorektalnog karcinoma (149).

Senzitivnost CT je u ranoj preoperativnoj dijagnostici procenjena od 48 % -77%, ali bez mogućnosti procene dubine invazije zida creva (150). Takođe, ovom metodom je teško okarakterisati i male sekundarne depozite u jetri, koje u CT izveštajima nazivaju "too small to characterize" (pre mali da bi se okarakterisali), a koji se javljaju u 16,7%-25,9% CT pregleda kod bolesnika sa kolorektalnim karcinomom (151).

**Multidetektorska kompjuterizovana tomografija (MDCT)** se razlikuje od klasične kompjuterizovane tomografije po tome što je značajno smanjena izloženost zračenju. Visoka rezolucija sa debljinom preseka manjeg od 1mm i volumenskim trodimenzionarnim prikazivanjem omogućuje uvid u segmentnu građu i lokalizaciju tumora, a samim tim i značajno bolje stadiranje, a ima važnu ulogu i u praćenju pacijenata nakon operacije jer omogućava otkrivanje relapsa i komplikacija (152). Ova metoda pokazuje visoku specifičnost (93%) i senzitivnost (86%) za stadiranje tumora i specifičnost



od 87% i senzitivnost od 70% za identifikaciju intraperitonealnih depozita i metastaza u regionalnim limfnim čvorovima i jetri. Međutim kod bolesnika sa No i N<sub>1</sub> statusom limfnih čvorova mogućnosti MDCT su ograničene jer je identifikacija metastatskih depozita otežana (153).

**CT kolonografija (CTC)** ili Virtuelna kolonoskopija je postala popularna zbog brojnih studija koje pokazuju odlične kliničke performanse, neinvazivnost i ekonomičnost u skriningu za kolorektalni karcinom. Ova procedura ima znatno niži nivo emisije rendgen zraka od onog koji emituje CT, ali je istovremeno dovoljan za postizanje dijagnostičkih CT kolonografskih slika. Kod osoba koje imaju problema sa pripremom kolona moguća je CT kolonografija bez pripreme, jer i tada pokazuje dobru specifičnost i senzitivnost za lezije veće od 10mm (154,155). CT kolonografija omogućuje procenu ne samo kolona već i ekstrakolonskih organa poput jetre, pluća i dr. U jednoj studiji su koristeći ovu metodu identifikovali metastaze u jetri, plućne metastaze, mezenterične i mezokolične infiltrate i metastaze u limfnim čvorovima sa tačnošću od 93% (156). Trodimenzionalne (3D) slike omogućuju tačno sagledavanje veličine lezija i/ili identifikaciju metastaza (157). U studiji Pickhardt i sar. 2008., osetljivost CT kolonografije za adenomatozne polipe veće od 10mm iznosila je 93,8%, za polipe prečnika manje od 8 mm iznosila je 93,9%, a 88,7 % za polipe prečnika najmanje 6mm (157).

Osim navedenog CT kolonografija je korisna i u slučajevima nepotpune preoperativne kolonoskopije jer može da sagleda status debelog creva proksimalno od tumora, što se endoskopom ne može videti. Dalje CT kolonografija pruža važne informacije za preoperativnu procenu T stadijuma tumora kod bolesnika sa kolorektalnim karcinomom. Kolorektalni karcinom se prezentuje neravnom crevnog zida, posebno kod bolesnika sa uznapredovanim karcinomom. Deformacija crevnog zida je povezana sa mišićnom i subseroznom invazijom. Promene mekog tkiva oko crevnog zida poput nepravilnih izbočina u masno tkivo oko debelog creva su obično povezane sa T<sub>3</sub>/T<sub>4</sub> stadijumom tumora (154).

Magnetna rezonanca (MRI) i endorektalni ultrazvuk (ERUS) se široko koriste za T stadiranje tumora i ustaljene su procedura za preoperativno snimanje karcinoma kolona. Preoperativno stadiranje je ključna tačka za izbor operacije i neoadjuvantnu terapiju kod pacijenata sa karcinomom rektuma. U kliničkoj praksi se ERUS (engl. Endorectal Ultrasound) i MRI (engl. Magnetic Resonance Imaging) uglavnom koriste udruženo i tako dopunjuju kliničku procenu i rezultate biopsije (159).

MRI može vizualizovati laminarnu strukturu i pokazati detalje odnosa tumora sa okolnim organima. Prema kriterijumima i preporukama Američkog Kolegijuma za Radiologiju MRI i CT su suverene metode za T stadiranje pacijenata sa karcinomom kolona (159).

Uspostavljeni modaliteti za procenu integriteta rektalnog zida su endorektalni MRI i endorektalni ultrazvuk (ERUS), pri čemu MRI može razlikovati maligno tkivo od muscularis propria sa jasnim razgraničenjem mezorektalne fascije (154). Ove informacije određuju obodnu marginu resekcije za totalnu mezorektalnu eksciziju, koja uključuje resekciju rektuma i mezorektuma sa netaknutom mezorektalnom fascijom. Zapaženo je da je učestalost recidiva veća kod pacijenata sa pozitivnom resekcionom marginom (do 22%) u odnosu na one sa negativnom granicom resekcije kod kojih je recidiv nađen u 3%-5% slučajeva. Smatra se da je status resekcione margine značajno povezan sa udaljenom metastatskom bolešću i da je prediktor lokalnog recidiva i preživljavanja (160).

Senzitivnost MRI za T<sub>2</sub> karcinome rektuma iznosi 66,7%–90,9%, a specifičnost 87,5%–98,9%, dok su mogućnosti MRI u proceni diferencijacije između infiltracije tumora u mezorektalno masno tkivo i desmoplastične reakcije tkiva u slučaju T<sub>3</sub> rektalnih karcinoma ograničene (159,161,162). ERUS dijagnostička procedura je potvrdila odličnu dijagnostičku vrednost za T<sub>1</sub> karcinome rektuma, dok je najniža stopa osetljivosti zabeležena za T<sub>2</sub> tumore (76,6%), ali je njena osetljivost za procenu ranog T<sub>3</sub> stadijuma znatno bolja i iznosi 95,1% (159). Zapaženo je da kombinovana upotreba MRI i ERUS ima veće vrednosti osetljivosti i specifičnosti u svim stadijumima rektalnog karcinoma, a posebno za T<sub>3</sub> tumore, kada primenom ove dve metode senzitivnost iznosi 95,1%, a specifičnost 99,8% (159).

Brojne studije su izvestile o dijagnostičkim performansama MRI i ERUS za različite stadijume karcinoma rektuma, ali među njima postoje značajne razlike u metodološkoj analizi i rezultatima, posebno za T<sub>3</sub> stadijum kada postoji invazija zida rektuma i perirektalnog masnog tkiva (163,164,165).

**Pozitronska emisiona tomografija (PET)** je nuklearnomedicinska procedura koja za razliku od drugih vizualizacionih metoda (CT, MR, ERUS) ne vizualizuje anatomske strukture već primenom odgovarajućih radiofarmkoloških supstanci omogućuje uvid u biohemijske procese i funkcije na molekularnom nivou (166). Smatra se da je PET senzitivna dijagnostička metoda za detekciju metastatske bolesti u jetri, kada su u pitanju depoziti veći od 10mm u prečniku. Druga prednost PET je mogućnost diferencijacije benignih od malignih oboljenja (167). Kada su u pitanju metastaze u limfnim čvorovima postoji mišljenje da je PET senzitivnija metoda u poređenju sa CT, pre svega u slučajevima kada je dijametar limfnog čvora manji od 10mm. Senzitivnost PET sa smanjenjem veličine limfnog čvora opada ispod 50% (168). PET pokazuje veću dijagnostičku tačnost od CT i u detekciji peritonealnih metastaza koje su česte kod gastrointestinalnih i genitalnih karcinoma. PET je korisna dijagnostička procedura i u slučaju prisustva slobodne tečnosti kada može detektovati prisustvo malignih ćelija u ascitesu (169).

Kombinacija pozitronske emisije tomografije sa kompjuterizovanom tomografijom (PET/CT) ima veliki dijagnostički potencijal jer kombinuje imidžing metodu sa vizualizacionom metodom koja ima veliku rezoluciju (CT). Za razliku od tradicionalnih modaliteta dijagnostike, PET/CT može da pruži ne samo morfološke već i funkcionalne informacije (166). Izveštaji brojnih studija ukazuju da je senzitivnost PET/CT veća za oko 20% u poređenju sa samostalnom PET ili samostalnim CT (168).

U kliničkoj praksi se kombinovana PET/CT retko koristi u procesu postavljanja dijagnoze i stadiranja kolorektalnog karcinoma, ali poslednjih decenija ova metoda ima značajnu ulogu u lečenju metastaza u jetri, detekciji recidiva i praćenju efekata terapije (170).

### **2.2.5.2. Mikromorfološka dijagnostika**

Mikromorfološka dijagnostika obuhvata histopatološku dijagnostiku, histohemijsko, imunohistohemijsko, molekularnogenetičko i ultrastrukturno ispitivanje uzoraka tkiva.

#### **2.2.5.2.1. Patohistološka dijagnoza**

Patohistološka dijagnostika je jedna od najvažnijih karika kako u preoperativnom, tako i u

postoperativnom tretmanu bolesnika sa kolorektalnim karcinomom. Histopatološke informacije nakon analize uzoraka dobijenih endoskopskom biopsijom imaju značajan uticaj na planiranje operativnih modaliteta, dok je definitivna histopatološka analiza uzoraka tkiva dobijenih iz resekovanog segmenta kolona od izuzetne važnosti za prognozu bolesti i planiranje postoperativnih terapijskih protokola (32).

Definitivna patohistološka dijagnoza sadrži informacije o makroskopskim karakteristikama uključujući veličinu tumora, o prisustvu ili odsustvu perforacije, o histološkom tipu, histološkom gradusu, stepenu propagacije kroz crevni zid ili okolne organe (T status), o broju i zahvaćenosti izvađenih limfnih čvorova (N status), o limfnoj, vaskularnoj i perineuralnoj invaziji, o tumorskom pupljenju (tumor „budding“), o udaljenosti tumorskog tkiva od resekcionih margina (R status), o postojanju udaljenih metastaza (M status) (3,32). Pored toga u patohistološkom izveštaju treba da budu i podaci koji se odnose na mikromorfološke promene u tumorskoj stromi: prisustvo i količina tumor infiltrišućih limfocita, prisustvo dezmoplazije i nekroze (171).

#### 2.2.5.2.2. Histopatološki subtipovi kolorektalnog adenokarcinoma

U resekovanom segmentu debelog creva se u najvećem broju slučajeva nalazi konvencionalni adenokarcinom (oko 79% slučajeva) (172). Adenokarcinomi su sastavljeni iz epitelne komponente (koju čine tubularne žlezde) i okolne strome. Zbog uniformnosti izveštaja patohistologa, Svetska zdravstvena organizacija je predložila klasifikaciju po kojoj su maligni epitelni tumori debelog creva, na osnovu histološkog obrasca rasta, podeljeni na konvencionalne adenokarcinome, mucinozne, medularne, kribriformne, mikropapilarne „zupčaste“, „prstena pečatnjaka“, adenoskvamozne, skvamozne, neuroendokrine i nediferentovane karcinome (tabela1) (1,173).

Tabela 1. Histopatološka klasifikacija malignih epitelnih tumora kolorektuma

Histološka klasifikacija kolorektalnih karcinoma(C30, 2018)
Adenokarcinomi
-Adenokarcinom NOS
-Kribriformni komedo tip adenokarcinoma
-Medularni karcinom
-Mikropapilarni karcinom
-Mucinozni adenokarcinom
-Zupčasti adenokarcinom
-Signet ring cell karcinom
Adenoskvamozni karcinom
Skvamozni karcinom
Small cell neuroendokrini karcinom
Large cell neuroendokrini karcinom
Mešoviti neuroendokrini - ne neuroendokrine neoplazme
Nediferentovani karcinomi

Histološki podtip tumora nema nezavistan prognostički značaj, ali je izuzetak medularni karcinom koji je povezan sa mikrosatelitskom nestabilnošću koji ima povoljniju prognozu (173).

**Konvencionalni adenokarcinomi** su sačinjeni od umnoženih, iregularnih, tubularnih struktura koje su obložene atipičnim tumorskim ćelijama. U lumenu tubularnih struktura je često prisutana sluz i ćelijski detritus. Kod dobro diferentovanih tumora tubularne formacije su obložena epitelnim ćelijama bez izraženih znakova anaplazije (3). Više od 70% kolorektalnih karcinoma je niskog stepena diferencijacije, a obrazac za gradiranje tumora se bazira na zastupljenosti glandularnih struktura u tkivu tumora (119). Tumorsko tkivo gradi nodularne agregate koji su relativno dobro ograničeni u odnosu na zdravo tkivo (32). Kod dobro diferentovanih adenokarcinoma glandularne strukture su uglavnom obložene cilindričnim epitelnim ćelijama. Kod tumora slabije diferencijacije se smanjuje procenat cilindričnih, a povećava broj kubičnih i/ili poligonalnih ćelija. U mikroskopskoj slici konvencionalnog karcinoma mogu biti prisutne i Panetove ćelije, neuroendokrine i skvamozne ćelije (119). Na ivicama konvencionalnog adenoma često može biti prisutno i tkivo rezidualnog adenoma (174).

Nezavisno od stepena diferencijacije, ukoliko tumor invadira submukozu ili dublje slojeve zida kolona, dolazi do indukcije jake dezmozoplastične reakcije. Peritumorska limfocitna infiltracija može biti različitog intenziteta od slabe do jake (175).

**Mucinozni adenokarcinomi** čine 10%-20% dijagnostifikovanih adenokarcinoma. Karakterišu se prisustvom ekstraćelijskih mucina u preko 50% mase tumora. Zapažene su značajne razlike između konvencionalnog adenokarcinoma i mucinoznog adenokarcinoma, koje se ogledaju pre svega u tome što su mucinozni adenokarcinomi češće prisutni u kolonu nego u rektumu, češći su u ženskoj populaciji u mlađih osoba i predominantno su lokalizovani u proksimalnom kolonu (176). Mucinozni karcinomi imaju drugačije molekulogenetičke osobine u odnosu na druge adenokarcinome, što ukazuje na drugačiji mehanizam onkogeneze. Pre svega najočiglednija molekularna aberacija je prekomerna ekspresija MUC2 proteina. Mucinozni adenokarcinomi su povezani i sa velikom učestalošću mikrosatelitske nestabilnosti (MSI-H) (176). Ovi tumori su uglavnom velikih dimenzija i povezani su sa metastazama u regionalnim limfnim čvorovima i peritonealnim deponitima (177). Prognoza im je nešto lošija u odnosu na konvencionalne adenokarcinome (32)

**Medularni adenokarcinom** je retka neoplazma sa češćom lokalizacijom u desnom kolonu (122). U histološkoj slici dominiraju solidne plaže sačinjene od eozinofilnih poligonalnih ćelija sa velikim vezikularnim jedrima i prominentnim jedarcima. Oko tumorskih plaža, u stromi je prisutan gust limfocitni infiltrat (1,3). Česta lokalizacija ovih tumora je desni kolon. Bez obzira na stepen diferencijacije, medularni adenokarcinom ima bolju prognozu u odnosu na konvencionalni adenokarcinom. Knox i sar. 2015. su izvestili da je ukupna 5 godišnja stopa preživljavanja u grupi bolesnika sa medularnim adenokarcinomom iznosi 67,5% (178). Smatra se da pozitivan uticaj na prognozu ima visok nivo mikrosatelitske nestabilnosti (MSI-H) koji karakteriše ove tumore (179). Pored toga, u ovim tumorima su identifikovane i mutacije BRAFV600E- onkogene (180).

**Kribriiformni-komedo adenokarcinom** čini 7,3% kolorektalnih adenokarcinoma (181). Tumorske plaže grade velike kribriiformne žlezdane strukture sa centralnom nekrozom. U poređenju

sa drugim adenokarcinomima kribriformni subtip ima agresivnije biološko ponašanje i veću incidencu recidiva (182). Molekularni profil ovog tumora uglavnom pokazuje mikrosatelitsku stabilnost i aberantnu alteraciju CpG sekvenci. Najčešće se dijagnostikuje u uznapredovanom stadijumu kada se može konstatovati i prisustvo metastaza (1, 183).

**Mikropapilarni adenokarcinom** je redak subtip adenokarcinoma, a načešće se lokalizuje u cekumu i u rektumu. Tumor se histološki karakteriše malim papilarnim nakupinama ćelija kojima nedostaje centralno vlaknasto vaskularno jezgro, smeštene u lakunarnim prostorima koji podsećaju na proširene limfne sudove (184). Tumorske ćelije su male okrugle ili ovalne do poligonalne, nekada sa acidofilnom gramuliranom citoplazmom i jedrom sa prominentnim jedarcetom. Ćelije pokazuju umeren do visok polimorfizam i imaju obrnut polaritet (185). U cilju diferencijacije ovih struktura i ćelija karcinoma sa invazijom limfatika radi se imunohistohemija sa antitelima specifičnim na endotel, a negativna reakcija isključuje limfne sudove (186). Tumorske ćelije sekretuju glikoprotein MUC-1, koji je odgovoran za održavanje ćelijskog integriteta, zatim antigen epitelnih membrana (EMA) i vilin (184).

Ovaj subtip se češće javlja kod mladih osoba i ima lošiju prognozu od konvencionalnog adenokarcinoma. Kod brojnih bolesnika u vreme dijagnoze već postoje sekundarni depoziti u limfnim čvorovima ili udaljene metastaze (187).

**Zupčasi adenokarcinomi** (engl. *Serrated adenocarcinoma*) se najčešće javljaju u starijoj populaciji i uglavnom su lokalizovani u desnom kolonu. U njihovoj histološkoj slici dominiraju neoplastične, žlezdane formacije sa nazubljenom površinom. Žlezdane formacije su sačinjene od tumorskih ćelija sa jako eozinofilnom citoplazmom i bazalno postavljenim vezikularnim jedrima u kojima je uočljivo prominentno jedarce. Obično se radi o loše diferenciranim tumorima, sa tumorskim pupljenjem i sa oskudnim limfocitnim infiltratom i slabo izraženom nekrozom (188).

Zupčasti put neoplazije se razlikuje od konvencionalnog puta adenom-karcinom sekvence koja nastaje kao rezultat APC i KRAS mutacija. Nedavne studije su pokazale povezanost između sesilnog zupčastog adenoma i metilacije ili gubitka ekspresije proteina za gene zaduženih za obnavljanje DNK (MLH1, CpG ostrvskog metilatora i BRAF mutacije) (189). Mikrosatelitska nestabilnost (MSI) se takođe može otkriti i u sekvenci adenom-karcinom u zupčastom putu karcinogeneze. Zapaženo je da BRAF mutirani i mikrosatelitski stabilni (MSS) kolorektalni karcinomi imaju lošu prognozu i agresivan klinički tok (189,190,188).

**Karcinom sa ćelijama pečatnog prstena** (*Signet ring cell- carcinoma*) čini 0,9%-4% svih kolorektalnih karcinoma (191). Definisani su prisustvom više od 50% tumorskih ćelija nalik pečatnom prstenu. Signet ring ćelije u svojoj citoplazmi sadrže mucine koji potiskuju jedro na periferiju ćelije (1). Signet ring karcinom je povezan sa mlađim uzrastom, sa ženskim polom, sa uznapredovanim stadijumom, sa metastazama u limfnim čvorovima, peritoneumu i udaljenim metastazama u vreme dijagnoze. Češće su lokalizovani u desnom kolonu i agresivnog su biološkog toka (122,191).

Ovi tumori pokazuju visok stepen mikrosatelitske nestabilnosti (MSI), mutacije BRAF gena i nisku stopu KRAS mutacija. Smatra se da je viši stepen MSI u tumoru povezan sa boljim ishodom bolesti (192).

### 2.2.5.2.3. Histochemijske i imunohistochemijske osobine karcinoma kolona

Ukoliko ne postoji mogućnost korišćenja molekularnogenetičkih metoda za ispitivanje promena u genomu kolorektalnog karcinoma od praktičnog značaja je upotreba histochemijskih i imunohistochemijskih mikromorfoloških metoda. U suštini ovih metoda je da se, preko akumulacije i /ili gubitka ekspresije proteina kodiranih od strane određenog gena, posredno, sazna o eventualnim alteracijama gena koji kodiraju svoje proteine. Međutim treba naglasiti da mnoge genetske promene ne dovode do akumulacije kodiranog proteina, jer ponekad se pozitivna imunohistochemijska reakcija može javiti i u odsustvu mutacije gena. Na primer u jednoj studiji je mutacija TP53 gena nađena u 30% karcinoma dojke, dok je u istim tumorima imunohistochemijska akumulacija p53 proteina identifikovana u 37% slučajeva (193).

Danas postoji čitav spektar različitih markera za ispitivanje fenotipskih osobina kolorektalnog karcinoma, ali se u mikromorfološkoj dijagnostici najčešće koriste mucini, citokeratini, vilin, EGF, E-cadherin, VEGF, Ki67 idr (32 i još ?).

**Histochemijske osobine.** Svi kolorektalni karcinomi, nezavisno od histološkog subtipa, pokazuju pozitivno histochemijsko bojenje na mucine, koji su najzastupljenija komponenta mukusa. Na osnovu histochemijskih osobina se razlikuju neutralni (fukomucini), slabo kiseli (sijalomucini) i jako kiseli (sulfomucini). Mucini predstavljaju selektivnu barijeru na epitelnoj površini i učestvuju u ćelijskom prenosu signala (194). U superficijalnom epitelu zdravog kolona dominiraju jako kiseli mucini, dok se slabo kiseli mucini nalaze u tragu. Tokom kolorektalne karcinogeneze nastaju promene u strukturi i količini mucina koje rezultuju promenama barijerne funkcije i poremećajem signalne transdukcije. Ove promene utiču na ćelijsku proliferaciju, diferencijaciju, invazivnost i imunološku kontrolu (195).

Hipersekrecija slabo kiselih, sa redukcijom jako kiselih mucina se viđa već u adenoma-karcinoma sekvenci i u visokom procentu u invazivnim kolorektalnim karcinomima. Zbog toga otkriće alteracija u količini i kvalitetu mucina predstavlja vredan dijagnostički parametar (196). Histochemijski markeri alteracije mucina su histochemijske AB-PAS (Alcian Blue-Periodic Acid Schiff) metoda za markiranje neutralnih i kiselih mucina (neutralni mucini se boje purpurno crveno, a kiseli tirkizno plavo) i HID-AB (High Iron Diamine Alcian Blue) metoda za markiranje slabo kiselih i jako kiselih mucina (slabo kiseli se boje tirkizno plavo, a jako kiseli braon do crno)(197).

**Imunohistochemijske osobine.** U tumorskom tkivu je moguća i imunotipizacija mucinskih granula prisutnih u citoplazmi tumorskih ćelija. U rutinskoj imunohistochemijskoj dijagnostici se najčešće ispituje ekspresija MUC-1, MUC-2, MUC-3, MUC-5AC i MUC-6. U zdravom kolorektumu nije zapažena sekrecija MUC-1, MUC-5AC i MUC-6, dok je MUC-2 identifikovan u epitelnim ćelijama u dubokim delovima kripti (198).

MUC-1 i MUC-3 se najčešće eksprimiraju u konvencionalnim adeokarcinomima, a MUC-2 u mucinoznim karcinomima. MUC-5AC je obeležje pankreatobilijarnih karcinoma i ne eksprimira se u zdravom epitelu kolona, ali je prisutan u adenomu i kolorektalnom karcinomu (32). Bird i sar.

su pokazali visoku ekspresiju MUC-1 i MUC-5AC, nisku ekspresiju MUC-2 u konvencionalnim adenokarcinomima (199). Jass i sar. su u signet ring cell karcinomu kolona našli visoku ekspresiju MUC-2, a nisku ekspresiju MUC-5AC, što sugerije da su molekularni mehanizmi potpuno različiti kod konvencionalnog adenokarcinoma i kod signet ring cell karcinoma kolona. Međutim status MUC-1 je sličan između konvencionalnog i signet ring cell adenokarcinoma (198).

Ekspresija MUC-5AC u kolorektalnom karcinomu je povezana sa dobrom prognozom, odnosno pacijenti sa MUC-5AC pozitivnim tumorima imaju višu stopu preživljavanja od onih sa MUC-5AC negativnim tumorima (199). Sa druge strane ekspresija MUC-5AC u intrahepatičnom holangioadenokarcinomu je u korelaciji sa perineuralnom invazijom i uznapredovanom fazom bolesti (198).

Ekspresija MUC-1 je povezana sa dubinom tumorske invazije, sa povećanom učestalošću metastaza u regionalnim limfnim čvorovima, sa metastazama u jetri i sa udaljenim metastazama, što sugerije da je ekspresija MUC-1 u pozitivnoj korelaciji sa agresivnim kolorektalnim karcinomom i lošom prognozom (198).

MUC-2 se obično eksprimira u mucinoznim karcinomima kolona, pankreasa, dojke i jajnika. U konvencionalnim kolorektalnim karcinomima ima dijagnostički značaj ukoliko se koristi udruženo sa MUC-1 (200). Kolorektalni karcinom sa fenotipom MUC-1 + / MUC-2 je povezan sa peritumorskom limfocitnom infiltracijom pa postoji sugestija da MUC-2 u kolorektalnom karcinomu ispoljava imunosupresivne efekte (201).

Svi kolorektalni karcinomi su pozitivni na citokeratine (32), a najčešći imunofenotip je imunopozitivnost na citokeratin 20 (CK-20) i imunonegativnost na citokeratin 7(CK-7). Kod dobro diferentovanih kolorektalnih karcinoma identifikovan je visok nivo ekspresije CK-20 i nizak nivo ekspresije CK-7, dok je kod loše diferentovanih tumora prisutan nizak nivo ekspresije CK-20 i visoka ekspresija CK-7 (119). Utvrđeno je da normalna sluzokoža kolona ne eksprimira CK-7, ali je on detektovan u svim displastičnim ćelijama bez korelacije sa težinom displazije. Međutim sa progresijom u karcinom ovaj marker ponovo nestaje, ali se tokom dediferencijacije tumorskih ćelija ponovo pojavljuje (202). Bayrak i sar. su pokazali da je u kolorektalnom karcinomu ekspresija CK-7 povezana sa metastazama u limfnim čvorovima (203). Gurzu i sar. su zapazili da su svi mikrosatelitski stabilni (MSS), kolorektalni karcinomi bili imunonegativni na CK-7, dok su svi mikrosatelitski nestabilni (MSI) i sa BRAF mutacijama karcinomi bili difuzno pozitivni na ovaj marker. Takođe je zapaženo da je u visokom procentu MSS kolorektalnih karcinoma difuzno eksprimiran CK-20, dok kod BRAF mutiranih karcinoma nije detektovana ekspresija CK-20 (204).

Markeri CK-20/CK-7 u rutinskoj dijagnostici najčešće se koriste za diferencijalnu-dijagnozu metastaza kolorektalnog karcinoma i drugih tumora (204).

U diferencijalnoj dijagnozi mikropapilarnih od drugih subtipova kolorektalnih karcinoma se koristi antigen Vilin. Vilin je superficijalni glikoprotein koji je glavna komponenta citoskeleta i deluje u zatvaranju, razdvajanju i vezivanju aktinskih filamenata. Ekspirimira se na apikalnoj/luminalnoj

površini epitela u zdravoj sluznici kolona i u kolorektalnom karcinomu (205).

Visok nivo ekspresije Viliina se identifikuje na spoljnim granicama klastera u kojima se nalaze nakupine tumorskih ćelija, pokazujući tako obrnuti polaritet tumorskih ćelija što je ključna karakteristika mikropapilarnog subtipa (206), koji je agresivna varijanta kolorektalnog karcinoma i povezan je sa lošom prognozom (32,187). Obzirom da mikropapilarni subtip adenokarcinoma ima veće stope recidiva i metastaza važno je pravovremeno ga diferencirati od ostalih subtipova kolorektalnih karcinoma (3).

Sledeća grupa molekula koja je povezana sa invazivnošću i metastaziranjem su  $\beta$ katenin i E-cadherin. Poremećaj ekspresije  $\beta$  katenina se detektuje tokom čitave adenom-karcinom sekvence jer je povezan sa APC proteinom (32). Pokazano je da je gubitak membranske ekspresije  $\beta$  katenina povezan sa kraćim preživljavanjem i lošim ishodom kolorektalnog karcinoma (207).

U brojnim studijama je pokazano da redukcija ili gubitak E-cadherina rezultuje poremećajem strukture citoskeleta, čime je omogućeno odvajanje ćelija od tumora i povećanje ćelijskog motiliteta (208,209).

Ekspresija E-cadherin-a je u inverznoj korelaciji sa dubinom invazije, vaskularnom i invazijom limfatika, metastazama u limfnim čvorovima i udaljenim metastazama. Takođe se sugeriše da je redukovana ekspresija ovog proteina u korelaciji sa slabom diferencijacijom tumora(210).

Značajan prognostički faktor kolorektalnog karcinoma je angiogeneza od koje zavisi rast, progresija, invazija i metastaziranje tumora. Jedan od najpotentnijih stimulatora angiogeneze je Vaskularni endotelijalni faktor rasta (VEGF). Sekretuje ga veliki broj ćelija uključujući i tumorske ćelije. On je mitogen za endotelne ćelije i njegova ekspresija je u korelaciji sa rastom krvnih sudova (211). Imunohistohemijska detekcija ekspresije VEGF u biopsijskim uzorcima tumorskog tkiva je vredan prognostički parametar, jer je visoka ekspresija ovog markera povezana sa lošom prognozom i kraćim preživljavanjem bolesnika sa kolorektalnim kacinomom (212).

Zahvaljujući intenzivnom proučavanju angiogeneze, razvili su se brojni modeli anti-angiogene „target“ terapije kolorektalnog karcinoma. Danas se u terapiji metastatskog kolorektalnog karcinoma koristi anti-VEGF monoklonsko antitelo (Bevacizumab) sa značajnim poboljšanjem preživljavanja. Ovo antitelo smanjuje gustinu krvnih sudova i perfuziju krvi u tumorsko tkivo, što rezultuje supresijom tumorskog rasta (213).

#### **2.2.5.2.4. Molekularnogenetičke i ultrastrukturne osobine kolorektalnih karcinoma**

***Molekularnogenetičke osobine.*** Poslednju deceniju, u kojoj naučna javnost i klinička praksa snažno podržavaju ciljanu terapiju kolorektalnih karcinoma, mikromorfološki dijagnostički protokoli obuhvataju i molekulogenetička ispitivanja biopsijskih uzoraka tumorskog tkiva (214).

U kontekstu ciljane terapije tumora i selekcije bolesnika za anti-EGFR terapiju, u mnogim



laboratorijama se identifikuje ekspresija epidermalnog faktora rasta (EGF) u tumorskom tkivu (215).

EGF je ligand epidermalnog faktora rasta receptora (EGFR-HER1), a interakcija EGF/EGFR je važna karika koja utiče na neoplastičnu transformaciju, proliferaciju, izbegavanje apoptoze, produženo preživljavanje kancerskih ćelija i angiogenezu (216). Zapažena je povezanost aberantne ekspresije EGFR sa metastazama u limfnim čvorovima i preživljavanjem, ne samo u bolesnika sa kolorektalnim karcinomom, već i u bolesnika sa karcinomom pluća, dojke i jajnika. Terapija sa anti-EGFR monoklonskim antitelom se veže na receptor epidermalnog faktora rasta (EGFR) i koči aktivaciju glavnih signalnih puteva uključenih u kolorektalnu karcinogenezu (217).

U više od 95% kolorektalnih karcinoma prisutna je ekspresija karcinoembrionalnog antigena (CEA) (32). Normalno je prisutan u fetalnom tkivu creva, gde je lokalizovan na površini ćelijske membrane. Njegov poluživot u cirkulaciji se kreće od jednog do osam dana, a metaboliše se u jetri. Obzirom da postoji korelacija između ekspresije CEA u tkivu kolorektalnog karcinoma i njegovih vrednosti u serumu to je CEA preporučeni marker za praćenje bolesnika nakon kurativne resekcije (32). Konstantno povišen CEA posle resekcije je siguran znak recidiva (218), a osim toga i preoperativno povišene vrednosti ovog markera su povezane sa lošom prognozom i recidivom (219). Nedavni izveštaji Khan i sar. 2020., ukazuju da ukupna osetljivost povišenih preoperativnih vrednosti CEA u predviđanju recidiva iznosi 94,4%, a specifičnost 32,4% (218).

Američki Komitet za rak (engl. The American Joint Committee on Cancer - AJCC) je, u poslednjem, osmom izdanju TNM klasifikacije tumora uključivanjem bioloških i molekularnih markera imao cilj da se pređe sa tradicionalnog pristupa na savremeniji, „personalizovani“ pristup koji nije relevantan samo kao sistem klasifikacije već je podjednako koristan i za određivanje individualne terapije (214,220). Identifikacija mikrosatelitske nestabilnosti (MSI) u kolorektalnom karcinomu ima važnu ulogu u skriningu Linčovog sindroma, prognostički je marker za ishod bolesti i prediktivni marker za odgovor na hemo- i imunoterapiju (134).

Mikrosatelitska nestabilnost (MSI) nastaje usled grešaka u postreplikativnoj popravci pogrešno uparenih baza (mismatch repair system), koje nastaju tokom sinteze DNK, što izaziva ogroman porast broja mutacija (čak oko desetine hiljada) i nastaju promene u veličini ponavljajućih sekvenci nukleotida (mikrosatelitima). MSI se ispituje RT-PCR (Reverzna Transkriptaza-Lančana reakcija polimeraze) testom (221). Otkriva se upoređenjem dužine ponavljajućih nukleotida u ćelijama tumora i u normalnim ćelijama. Standardni dijagnostički postupak koji preporučuje Nacionalni institut za rak (SAD) uključuje analizu tumora i zdravih tkiva pomoću pet mikrosatelitskih markera (Bethesda panel) koji obuhvata dva mononukleotida (BAT26 i BAT25) i tri dinukleotida (D2S123, D5S346 i D17S250) (104).

Prema procentu lokusa MSI uzorci se mogu klasifikovati kao mikrosatelitska nestabilnost (MSI-H) ili (MSI-L) i mikrosatelitska stabilnost (MSS). Fenotip definisan kao MSI-H ima dva ili više markera koji pokazuju nestabilnost (ili > 30% nestabilnih markera). Kod MSI-L fenotipa samo jedan od pet markera pokazuje nestabilnost (ili 10%– 29% markera pokazuje nestabilnost), dok se MSS karakteriše odsustvom markera nestabilnosti (222). Postoji mišljenje da MSI-L tumori imaju

agresivnije biološko ponašanje u odnosu na MSI-H tumore. Mikrosatelitski nestabilni karcinomi (tkz. mutatorski put nastanka tumora) su hromozomski stabilni sa izraženim promenama mikrosatelitskih sekvenci DNK. Mikrosatelitski stabilni karcinomi (tkz. supresorni put karcinogeneze) su hromozomski nestabilni, aneuploidni i sadrže grube hromozomske promene (222).

MSI se nalazi u osnovi Linčovog sindroma i prisutna je u oko 95% pacijenata (223). MSI se javlja u oko 15% sporadičnih kolorektalnih karcinoma, a njen uzrok je oko 95% slučajeva funkcionalni gubitak MLH1 koji nastaje kao rezultat metilacije promotora (104).

Tumori sa MSI fenotipom su češće lokalizovani u desnom kolonu, histopatološki se odlikuju mucinskim osobinama, lošom diferencijacijom i bogatom limfocitnom infiltracijom (Crohn-like reakcija), medularnim obrascem rasta. Sporadični tumori se tipično javljaju kod starijih pacijenata, dok se oni u sklopu Linčovog sindroma češći kod osoba mladih od 50 godina (104,105).

Zahvaljujući boljem razumevanju mehanizama karcinogeneze identifikacija APC, KRAS, BRAF statusa je postala neophodan korak u planiranju terapije, posebno kod bolesnika sa metastatskom bolešću (224,225). Pored toga, identifikacija genskih alteracija može biti prediktor progresije bolesti, uključujući rani recidiv i mortalitet (226).

Gen APC kodira protein od 310 kDa koji se sastoji od 2840 aminokiselina i obuhvata 21 ekson i svoje akcije ostvaruje preko Wnt-signalnog puta (227, 228). Oko 75% kodirajuće sekvence se nalazi na eksonu 15 koji je najčešći region za polne i somatske mutacije. Mutacije zametnih linija u APC genu rezultuju familijarnom adenomatoznom polipozom (FAP). Somatske APC mutacije nađene su u više od 80% sporadičnih kolorektalnih karcinoma, a gubitak heterozigotnosti (LOH) hromozoma je nađen u 30%-40% karcinoma kolona (229). Mutacija APC tumor supresornog gena je rani, a možda i inicijalni događaj koji se viđa gotovo samo u kolorektalnoj karcinogenezi. Prisutne su i u prekanceroznim lezijama (230). Mutacije APC gena uzrokuju skoro potpuni gubitak APC proteina (229).

Novija istraživanja pokazuju da restauracija APC pokreće regresiju tumora i ponovo uspostavlja homeostazu kripi u kolorektalnom karcinomu, potvrđujući Wnt-signalni put kao terapijsku metu za lečenje kolorektalnog karcinoma. (227,231,232)

KRAS je član RAS protoonkogenske familije GTP. Normalan KRAS protein, kodiran od KRAS gena, ima funkciju u prenosu signala i kontroli proliferacije i diferencijacije kod zdravih tkiva (233). Mutacije KRAS gena su povezane sa ponovnom pojavom metastatskog kolorektalnog karcinoma nakon kurativne resekcije, kao i sa ukupnim preživljavanjem nakon metastazektomije. Mutacije KRAS gena su češće kod karcinoma kolona nego kod karcinoma rektuma, a ukoliko su udružene sa mutacijama tumor supresornog p53 gena predstavljaju jako negativan prognostički faktor (234,235).

Protoonkogen BRAF preko RAS-RAF-MEK-ERK signalnog puta reguliše ćelijsku transkripciju (236). Mutacija BRAFV600E se javljaju u oko 5%-25% pacijenata sa kolorektalnim karcinomom. BRAFV600E je aktivirajuća mutacija koja čini oko 90% svih BRAF mutacija viđenih

u kolorektalnom karcinomu (237). Obično je povezana sa smanjenim preživljavanjem i do 50% u odnosu na bolesnike sa BRAF „wild“ tipom (225 224, 238).

Mutacija TP53 je drugi ključni genetski korak u kolorektalnoj karcinogenezi koji se preklapa sa prelaskom velikih adenoma u karcinom usled aktivacije Wnt-signalizacije kroz APC somatske mutacije (239). Kod zdravih tumor supresorni gen TP53 kodira sintezu multifunkcionalnog p53 proteina (240). Osim uloge transkripcionog faktora i „čuvara genoma“ p53 svoju tumor supresornu aktivnost ispoljava i kroz sposobnost da moduliše ćelijsku migraciju. Gubitak funkcije p53 povećava motilitet ćelija što doprinosi invazivnosti tumora (241).

TP53 je među pet najčešće mutiranih gena, pri čemu njihova učestalost zavisi od vrste karcinoma (1). Kod tumora endokrinih žlezda se javljaju u oko 14 %, dok su kod sporadičnog kolorektalnog karcinoma nađene u oko 40%-50% slučajeva. Mutacije TP53 su u korelaciji sa limfnom invazijom u proksimalnom kolorektalnom karcinomu i pokazuju značajnu povezanost sa limfnom i vaskularnom invazijom u karcinomu kolona distalne lokalizacije. Ovakvi pacijenti uglavnom imaju loš ishod bolesti. Brojni izveštaji ukazuju da su mutanti p53 stabilizovani u solidnim tumorima i da su odgovorni za tumorsku progresiju. U eksperimentu na miševima je pokazano da obnova funkcije p53 divljeg tipa može da indukuje brzu regresiju tumora (242), tako da glavne strategije ciljane terapije uključuju obnavljanje divljeg p53, razgradnju p53 mutanta i gašenje srodnih onkogenih p53 (239).

**Ultrastrukturalne osobine.** Dominantan ultrastrukturni nalaz u ćelijama kolorektalnog karcinoma su velike vakuole, okružene dvostrukim membranama koje sadrže ostatke kristi, što sugeriše da vode poreklo od mitohondrija. Ove vakuole zauzimaju relativno veliki deo citoplazme u kojoj se nalazi jedro sa zgusnutim granulama raspoređenim po njegovoj periferiji. Jedarca su velika i nekada ih ima više. Takođe karakterističan ultrastrukturni nalaz je oskudna RNK u granulama i fragmentima endoplazmatskog retikuluma (243). Na površini epitelnih ćelija se nalaze mikroresice koje su u dobro diferentovanim tumorima nalik normalnom epitelu. Kod tumora slabije diferencijacije ove strukture su široko razmaknute i zaravnjene površine (32).

U protokolu mikromorfološke dijagnostike tumora nije predviđeno ultrastrukturno ispitivanje uzoraka resekata. Elektronska mikroskopija se, zbog složene obrade preparata i iz komercijalnih razloga, uglavnom koristi samo u istraživačke svrhe.

#### **2.2.5.2. Patološki prognostički faktori**

Poslednjih decenija su identifikovani brojni prognostički i prediktivni faktori na osnovu kojih je moguće predvideti tok bolesti, izdvojiti pacijente sa agresivnim kliničkim tokom i uraditi odabir najpovoljnije strategije lečenja, pri čemu ekspresija i/ili serumski nivoi brojnih biomarkera ukazuju na fenotipske osobine tumora, pojavu recidiva i dužinu preživljavanja (32,224,229). Patološki prognostički faktori imaju značajnu ulogu u izboru terapijskih modaliteta, a pre svega u individualizaciji tumorskog tretmana (216,220 229, 236-239).

Dug vremenski period je patološki stadijum bolesti baziran na anatomskoj proširenosti tumora istican kao jedini nezavistan prognostički faktor. Međutim, zapaženo je da mnogi bolesnici u istom

stadijumu bolesti nemaju istu dužinu preživljavanja posle terapijske resekcije (244), što govori u prilog toga da stadijum bolesti ne odražava u potpunosti individualno biološko ponašanje tumora. Zbog toga su Američki Komitet za rak (American Joint Committee on Cancer-AJCC) i Međunarodno udruženje za kontrolu raka (International Union Against Cancer-UICC) svoje preporuke najznačajnijih prognostičkih faktora implementirali u predposlednjem (7.izdanju) TNM klasifikacije kolorektalnih karcinoma iz 2010god.(245). Kao najznačajniji prognostički faktori su, osim patološkog stadijuma bolesti (pT), istaknuti stepen diferencijacije tumora (gradus-G), rezidualni status tumora (R), status cirkumferentne resekcione margine (CRM), tumorsko pupljenje („tumor budding“), limfovaskularna invazija (LVI), perineuralna invazija (PNI), tumorski depoziti (TD), limfocitni odgovor od strane domaćina, mikrosatelitska nestabilnost tumora (MSI), KRAS mutacioni status i tumor regresioni gradus nakon neoadjuvantne terapije (TRG) (245,246).

Na 35.ekspertsjoj konsenzus konferenciji College of American Pathologists Consensus Statement (CAP), održanoj 2000. god. ustanovljeni su novi visokoznačajni prognostički parametri koji su, na osnovu nivoa naučnih dokaza, podeljeni na dokazane, verovatne i moguće i svrstani u kategorije I, II<sub>a</sub>, II<sub>b</sub>, III i IV(32,246):

**Kategorija I** obuhvata faktore koji su naučno dobro potkrepljeni (dokazani) i važni za TNM stadiranje tumora: pT stadijum tumora, pN (limfonodalni status tumora), R kategorija (rezidualni status tumora), pVI (vaskularna invazija), TD (tumorski depoziti), LNmi (mikrometastaze) i povišen nivo serumskog CEA.

**Kategorija IIa** obuhvata biološke i kliničke parametre koji verovatno imaju prognostički značaj pri odabiru terapije i bitno ih je uvrstiti u patohistološki izveštaj: G (histološki gradus), CRM (cirkumferentna resekciona margina), TRG (regresioni gradus nakon neoadjuvantne terapije).

**Kategorija IIb** obuhvata dobro proučene ali nedovoljno značajne faktore da bi se uključili u kategoriju I ili IIA: histološki tip tumora, odnos tumorske margine sa okolinom, perineuralna invazija, MSI (mikrosatelitska nestabilnost), TIL ( tumor infiltrišući limfociti) i DCC mutacije (18q delecija)

**Kategorija III** obuhvata još uvek nedovoljno istražene i naučno potkrepljene faktore da bi se uključili u kategoriju I ili II: peritumorska fibroza i inflamativni infiltrat, fokalno neuroendokrina diferencijacija, KRAS mutacioni status, EGFR ciljana terapija, mikrovaskularna gustina, proliferativna aktivnost.

**Kategorija IV** obuhvata istraživane parametre koji se nisu pokazali bitnim za prognozu bolesti.

#### 2.2.5.2.1. Patološki stadijum bolesti

Identifikacija patološkog stadijuma bolesti se bazira na anatomskoj proširenosti tumora, odnosno na stepenu dubine invazije crevnog zida i na prisustvu lokalnih i/ili udaljenih metastaza (247). U brojnim studijama je potvrđeno da je patološki stadijum tumora nezavistan prognostički faktor (32).

Prva klasifikacija, koja je do danas pretrpela nekoliko revizija potiče iz 1932. god., a predložio je Cuthbert Dukes (248). Po Dukes klasifikaciji kolorektalni karcinomi su podeljeni u 4 stadijuma (Tabela 2).

Tabela 2. Klasifikacija stadijuma kolorektalnog karcinoma po Dukes (248)

Stadijum	Karakteristike
A	Tumor infiltriše zid creva do mišićnog sloja, bez prisustva metastaza u regionalnim limfnim nodusima.
B	Tumor infiltriše čitav zid creva bez prisustva metastaza u regionalnim limfnim nodusima
C	Prisutne metastaze u regionalnim limfnim nodusima
D	Prisutne su udaljene metastaze

Kod pacijenata sa A stadijumom po Dukes petogodišnje preživljavanje, nakon resekcije, je veće od 90%, dok kod bolesnika u stadijumu D iznosi oko 5% (249).

Astler i Coller 1949. modifikuju Dukes klasifikaciju tako što preciznije definišu invaziju zida creva pri čemu stadijum B dele na B<sub>1</sub> ukoliko tumor infiltriše mišićni sloj i B<sub>2</sub> podstadijum ukoliko tumor probija mišićni sloj. C stadijum se takođe deli na C<sub>1</sub> podstadijum ukoliko tumor infiltriše mišićni sloj zida creva i ukoliko su prisutne metastaze u 1-4 regionalna limfna čvora, a ukoliko je zahvaćeno više od 4 limfna čvora predložen je podstadijum C<sub>2</sub>. I u ovoj klasifikaciji D stadijum daje podatke o udaljenim metastazama (1, 250).

Tabela 3. Klasifikacija stadijuma kolorektalnih karcinoma po Astler-Coller (250)

Stadijum	Karakteristike
A	Tumor infiltriše mukozu i submukozu
B <sub>1</sub>	Tumor infiltriše mišićni sloj ali ga ne probija, bez metastaza u limfnim čvorovima
B <sub>2</sub>	Tumor probio mišićni sloj, bez metastaza u limfnim čvorovima
C <sub>1</sub>	Tumor infiltriše mišićni sloj ali ga ne probija, prisutne metastaze u 1-4 limfna čvora
C <sub>2</sub>	Tumor probija mišićni sloj, prisutne metastaze u više od 4 limfna čvora
D	Prisutne udaljene metastaze

Danas se najčešće koristi TNM klasifikacija za stadiranje tumora koji se zasniva na karakteristikama primarnog tumora T (dubina infiltracije zida, infiltracija okolnih struktura), statusu regionalnih limfnih čvorova-N i prisustvu ili odsustvu udaljenih metastaza-M. Međutim i ovaj klasifikacioni sistem je pretrpeo brojne revizije, a nedavno su Američki Komitet za rak (American Joint Committee on Cancer-AJCC) i Međunarodno udruženje za kontrolu raka (International Union Against Cancer- UICC), u skladu sa ekspanzijom saznanja o molekularnogenetičkim osobinama kolorektalnog karcinoma, definisali najnovije 8.izdanje TNM klasifikacije kolorektalnog karcinoma (247).

Osmo izdanje se i dalje bazira na anatomskom opsegu bolesti ali uključivanjem bioloških i molekularnih markera prelazi sa tradicionalnog pristupa na savremeniji „personalizovani“ (214,247). Shodno tome u ovoj klasifikaciji se promovisu „prognostičke stadijumske grupe“ koje u sebi sadrže 2 koncepta: anatomski stadijum i prognostičke grupe. U tabelama koje se koriste za određivanje stadijumske grupe postoje detaljne rasprave o prognostičkim faktorima. AJCC i dalje preporučuje limfovaskularnu invaziju i metastaze ali kao prognostičke informacije, dok se mikrosatelitska nestabilnost (MSI) i status BRAF i KRAS gena preporučuju kao prognostički faktori (226).

Tabela 4. TNM klasifikacija stadijuma kolorektalnog karcinoma, T – kategorija

TNM klasifikacija stadijuma kolorektalnog carcinoma AJCC – 8. izdanje, 2018 (247)	
<b>T kategorija (T)</b>	
Tx	veličina primarnog tumorase ne može odrediti
T0	nema dokaza o postojanju primarnog tumora
Tis	karcinom “in situ” (intraepitelni i intramukozni karcinom)
T1	tumor urasta u submukozu, bez infiltracije muskularis proprije
T2	tumor infiltriše laminu muskularisproprijuali je ne probija
T3	tumor probija muskularis propriju i urasta u subserozu ili u okolno masno tkivo ali ne i u peritonealnu šupljinu i druge organe
T4a	tumor probija visceralni peritoneum
T4b	tumor urasta u okolne organeili anatomske strukture
Za specijalne slučajeve se koriste oznake m, y, r:	
*Tm– prisustvo multipnih tumora	
*Ty- procena tumora nakon primenjene terapije	
*Tr- prisustvo rekurentnog tumora	

Tabela 5. TNM klasifikacija stadijuma kolorektalnog karcinoma N- kategorija

TNMklasifikacija stadijumakolorektalnog karcinomaAJCC – 8. izdanje, 2018 (247)	
<b>N kategorija (N)</b>	
Nx	regionalni limfni čvorovi ne mogu biti procenjeni
N0	nema metastaza u regionalnim limfnim čvorovima i nema TD*
N1	prisustvo metastazau 1-3 peritumorska limfna čvora
N1a	prisustvo metastazaujednom regionalnom limfnom čvoru
N1b	prisustvo metastazau 2-3 regionalna limfna čvora
N1c	bez metastaza u regionalnim limfnim čvorovima „satelitski“ tumorski depoziti u subserozi i perikoličnom masnom tkivu
N2	metastaze prisutne u 4 ili više regionalnih limfnih nodusa
N2a	metastaze prisutne u 4-6 regionalna limfna čvora
N2b	metastaze prisutne u 7 ili više regionalna limfna čvora
*TD- tumorski depoziti	
**N1mi -prisustvo mikrometastaza u regionalnim limfnim žlezdama (> 0,2mm i ≤ 2.0mm)	

Tabela 6. TNM klasifikacija stadijuma kolorektalnog karcinoma M- kategorija

TNMklasifikacija stadijuma kolorektalnog karcinoma AJCC – 8. izdanje, 2018 (247)	
<b>M kategorija (M)</b>	
Mx	udaljene metastaze se ne mogu proceniti
M0	nema udaljenih metastaza
M1	postoje udaljene metastaze
M1a	postoje metastaze u jednom udaljenom organu
M1b	postoje metastaze u više udaljenih organa ili struktura
M1c	postoje peritonealne metastaze sa ili bez metastaze u drugim organima-karcinoza peritoneuma

Tabela 7. Patološki stadijum kolorektalnog carcinoma

Stadijum tumorske bolesti AJCC- 8. izdanje, 2018 ( 247)			
Stadijum	T	N	M
<b>0</b>	Tis	N0	M0
<b>I</b>	T1-T2	N0	M0
<b>IIA</b>	T3	N0	M0
<b>IIB</b>	T4a	N0	M0
<b>IIC</b>	T4b	N0	M0
<b>IIIA</b>	T1-T2	N1/N1c	M0
	T1	N2a	M0
<b>IIIB</b>	T3 -T4a	N1/N1c	M0
	T2-T3	N2a	M0
	T1-T2	N2b	M0
<b>IIIC</b>	T4a	N2a	M0
	T3-T4a	N2b	M0
	T4b	N1-N2	M0
<b>IVA</b>	bilo koji T	bilo koji N	M1a
<b>IVB</b>	bilo koji T	bilo koji N	M1b
<b>IV C</b>	bilo koji T	bilo koji N	M1c

Tong i sar. 2018. su procenili da verovatnoća petogodišnjeg preživljavanja, ukoliko se kolorektalni karcinom otkrije u I stadijumu, iznosi oko 97%, ali ukoliko se tumor dijagnostikuje u IV stadijumu bolesti verovatnoća petogodišnjeg preživljavanja iznosi svega oko 11% (247). U nedavnom izveštaju Constantin i sar. 2020., je zabeleženo petogodišnje preživljavanje za pacijente u II stadijumu 87%, za III stadijum 15-13%, a za IV stadijum 12% (251).

#### 2.2.5.2.2. Dubina invazije tumora (pT kategorija)

pT status se određuje mikroskopskim pregledom uzoraka tumorskog tkiva, uzetog sa mesta najdublje invazije zida kolorektuma jer dubina invazije tumora definiše T stadijum. Smatra se da infiltracija mišićnog sloja zida ima prognostički značaj koji ne zavisi od limfonodalnog statusa (245). Treba naglasiti da definicija T<sub>is</sub> zbog specifičnosti kolorektalne sluznice obuhvata intraepitelni i intramukozni karcinom. Sa povećanjem dubine invazije raste i rizik za prisustvo metastaza (1,32).

Ukoliko se tumorski nodusi nađu u perikolično masno tkivo i ukoliko su manji od 3mm registruju se kao diskontinuirano tumorsko širenje i uključuju se u T<sub>3</sub>, ali ukoliko su tumorski nodusi veći od 3mm, bez histološki jasne građe limfne žlezde, registruju se kao regionalne metastaze (252).



Perforacija kolorektalnog karcinoma u peritoneum se klasifikuje kao pT<sub>4a</sub>, dok status pT<sub>4b</sub> obuhvata invaziju drugih segmenata kolona preko seroze ili mezokolona. (247).

Kang i sar. su zapazili da petogodišnje preživljavanje pacijenata sa lokalizovanim tumorom iznosi oko 91%, dok je kod onih kod kojih je došlo do regionalnog širenja tumora preživljavanje oko 65% (253). Američki Nacionalni Institut za rak je pT status uvrstio u I kategoriju prognostičkih faktora (246).

#### **2.2.5.2.3. Limfonodalni status tumora (pN kategorija)**

U osnovi definisanja pN statusa je broj limfnih nodusa koji je infiltrisan tumorskim ćelijama (246). Zbog velikog prognostičkog značaja metastaza u limfnim čvorovima postoje preporuke da treba pregledati sve limfne žlezde u operativnom materijalu jer su ponekad metastaze prisutne i u limfnim čvorovima prečnika 1-2mm. Prisustvo mikrometastaza u regionalnim limfnim čvorovima ukoliko su veće od 0,2 i manje od 2mm se označava sa N1mi (32,247).

Po smernicama AJCC za kvalitetno stadiranje tumora je neophodno analizirati najmanje 12 regionalnih limfnih čvorova, što je naročito važno kod II stadijuma bolesti zbog određivanja adjuvantne terapije. Broj limfnih žlezda u resektatu zavisi od anatomskih varijacija, od hirurške tehnike i od upornosti patologa da ih detektuje (245). Ukoliko se u limfnom čvoru nađe tumorsko tkivo potrebno je pregledati i tkivo neposredno uz limfni čvor jer tumorski depoziti često probijaju kapsulu limfnog čvora i zahvataju okolne vene (32).

Petogodišnje preživljavanje je u obrnutoj korelaciji sa brojem zahvaćenih limfnih nodusa. Vjerovatnoća petogodišnjeg preživljavanja kod bolesnika sa 6 i više zahvaćenih limfnih čvorova iznosi svega 10%, a ukoliko je zahvaćeno preko 16 limfnih čvorova verovatnoća je 0%. Zahvatanje apikalnih limfnih čvorova je posebno loš prognostički znak(246).

Ponekad se perineuralno, perivaskulatno ili intravaskularno ispod muskularis proprije mogu naći izolovani tumorski čvorići, koji se nazivaju perikolonni tumorski depoziti (engl.pericolonic tumor deposits-PTD). Ove tumorske depozite je ne retko teško razlikovati od metastaza u limfnim čvorovima (32).

#### **2.2.5.2.4. Udaljene metastaze (pM kategorija)**

„M“ kategorija je definisana širenjem tumora izvan kolorektuma i regionalnih limfnih čvorova. Kolorektalni karcinomi najčešće metastaziraju u jetru i to češće oni tumori kod kojih je prisutna intravaskularna invazija. Jetra je najčešći organ u kome metastaziraju tumorske ćelije zbog činjenice da veći deo crevne mezenterijalne drenaže ulazi u hepaticni portni sistem. Ako se ne leče, metastaze u jetri pokazuju nepovoljnu prognozu sa srednjim ukupnim preživljavanjem od 5–20 meseci (254). Druge česte lokalizacije metastaza su pluća, peritoneum i jajnici. Zapaženo je da su

metastaze u plućima češće kod pacijenata koji su imali metastaze u kostima. Metastaze se ređe viđaju u CNS, kostima, testisima, uterusu i dr. (32, 255). Smatra se da oko 20% bolesnika sa kolorektalnim karcinomom ima metastaze u vreme postavljanja dijagnoze, a da oko 40% bolesnika sa lokalizovanom bolešću na kraju ipak razvije udaljene metastaze (247).

U 8.izdanju AJCC TNM klasifikacije je od kategorije “metastaze u udaljenim organima” odvojena kategorija „peritonealne metastaze“ i formirana je nova  $M_{1c}$  kategorija.

Tong i sar. 2018. su pokazali da su peritonealne metastaze loš prognostički parametar i izvestili o kraćem preživljavanju bolesnika sa peritonealnim metastazama u odnosu na one bez prisustva metastaza (247). Znatno ranije su Yonemura i sar. 2013., izvestili da je zahvatanje peritoneuma nezavistan prognostički parametar i da može zameniti ostale parametre prognoze kolorektalnog karcinoma i istakli da je prognoza ovih bolesnika loša sa smanjenom stopom preživljavanja (256).

#### **2.2.5.2.5. Rezidualni status (R-kategorija)**

Kategorija „R“ se odnosi na tumor koji ostaje posle kurativne hirurške resekcije. Većina recidiva se javlja u regiji anastomoze i to najčešće u prve dve godine nakon hirurškog tretmana. Sa aspekta patologa kategorija „R“ se odnosi na prisustvo tumora na proksimalnoj, distalnoj ili cirkumferencijalnoj resekcionoj margini. „R“ predstavlja važan prognostički faktor za lokoregionalnu kontrolu primarnog tumora i svrstan je u I kategoriju prognostičkih parametara (246). Lokalni recidiv podrazumeva obnavljanje bolesti u prostoru abdomena u kome je bio smešten primarni tumor. Nastanak lokalnog recidiva zavisi od brojnih faktora, pre svega od osobina tumora (veličina, lokalizacija, način rasta, histološki tip, histološki gradus, pT i pN status idr), zatim od opšteg stanja pacijenta (starost pacijenta, sistemske bolesti, imunodeficijentna stanja i dr). Pored toga pojavi lokalnog recidiva pogoduju uslovi hitnog zbrinjavanja perforacije ili opstrukcije tumorom (257,258,259).

U brojnim studijama je pokazano da je lokalni recidiv značajno učestaliji kod karcinoma rektuma. Tako su Andreoni i sar.(259) našli lokalni recidiv kod rektalnog karcinoma u 14%, dok je kod karcinoma kolona nađen u značajno manjem broju slučajeva (6,1%). Li i sar. su pokazali da je lokalni recidiv 1.5 puta češći kod karcinoma rektuma u odnosu na karcinom kolona (260).

U toku operacije se u skladu sa dijagnostičko-terapijskim algoritmom može odrediti eventualni ostatak maligne bolesti “ex tempore” biopsijom. Ukoliko se intraoperaciono otkriju infiltrati tumora koji su jasno makroskopski uočljivi rezidualni tumor se označava sa „R<sub>2</sub>“, dok se mikroskopska detekcija tumorskih ćelija uz resekcione margine označava kao „R<sub>1</sub>“ kategorija (246,247).

#### **2.2.5.2.6. Mikrometastaze ( kategorija LN<sub>(m)</sub> +)**

Tumorski fokusi u limfnom čvoru koji su veći od 0,2mm i manji od 2mm. koji nisu okruženi sopstvenom desmoplastičnom reakcijom se kvalifikuju kao mikrometastaze. Označavaju se sa pN1miili

pN2mi pri čemu je neophodno navesti broj limfnih čvorova sa mikrometastazama (32,247). U kategorizaciji prognostičkih faktora mikrometastaze su svrstane u I kategoriju (246). Međutim izveštaji o učestalosti i prognostičkom značaju mikrometastaza su kontradiktorni i čini se da sve zavisi od dijagnostičkih mogućnosti koje su danas veoma široke. U studiji Deng i sar. mikrometastaze su, od pregledanih 232 limfna čvora, detektovane u svega 1,01% slučajeva. Isti autori su istovremeno konstatovali i visoko signifikantnu korelaciju između mikrometastaza i mortaliteta u bolesnika sa karcinomom rektuma (261). U drugoj studiji primenom RT-PCR metode su kod kolorektalnih karcinoma AJCC II stadijuma, mikrometastaze identifikovane u 37% slučajeva (262). U literaturi postoji sugestija da je prisustvo mikrometastaza povezano sa neželjenim kliničkim tokom kolorektalnog karcinoma AJCC I stadijuma. U vezi sa tim je zapažena značajna povezanost mikrometastaza sa limfovaskularnom invazijom (LVI) i ukazano da su mikrometastaze i LVI značajni, negativni, nezavisni prognostički parametri povezani sa kraćim preživljavanjem pacijenata sa kolorektalnim karcinomom AJCC-I stadijuma (263).

#### **2.2.5.2.7. Vaskularna invazija (pV kategorija)**

Vaskularna invazija je sastavni deo patohistološkog izveštaja i pripada I kategoriji prognostičkih faktora (246). Invazija tumorskih ćelija u krvne i limfne sudove predstavlja ključni korak u metastatskom procesu. U histopatološkom izveštaju je potrebno napraviti diferencijaciju između invazije limfatika i venske invazije, obzirom da je invazija limfatika povezana sa metastazama u regionalnim limfnim čvorovima, a invazija vena sa metastazama u visceralnim organima (264). Razlikuju se intramuralna i ektramuralna venska invazija. Intramuralna invazija podrazumeva invaziju krvnih sudova u submukozi ili muskularis proprijji, a ektramuralna podrazumeva invaziju krvnih sudova izvan muskularis proprije (265). Treba naglasiti da ektramuralna invazija vena ima prognostički značaj jer predstavlja faktor rizika za pojavu metastaza. Saopšteno je da verovatnoća petogodišnjeg preživljavanja iznosi 72% ukoliko je ektramuralna invazija vena odsutna, dok u prisustvu invazije vena verovatnoća preživljavanja iznosi 35% (246).

Invazija vaskularnih struktura je češća kod tumora sa većim histološkim gradusom i kod tumora koji su metastazirali u limfne čvorove i u jetru (266). U brojnim studijama se vaskularna invazija pokazala kao snažan nezavistan faktor ishoda kolorektalnog karcinoma (264,267, 268), a Betge i sar. su zaključili da je prognostički uticaj venske invazije uporediv i jači od uticaja pT ali je inferioran u odnosu na status limfnih čvorova (267). Imajući sve navedeno u vidu za bolesnike sa ektramuralnom invazijom vena je preporučena adjuvantna hemioterapija, kao za one u III stadijumu TNM. (246, 267).

#### **2.2.5.2.8. Tumorski depoziti (TD kategorija)**

Tumorski depoziti (TD) su kao važna kategorija prvi put pomenuti u 5. izdanju AJCC/TNM klasifikacionog sistema iz 1997 god, a u sedmoj reviziji AJCC/TMN su TD uvedeni u kategoriju N1c kod pacijenata sa kolorektalnim karcinomom bez metastaza u limfnim čvorovima, jer se pokazalo da je pozitivan TD status povezan sa lošim ishodom bolesti (247,269). U nekoliko izdanja priručnika AJCC,

TD je definisan kao izolovano žarište tumora u perikolorektalnom i mezokoličnom masnom tkivu, daleko od vodeće ivice tumora (270). Nagtegaal i sar. su u opsežnoj meta-analizi kojom je obuhvaćeno 10.106 pacijenata sa kolorektalnim karcinomom detektovali prosečnu učestalost tumorskih depozita od 22% (u opsegu od 4,9%-41,8%). Proučavanjem veze između tumorskih depozita i statusa limfnih čvorova isti autori su tumorske depozite detektovali u 8,7% pacijenata bez metastaza u limfnim čvorovima i u 41,6% pacijenata sa metastazama u limfnim čvorovima (271).

U brojnim studijama je zapaženo da se tumorski depoziti češće javljaju sa povećanjem N kategorije i u slučajevima sa ekstramuralnom venskom invazijom i sa perineuralnom i invazijom limfatika (272,273). Takođe je saopštena povezanost tumorskih depozita sa višim stepenom diferencijacije i višim T i M stadijumom (270,272), što ide u prilog shvatanju da je prisustvo tumorskih depozita pokazatelj agresivnog biološkog ponašanja tumora. U logističkom regresionom modelu je pokazano da je TD u kombinaciji sa metastazama u limfnim čvorovima najjači prediktor za metastaze u jetru, pluća i peritoneum (270).

U literaturi je istaknuto da i veličina tumorskih depozita utiče na prognozu bolesti. Zapaženo je da tumorski depoziti čiji je prečnik veći od 12 mm imaju znatno lošiji ishod bolesti u poređenju sa onim čiji je prečnik manji od 3mm (274). Izveštaji iz nekoliko studija ukazuju da je stopa preživljavanja pacijenata sa kolorektalnim karcinomom i sa TD pozitivnim statusom znatno lošija od onih sa TD negativnim statusom (275,276,277). U istim studijama je TD status u kolorektalnom karcinomu označen kao nezavistan prognostički faktor povezan sa metastatskom bolešću, a od strane Američkog Nacionalnog Instituta za rak status TD je svrstan u I kategoriju prognostičkih faktora (246).

Tumorski nodusi u peritonealnom ili perikoličnom masnom tkivu veći od 3 mm, bez histološki jasne građe limfne žlezde, se registruju kao regionalne metastaze, a ako su manji kao diskontinuirano tumorsko širenje i spadaju u T<sub>3</sub> stadijum (271).

#### **2.2.5.2.9. Stepen histološkog maligniteta i histološki tip tumora**

Iako je određivanje stepena diferencijacije tumora u velikoj meri subjektivna kategorija, stepen histološkog maligniteta (histološki gradus-G) je nezavistan prognostički parametar. Histološki gradus se bazira na procentualnoj zastupljenosti tubularnih struktura u ukupnoj zapremini tumorskog tkiva. Široko korišćen sistem je gradiranje tumora u četiri stepena diferencijacije (1,3,32):

- Gradus 1(G<sub>1</sub>) - dobro diferentovan tumor
- Gradus 2 (G<sub>2</sub>)- umereno diferentovan tumor
- Gradus 3(G<sub>3</sub>)- slabo diferentovan tumor
- Gradus 4 (G<sub>4</sub>)- nediferentovan (anaplastičan) tumor

Dobro diferentovani tumori su sačinjeni od predominantno tubularnih/žlezdanih struktura koje čine oko 95% zapremine tumora. Umereno diferentovani tumori imaju od 50%-95% žlezdanih formacija, dok kod slabo diferentovanih tumora žlezdana komponenta čini do 49% zapremine tumora. Anaplastični tumori su sačinjeni od nedefinisanih, neprepoznatljivih žlezdanih formacija (1,32).

Kod ove klasifikacije je prognostički najznačajnije izdvajanje slabo diferentovanih i anaplastičnih tumora.

U skladu sa razvojem novih, molekularnih metoda, SZO i Američki Komitet za rak (AJCC) su za definisanje histološkog gradusa preporučili novu dvostepenu klasifikaciju, koja se bazira na prisustvu manje ili više od 50% glandularnih struktura u tumorskom tkivu:

- *Low grade* (dobro i umereno diferentovani tumori)
- *High grade* (slabo diferentovani i nediferentovani tumori)

Preko 70% adenokarcinoma kolona su *low grade*, koji sadrže preko 50% glandularnih struktura u tumorskom tkivu. Ukoliko se u tkivu tumora nađe manje od 50% glandularnih struktura, onda se klasifikuje kao *high grade*. Histološki gradus se po ovoj klasifikaciji bazira na proceni najslabije diferentovane komponente tumora (1,3). Brojni izveštaji ukazuju da određivanje histološkog gradusa po ovoj klasifikaciji ima prognostički značaj tek u korelaciji sa statusom mikrosatelitske nestabilnosti (MSI). Smatra se da *high grade* kolorektalni karcinomi imaju lošu prognozu samo ukoliko su mikrosatelitski stabilni (MSS), a ukoliko pokazuju visok stepen mikrosatelitske nestabilnosti (MSI-H) onda imaju sličan ishod kao *low grade* karcinomi (278). Postoji mišljenje da je prognostička vrednost ovog sistema procene histološkog gradusa ograničena jer zavisi od subjektivne ocene patologa, od statusa mikrosatelitske nestabilnosti tumora i konačno ovaj sistem gradacije je teško primenljiv na retke subtipove kolorektalnog adenokarcinoma (mikropapilarni, medularni, mucinozni, signet ring cell) (279). Histološki gradus tumora je Američki Nacionalni Institut uvrstio u IIA kategoriju (verovatnih) prognostičkih parametara (246).

Histološki tip tumora je svrstan u IIb kategoriju prognostičkih parametara, a praktično se kao adenokarcinomi sa slabijom prognostičkim ishodom izdvajaju tumori sa delimičnim stvaranjem mucina ili sa neuroendokrinom ili sa skvamoznom diferencijacijom. Izuzetno lošu prognozu imaju signet ring cell karcinomi obzirom na njihov difuzno infiltrativni rast (280).

#### **2.2.5.2.10. Cirkumferentna resekciona margina (CRM status)**

Prošlo je dve i po decenije od kako su Quirke i sar.1986. ukazali na značaj resekcionijskih margina i na ulogu prisustva tumorskih ćelija na radijalnoj margini (281). Isti autori nakon dve decenije konstatuju da su se visoke stope recidiva koje su se kretale od 25%-50% u prošlosti znatno redukovale na 1%-28% pre svega zahvaljujući promenama u hirurškom pristupu, u sagledavanju "novih prognostičkih faktora" i u primeni kombinacije hirurško- neoadjuvantne terapije (282). U savremenim klasifikacionim sistemima cirkumferencijalna resekciona margina (CRM) je svrstana u IIA kategoriju prognostičkih parametara kolorektalnog carcinoma (246). U skladu sa tim izveštaj patologa nakon resekcije sadrži i informacije o statusu proksimalne, distalne, mezokolične i za delove kolona i cirkumferencijalne margine (CRM). Prema preporukama Kolegijuma Američkih Patologa (*College of American Pathologists- CAP*) proksimalne i distalne linije resekcije se smatraju dovoljne za prevenciju recidiva ukoliko iznose oko 1cm za tumoreu T<sub>1</sub> i T<sub>2</sub> stadijumu. Međutim ukoliko se radi o uznapredovanom kolorektalnom karcinomu, slabe diferencijacije udaljenost distalne resekcione linije

mora biti najmanje 2cm. Ispitivanje distalne resekcione margine je neophodno da bi se saznalo da li je resekcija urađena u zdravo tkivo i da li na resekcionoj margini postoje mikroskopski znaci bolesti (283).

Cirkumferentna resekciona margina je adventicijalna margina koja se određuje u milimetrima, a predstavlja razdaljinu između najbližih područja tumorskog tkiva (bilo koji tumorski depozit uključujući intranodalni i intravaskularni) i mezorektalne fascije koja podrazumeva resekcione linije u njenoj neposrednoj blizini. Ukoliko je distanca tumora od cirkumferentne resekcione linije veća od 1mm označava se kao Ro kategorija odnosno kao negativna cirkumferentna resekciona linija. Ukoliko je tumor udaljen manje od 1mm od cirkumferentne resekcione linije onda se označava kao R1 kategorija ili kao pozitivna cirkumferentna resekciona margina (281,283).

Postoji stav da je status cirkumferentne resekcione margine najbolji prediktor pojave lokalnih recidiva. Kod kolorektalnih karcinoma Ro kategorije CRM recidivi se javljaju u oko 3% slučajeva, dok kod R1 kategorije CRM+ verovatnoća za pojavu recidiva iznosi 30% (246). U studiji Yun i sar. 2016. CRM veći od 1mm (R1 kategorija) se pokazao kao nezavistan prediktor lošeg ishoda i u grupi pacijenata sa hemoterapijom i u grupi koja nije primala hemoterapiju. Isti autori su pokazali da je pozitivan CRM povezan i sa lošom stopom preživljavanja nakon lokalnog recidiva (284).

#### **2.2.5.2.11. Perineuralna invazija (PNI- status)**

Perineuralna invazija se karakteriše prisustvom tumorskih ćelija oko nervnih struktura i unutar bilo kog nervnog omotača (epineurijum, perineurijum i endoneurijum). Status perineuralne invazije predstavlja sastavni element patohistološkog izveštaja i u mnogim studijama predstavlja nezavistan prediktor loše prognoze kolorektalnog karcinoma (280,32,285). Od strane američkog Nacionalnog Instituta za rak PNI je svrstan u IIb kategoriju prognostičkih parametara (246).

Zapaženo je da je perineuralna invazija u korelaciji sa češćom pojavom recidiva i sa agresivnim biološkim ponašanjem tumora (286). Hu i sar. 2020. su u kohortnoj studiji kojom je obuhvaćeno 1412 pacijenata sa kolorektalnim karcinomom perineuralni invaziju verifikovali u 21,5% slučajeva. Pri tome su zapazili da se PNI značajno češće javlja kod pacijenata sa nižom diferencijacijom višim stadijumom tumora, vaskularnom invazijom, višim prečnikom tumora, MMR/KRAS/NRAS/BRAF mutacijom i pozitivnim limfnim čvorovima. U istoj studiji je Coxovom regresionom analizom dokazano da je PNI nezavistan faktor prognoze za preživljavanje pacijenata (285).

#### **2.2.5.2.12. Tumorsko pupljenje (Tumor budding-Bd)**

Termin “tumorsko pupljenje” je prvi put u histopatološku terminologiju uveo Morodomi 1989. god. za prisustvo pojedinačnih, izolovanih nediferentovanih kancerskih ćelija koje formiraju mikrotubularnu strukturu u tumorskoj stromi ispred invazivne linije tumorskog fronta. Kasnije je ovaj termin redefinisano i “tumorsko pupljenje” je okarakterisano kao prisustvo jedne ili grupe do pet ćelija koje grade trabekularne ili mikroglandularne strukture na invazivnoj liniji kancerskog fronta (287).

Nalaz ovakvih struktura ukazuje na dediferencijaciju tumora i na tumorsku invaziju. Predpostavlja se da je krucijalni događaj za nastanak tumorskog pupljenja gubitak kohezije između tumorskih ćelija i gubitak žlezdane diferencijacije. Ukoliko se pupljenje javlja u graničnom području širenja tumora govori se o peritumorskom pupljenju, a ukoliko postoji diseminacija unutar samog tumora, onda se govori o intratumorskom pupljenju. Bliža kvantifikacija i standardizacija o tumorskom pupljenju je određena po preporukama Internacionalnog konsenzusa (International Tumor Budding Conference Consensus - ITBCC). Članovi ITBCC su postigli saglasnost o jedinstvenoj međunarodnoj metodiza procenu i izveštavanje o tumorskom pupljenju, koja je zasnovana na dokazima (288). ITBCC grupa je preporučila pregled 10 polja i upotrebu trostepenog sistema koji koristi Japansko društvo za rak kolona i rektuma (289):

- O-4 pupoljaka: Bd1 (slabo izraženo tumorsko pupljenje)
- 5- 9 pupoljaka: Bd2 (srednje izraženo tumorsko pupljenje)
- 10 ili više pupoljaka: Bd3 (visoko izraženo tumorsko pupljenje)

Ovaj sistem omogućuje procenu rizika pT1 kolorektalnog karcinoma i kolorektalnog karcinoma II stadijuma. Dokazano je da je tumorsko pupljenje nezavisni predictor metastaza u limfnim čvorovima za pT<sub>1</sub> kolorektalni karcinom i nezavisni prediktor preživljavanja za stadijum II AJCC/TNM. U pT<sub>1</sub> kolorektalnom karcinomu Bd2 i Bd3 su povezani sa povećanim rizikom od metastaza u limfnim čvorovima (290,291), dok je u stadijumu II kolorektalnog carcinoma B3 povezan sa povećanim rizikom od recidiva i smrtnosti (287, 292). Pupljenje tumora je prisutno u oko 20%-40% kolorektalnih karcinoma i povezano je sa limfovaskularnom invazijom, metastazama u limfnim čvorovima, udaljenim metastazama i lošim ishodom bolesti. Postoje sugestije da pupljenje tumora treba da uđe u protokole za izveštaje o kolorektalnom karcinomu (288,289).

#### **2.2.5.2.13. Imunološki odgovor domaćina**

Lokalni imunološki odgovor od strane domaćina takođe predstavlja nezavisni prognostički faktor. Limfocitni odgovor na tumor se javlja kao peritumorska limfocitna infiltracija i/ili kao intratumorska limfocitna infiltracija (293). Limfocitni odgovor se kvantifikuje kao odsutan, slab, umereno prisutan ili izražen. Peritumorska limfocitna reakcija može da se manifestuje limfocitnim infiltratima koji formiraju limfoidne folikule sa germinativnim centrima (tkz *Crohn-like reakcija*). Prisustvo najmanje dva folikula u peritumorskoj stromi se kvalifikuje kao izražena reakcija (294). Ovakav tip reakcije se javlja kod većine kolorektalnih karcinoma sa deficitarnim MMR statusom. Prisustvo tumor infiltrišućih limfocita (TIL), koje podrazumeva nakupine limfocita intraepitelno, u tumorskoj stromi i na invazivnom frontu tumora je indikator dobre prognoze (295). Tumor infiltrišući limfociti prepoznaju tumorske antigene i oslobađaju specifične proinflamatorne citokine koji oštećuju tumorske ćelije. TIL reakcija je značajno povezana sa MSI-H kolorektalnim karcinomima i povoljnim ishodom bolesti (246). Poslednju deceniju se ulažu veliki naponi da se razviju sistemi za merenje TIL reakcije (tkz. “immunoscore”), ali se čini da još nije postignuta standardizacija ove metode.

## 2.2.6. Terapija kolorektalnog karcinoma

Iako je kolorektalni karcinom hirurška bolest, poslednjih decenija su se terapijski modaliteti proširili i osim hirurgije obuhvataju pre i/ili postoperativnu hemio- i radioterapiju, a sve u cilju poboljšanja kvaliteta života operisanih. Veliki značaj u lečenju i poboljšanju kvaliteta života pacijenata sa ograničenom metastatskom bolešću ima i hirurška terapija solitarnih metastaza u jetri i plućima (296,297,298). Krucijalni značaj u odabiru terapijskog tretmana i ishodu bolesti ima određivanje stadijuma kolorektalnog karcinoma (296,298).

### 2.2.6.1. Hirurška terapija

Uprkos napretku u razumevanju biologije karcinoma kolona hirurgija je i dalje primarni način lečenja većine pacijenata sa rakom debelog creva. Način hirurškog lečenja kod karcinoma debelog creva i karcinoma rektuma se može razlikovati, ali su osnovni principi kojim se vode hirurški postupci za njihovo lečenje slični. Ovi principi, na kojima počiva operativni tretman, baziraju se na konceptu resekcije debelog creva ili rektuma sa tumorom, sa odovarajućim marginama, kao i uklanjanju „en block“ pripadajućeg mezenterijuma koji sadrži pripadajuće krvne sudove i regionalne limfne čvorove, duž anatomskih ravni uspostavljenih tokom embrionalnog razvoja (298).

Obim resekcije zavisi od lokacije primarnog tumora, određenih limfnom drenažom. Limfni kapilari su prvenstveno smešteni u submukoznom i subseroznom sloju zida creva, i limfni tok je cirkumferentan-obodni, sa longitudinalnim-uzdužnim širenjem duž creva, koji je obično manji od 1 cm u svakom smeru. Prema tome, margina od 5 cm normalnog creva sa obe strane od primarnog tumora smatra se dovoljnim za izbegavanje recidiva na anastomozama. Kod karcinoma rektuma limfni tok je prvenstveno usmeren u proksimalnom pravcu, dok se u distalnom pravcu ćelije karcinoma ne šire više od 1 cm od makroskopski distalnog kraja tumora. Zbog navedenog se granica resekcije normalnog creva na 2 cm od tumora smatra onkološki bezbednom resekcijom (298, 299).

Na osnovu blizine u odnosu na crevo i njegovu vaskularizaciju, regionalni limfni čvorovi debelog creva su klasifikovani u četiri glavne grupe: epikoločni, parakolični, intermedijalni-srednji i apikalni-centralni. Epikolični limfni čvorovi se nalaze u zidu creva ispod peritoneuma, često blizu masnih privezaka (appendices epiploicae), parakolični čvorovi duž marginalnih krvnih sudova, intermedijalni su u sredini mezenterijuma, a apikalni čvorovi su smešteni u blizini korena mezenterijuma, u blizini korena pripadajućih magistralnih krvnih sudova. Kolorektalni karcinom se uglavnom širi ka apikalnim limfnim čvorovima i zbog toga onkološka resekcija treba da obuhvati sve grupe limfnih čvorova. Ako se metastatski limfni čvorovi ne uklone tokom operacije, resekcija se smatra nepotpunom (298).

Indikacija za elektivnu resekciju kolona je dokazan tumor, koji je predhodno kolonoskopski bioptiran i patohistološki potvrđen, bez dokaza o udaljenim metastazama i bez kontraindikacija za operativni tretman. Opseg resekcije zavisi od mesta, odnosno lokacije primarnog tumora (300).



Za tumore lokalizovane u cekumu i uzlaznom-ascendentnom kolonu, koristi se desna hemikolektomija (298,300). Za tumore koji se nalaze na hepaticičnoj fleksuri ili u proksimalnom delu poprečnog-transverzalnog kolona, indikovana je desna proširena kolektomija (298,300).

Transverzalna kolektomija se primenjuje za tumore u srednjem ili distalnom delu poprečnog kolona i sastoji se od podvezivanja srednjih količnih krvnih sudova, uz oslobađanje hepaticne i lijenalne fleksure kolona i reseciranjem poprečnog kolona sa pripadajućim omentumom, praćenim kolokoličnom anastomozom. Medjutim, proširena desna kolektomija sa anastomozom između terminalnog ileuma i nishodnog-descendentnog kolona može biti bezbednija anastomoza, sa ekvivalentnim funkcionalnim rezultatom (298,300).

Kod tumora ograničenih na distalni poprečni kolon, spleničnu fleksuru ili nishodni-descendentni kolon izvodi se leva kolektomija (298,300).

Sigmoidna kolektomija je opcija za tumore u sigmoidnom kolonu, gdje se podvezuju i odvajaju sigmoidne grane donje mezenterične arterije, pri čemu se resecira sigmoidni kolon do nivoa peritonealne refleksije, a zatim se načini anastomoza između nishodnog kolona i gornjeg rektuma. Često je potrebna mobilizacija splenične fleksure radi kreiranja anastomoze bez tenzije (298,300).

Totalna ili subtotalna kolektomija je ponekad neophodna kod pacijenata sa sinhronim karcinomom kolona. U ovoj proceduri, ileokolični, desni količni, srednji količni i levi količni krvni sudovi se podvezuju i odvajaju. Ukoliko je poželjno sačuvati sigmoidni kolon, distalni sigmoidni krvni sudovi se ostavljaju netaknutim i anastomoza se kreira između ileuma i distalnog sigmoidnog kolona (subtotalna kolektomija). Ako sigmoidni kolon treba da se resecira, sigmoidni krvni sudovi se podvezuju i odvajaju, a ileum se anastomozira sa gornjim rektumom (totalna kolektomija) (298,300).

Operacija karcinoma rektuma je složenija od operacije raka debelog creva, jer se rektum nalazi unutar uske koštane karlice, okružen je urogenitalnim organima, velikim magistralnim krvnim sudovima, autonomnim nervima, a blizu je analnim sfinkterima (298).

Rektum ili pravo crevo, predstavlja distalni dio debelog crijeva, protežući se od rektosigmoidnog spoja do anorektalnog prstena, koji odgovara otisku puborektalnog mišića na zidu creva, odakle se prostire analni kanal do anokutane linije. Iz praktičnih razloga i zbog standardizacije, tumori na rektumu se definišu u odnosu na udaljenost u centimetrima od anokutane linije i određuju se uz pomoć rigidnog rektoskopa. Rektum i mezorektum su organi koji se nalaze izvan peritoneuma i prekriveni su membranom koja se naziva mezorektalna fascija. Mezorektalna fascija je važna zbog određivanja odnosa tumora ili izmenjenog limfnog čvora mezorektuma u odnosu na mezorektalnu fasciju, kada govorimo o cirkumferentnoj resekcionoj margini. Smatramo da je ona pozitivna ako je rastojanje manje od 1mm (298).

Hirurško lečenje kod karcinoma rektuma se može izvesti u zavisnosti od lokacije totalnom mezorektalnom ekcizijom (TME), parcijalnom mezorektalnom ekcizijom (PME), abdominoperinealnom resekcijom i Hartmanovom procedurom (298,300).

Pored postizanja sigurnih onkoloških margina i adekvantne limfadenektomije, važan cilj kod resekcije kolorektalnih karcinoma je i uspostavljanje kontinuiteta creva. To se može postići različitim tehnikama, uz poštovanje osnovnih hirurških principa. Krajevi koji treba da budu anastomozirani, moraju imati adekvatnu krvnu opskrbljenost, treba da budu dovoljno mobilisani da bi se obezbedila anastomoza bez tenzije. Konačno, šavovi ili staplerske spajalice treba da uključe submukozu creva, sloj zida sa najvećim udelom kolagena i najvažniji sloj za držanje creva zajedno (298,300).

#### **2.2.6.1.1. Laparoskopna kolektomija (Minimalno invazivna kolektomija)**

Nekoliko prospektivnih kliničkih studija pokazalo je da je laparoskopna kolektomija za karcinome kolona povezana sa kratkoročnom prednošću i dovodi do ekvivalentnog dugotrajnog onkološkog ishoda u poredjenju sa tradicionalnim otvorenim hirurškim pristupom (298,301,302).

Prednosti laparoskopne hirurgije uključuju manje postoperativnog bola, raniji povratak funkcije creva, kraći boravak u bolnici i manji procenat komplikacija. Međutim, laparoskopna hirurgija tehnički je zahtevnija i treba vremena za njeno savladavanje. Prisutnost višestrukih priraslica iz predhodnih operacija, lokalno uznapredovala bolest ili gojaznost ograničavaju primjenu ove hirurške metode (298,301,302,303).

Laparoskopna kolektomija se obično izvodi pomoću tri do pet portova, uz mesto za vadjenje preparata. Sa porastom stručnosti hirurga i razvijanjem laparoskopne hirurgije sada je u upotrebi i „single port“, odnosno jednoportna laparoskopna hirurgija, gdje se hirurška procedura izvodi isključivo kroz jedan port (298).

Robotske platforme predstavljaju novi vid laparoskopne hirurgije i u poredjenju sa konvencionalnom laparoskopijom, robotska resekcija debelog creva je povezana sa nižom stopom konverzija u klasični vid hirurgije, sa sličnim kratkoročnim ishodima, ali sa višim troškovima lečenja (298,301,303).

#### **2.2.6.1.2. Hirurško lečenje metastaza**

Metastatska bolest podrazumeva prisustvo visceralnih i limfonodalnih metastaza na više lokacija. Kolorektalni karcinom tipično metastazira u jetru, pluća, peritoneum, limfne čvorove i jajnike. Kod pacijenata kod kojih su metastaze ograničene na jedan organ (najčešće jetra) hirurško lečenje je potencijalno kurativno, ali kod pacijenata koji imaju višestruke metastaze na različitim mestima (jetra, pluća, kosti, mozak itd.) operacija može doprineti preživljavanju, ali je veoma retko kurativna (304).

Oko 65% pacijenata sa kolorektalnim karcinomomima metastatsku bolest koja se u oko 40% slučajeva manifestuje sekundarnim depozitima u jetri (102). Cilj hirurškog tretmana hepatičnih

metastaza je radikalna resekcija koja podrazumeva uklanjanje svih makroskopski vidljivih lezija, uz mikroskopski čiste resekzione linije. Kod neresektibilnih lezija mogu se primenjivati minimalno invazivne tehnike i to kriohirurgija, radiofrekventna ili mikrotalasna ablacija i sistemska hemioterapija (297,305).

Hirurška resekciona terapija hepatičnih metastaza daje veće šanse za petogodišnje preživljavanje i to u opsegu od 21% do 58%, u odnosu na one pacijente koji su tretirani samo sistemskom hemoterapijom. Metastaze u jetri se mogu odstraniti različitim tipovima operacija. Resekcije jetre mogu biti: neanatomske metastazektomije ili anatomske segmentektomije i hepatektomije. Imperativ je postizanje R<sub>0</sub> resekcije. Hirurgija mora biti poštena, resekciona margina mora biti ispod 2mm. Kontraindikacije za hirurški tretman mogu biti opšte medicinske, kada ASA skor je preko 3, prisustvo neresektibilnih ekstrahepatičnih metastaza i kada nije moguće postići R<sub>0</sub> resekciju zbog zahvatanja više od 70% ili 6 segmenata jetre, zahvatanje sve tri hepatične vene ili obe grane hilusa (297).

Sinhrono metastaze predstavljaju agresivni znak bolesti i predstavljaju negativan prognostički faktor. One se mogu rešiti na tri načina: klasično, operacijom kolona i rektuma, nakon čega sledi pauza u toku koje pacijent prima neoadjuvantnu hemoterapiju, nakon čega sledi operacija na jetri. Zatim simultano, kada se istovremeno uklanjaju primarni tumor i metastatske promene na jetri i na kraju obrnutom strategijom kada se najpre primenjuje neoadjuvantna hemoterapija, potom operiše jetra, nakon čega se u trećem aktu pristupa odstranjenju primarnog tumora (297).

Ukoliko se verifikuje postojanje manjeg broja metastaza, i to manje od 4 one se mogu operisati odmah. U ovim slučajevima se može primeniti neoadjuvantna terapija. Neoadjuvantna terapija je obavezna kod većeg broja metastaza, preko 4 i potencijalno neresektibilnih metastaza, jer se ovim vidom terapije mogu prevesti u stanje sekundarne resektibilnosti, pogotovo kod pacijenata sa homosenzitivnim promenama na jetri. U slučaju da se otkriju incidentane metastaze, odnosno ukoliko se otkriju tek na operaciji, radi se odstranjenje primarnog tumora, čime se izbegavaju komplikacije u vidu intestinalne opstrukcije, perforacije, krvarenja i emitovanja novih metastaza, dok biopsija metastatskih promena i simultane operacije na jetri se ne preporučuju, jer u tom slučaju ne postoji potpuna slika o stanju promena u jetri i van nje (297, 305).

Ukoliko je reč o asimptomatskim pacijentima sa T<sub>1,2</sub>N<sub>0,1</sub> primarnim tumorima na desnom kolonu sa sinhronim metastazama na jetri, moguća je simultana resekcija jetre većeg obima, dok je kod levog kolona i rektuma moguća manja resekcija i to do dva segmenta jetre. U ostalim slučajevima se preporučuje operacija u dva akta. Kod pacijenata sa T<sub>3,4</sub> N<sub>1,2</sub> karcinomom kolona i rektuma sa sinhronim metastazama na jetri, uz hemoterapijske protokole se dodaju i agensi koji će delovati na metastaze (297).

#### **2.2.6.2. Radioterapija**

Radioterapija može biti preoperativna, postoperativna, kombinovana (pre-i postoperativna), kurativna i palijativna. Radioterapija kod pacijenata sa kolorektalnim karcinomom, se primenjuje

postoperativno sa ciljem smanjenja rizika od pojave lokalnog recidiva u II/III stadijumu ili preoperativno sa ciljem smanjenja volumena i agresivnosti tumora kako bi se izvela radikalna hirurška intervencija kod tumora T<sub>3</sub> i T<sub>4</sub> statusa (306, 307).

Preoperativna radioterapija može biti kratkotrajna, sa 5 frakcija i ukupnom terapijskom dozom od 25Gy, a nakon nekoliko dana ili nedelja se radi hirurški tretman ili dugotrajna radioterapija, koja obuhvata 25 frakcija sa ukupnom terapijskom dozom od oko 50Gy i posle oko 8 nedelja sledi operativni zahvat (308).

Preoperativnom radioterapijom se postiže prevođenje inoperabilnih tumora u operabilne, smanjivanjem stadijuma bolesti, smanjenjem veličine tumora i uništavanjem mikrometstaza. Preoperativna radioterapija je efikasna jer je pre operacije bolja oksigenacija i vaskularizacija tkiva (308,309).

Prednost postoperativne radioterapije u odnosu na preoperativnu se ogleda u tome što postoji definitivni patohistološki izveštaj, pa postoji bolja selekcija pacijenata za zračenje i što je hirurg u mogućnosti da markira mesta potencijalne rezidualne bolesti (306,308).

### 2.2.6.3. Hemoterapija

Hemoterapija je važna karika u terapijskom protokolu pacijenata sa kolorektalnim karcinomom. Cilj hemoterapije je izazivanje apoptoze odnosno programirane smrti malignih ćelija tumora. Većina hemoterapeutika su supstance koji indukuju signale za aktivaciju unutrašnjeg mitohondrijalnog puta za apoptozu. Ćelijska smrt apoptozom nastaje pod uticajem proteolitičkog enzima Caspaze (*cystein aspartat proteinasa*) (310). Maligne ćelije imaju visok indeks proliferacije i ne podležu procesima apoptoze pre svega zbog smanjene aktivnosti proapoptotičnih i povećane aktivnosti antiapoptotičnih proteina. Antiapoptotični proteini (na pr. Bcl-2) promovišu preživljavanje ćelija očuvanjem integriteta spoljašnje mitohondrijalne membrane. Sa druge strane proapoptotični proteini (Bax, Bak i dr.) vrše promociju apoptoze tako što ruše integritet mitohondrijalnih membrana stvaranjem “pora” na spoljašnjoj površini membrana, što izaziva caspaza-posredovane različite proteolitičke reakcije koje ćeliju vode u smrt. Različiti hemoterapeutici inhibiraju vezivanje Bcl-2 na Bax i Bak i tako posredno indukuju apoptozu malignih ćelija (311).

Hemoterapija se može primeniti kao neoadjuvantna (preoperativna) ili kao adjuvantna (postoperativna) hemoterapija. Cilj adjuvantne hemoterapije je smanjenje rizika od recidiva i produžetak preživljavanja pacijenata sa kolorektalnim karcinomom. Ovaj vid sistemske terapije je indikovano nakon primarne resekcije tumora i treba je započeti što je moguće ranije počev od treće nedelje, a najkasnije osam nedelja nakon resekcije. U slučaju laparoskopske kolektomije adjuvantnu hemoterapiju je moguće započeti i ranije (312).

Adjuvantna hemoterapija je indikovana kod svih pacijenata sa III stadijumom bolesti (bilo koji T, N<sub>1</sub>, M<sub>0</sub> ili bilo koji T, N<sub>2</sub>, M<sub>0</sub>) i kod visokorizičnih pacijenata sa II stadijumom bolesti. Danas

postoji koncenzus oko definisanja indikatora visokog rizika za pacijente u II stadijumu. Potrebno je da imaju bar jednu od sledećih karakteristika bolesti: loše diferentovan tumor (G3), manje od 12 pregledanih limfnih čvorova, limfovaskularna ili perineuralna invazija, postojanje opstrukcije ili perforacije i pT<sub>4</sub> status (308).

Kod pacijenata u II stadijumu bolesti sa visokim rizikom se prema protokolima, nakon hirurškog lečenja dodaje adjuvantna hemoterapija sa 5-fluorouracilom (5-FU) i leukovorinom. U III stadijumu bolesti se daje fluoropirimidin (kapecitabin), dok se pacijentima sa udaljenim metastazama pored kapecitabina u terapiju uključuje i irinotekan ili oksaliplatin. Pacijenti sa udaljenim i resektabilnim metastazama u jetri dobijaju i dodatnu imunoterapiju sa antitelom na VEGF (Bevacizumab) ili na EGF (Cetuximab). Petogodišnje preživljavanje operisanih bolesnika je od uvođenja adjuvantne hemoterapije pa do danas poraslo sa 50%, kako je bilo devedesetih godina, na 70% (308).

Zahvaljujući hemoterapiji lečenje pacijenata sa neresektabilnim metastazama je znatno napredovalo poslednju deceniju. Danas je lečenje metastatskog kolorektalnog karcinoma bazirano na individualnom praćenju resektabilnosti bolesti i molekularnom testiranju tumora, pri čemu je KRAS mutaciono testiranje redovan dijagnostički postupak kod ovih pacijenata. BRAF mutacioni status ima važan prognostički značaj u ranim linijama lečenja, ali se smatra da nema prediktivni značaj za primenu EGFR inhibitora (308).

#### **2.2.6.4. Hemoradioterapija**

Obzirom da najveći broj savremenih protokola za lečenje karcinoma rektuma podrazumeva multimodalni terapijski pristup, to se kombinovana hemoradioterapija pre ili posle hirurškog zahvata, sve više koristi u lečenju lokalno uznapredovalog karcinoma colona (313). Neoadjuvantna hemoradioterapija uključuje zračenje (protrahovano ili kratkotrajno frakcionisano) i hemoterapiju u tri ciklusa, a posle pauze od pet do deset nedelja sledi hirurška intervencija (314). Izbor pacijenata za ovaj tip terapije se zasniva na riziku za razvoj recidiva koji se procenjuje na osnovu parametara dobijenih na MR pregledu, a to su T status, N status, udaljenost tumora od anusa, infiltracija mezorektalne fascije i ekstramuralna vaskularna invazija. Na osnovu ovih kriterijuma formiraju se grupe prema kojima se preporučuje modalitet lečenja (315).

Prednosti neoadjuvantne hemoradioterapije se ogledaju u tome što je pre operacije efekat lečenja bolji od postoperativnog zračenja jer nije oštećeno lokalno snabdevanje krvlju, jer je oksigenacija krvi važna zbog osetljivosti na zračenje. Preoperativna hemoradioterapija može smanjiti masu tumora, poboljšati lokalni status tumora, povećati stopu resekcije Ro i stopu očuvanja analnog svingtera, odnosno povećati procent sfinkter-poštednih operacija. Takođe preoperativnom hemoradioterapijom se može smanjiti stopa lokalnog recidiva i smanjiti jatrogena diseminacija jer su nakon hemoradioterapije aktivne tumorske ćelije u velikoj meri redukovane, a javljaju se fibroza i nekroza (316,317). U meta-analizi koja je obuhvatila 5304 pacijenta sa lokalno uznapredovanim karcinomom rektuma kod kojih je primenjena preoperativna hemoradioterapija procenat očuvanog

svinktera je bio u opsegu od 56,4 % do 85,4%. U istoj metaanalizi postoperativne komplikacije su se javile u 8,4% - 47% slučajeva (318).

Uspeh neoadjuvantne hemoradioterapije zavisi od izbora tehnike radioterapijskog lečenja, od vremena izvođenja resekcije primarnog tumora i od bioloških osobina tumora (314).

#### **2.2.6.5. Ciljana terapija**

Intenzivno proučavanje molekularnih mehanizama karcinogeneze, genskih alteracija, ćelijskih proteina i signalnih puteva, tokom poslednjih decenija indukovalo je uvođenje novih terapijskih metoda u standardne protokole lečenja kolorektalnog karcinoma. U vezi toga u naučnoj javnosti se ističe koncept komplementarne terapije tumora koja podrazumeva da se na svaki od aspekata karcinoma (angiogeneza, proliferacija, rezistencija na apoptozu) deluje ciljanom terapijom (12,19).

Ciljana terapija je najčešće usmerena na proteine koji su uključeni u procese ćelijske signalizacije, pa blokiranjem signala koji maligne ćelije upućuju kako da se neograničeno dele i rastu, ciljana terapija blokira njihov rast i deobu. Drugi tip ciljane terapije pogađa receptore koji postoje na površini malignih ćelija, dok neke od ciljanih terapija inhibišu angiogenezu. U nekim slučajevima ciljanom terapijom se može postići modulacija gena, odnosno može se uticati na funkciju proteina koji imaju važnu ulogu u kontroli gena (220).

Saznanja da pojačana ekspresija receptora Epidermalnog faktora rasta (EGFR) stimuliše ćelijsku proliferaciju, progresiju i preživljavanje malignih ćelija su omogućila razvoj različitih molekularnih terapijskih modaliteta usmerenih na inhibiciju EGFR. Terapija sa anti EGFR monoklonskim antitelom (Cetuksimab i Pantimumab), se veže za receptor EGFR i koči aktivaciju glavnih signalnih puteva uključenih u kolorektalnu karcinogenezu. Cetuksimab je do sada u preoperativnoj hemoterapiji pokazao nisku stopu kompletnih remisija, ali ima značajnu ulogu u zaustavljanju progresije tumora (216,217).

Poslednjih godina se u lečenju kolorektalnog karcinoma najviše koristi ciljana anti-angiogena terapija, pri čemu se, kao anti-angiogeni cilj, koristi moćan stimulator angiogeneze - Vascular endothelial growth factor (VEGF). Rekombinovano humanizovano antitelo (Bevacizumab) koje cilja VEGF je pokazalo značajn uspeh za preživljavanje bez progresije bolesti. Bevacizumab smanjuje vaskularni volumen i perfuziju unutar tumora što rezultuje supresijom rasta tumora. Takođe se pokazalo da anti-angiogena terapija koja cilja VEGF receptor tirozin kinaze inhibira vaskularnost, proliferaciju i rast metastaza u jetri karcinoma debelog creva i značajno povećava apoptozu ćelija endotela i tumora, što sugeriše važnu ulogu VEGF kao faktora preživljavanja za endotel i tumora (213)

Monoklonsko antitelo Bevacizumab je prvo anti-angiogeno sredstvo koje je odobreno za lečenje kolorektalnog karcinoma. U lečenju kolorektalnog karcinoma nedavno su uključena i druga tri anti-angiogena leka: Aflibercept i Ramucirumab, koji su biološka jedinjenja usmerena protiv vanćelijskih domena humanih VEGF receptora, a treći je hemijsko jedinjenje Regorafenib oralno aktivni inhibitor VEGFR2-TIE2 tirozin kinaze. Ipak, koristi od preživljavanja ostaju skromne, a

petogodišnja stopa preživljavanja je približno 10-12 % (Tang 2018, Canavese M2017).

Imunohistohemijska ekspresija VEGF u tumorskom tkivu ima prognostički značaj, ali nije pokazan značaj ekspresije VEGF kao prediktora za anti-angiogenu terapiju. Visok nivo ekspresije VEGF je povezan sa lošom prognozom i kraćim preživljavanjem (13,17,19).

Drugi medijatori angiogeneze, uključujući signalne puteve faktora rasta izvedenih iz trombocita (PDGF) i faktora rasta fibroblasta (FGF), takođe regulišu angiogenezu, rast tumora i metastaze. Shodno tome, noviji anti-angiogeni tretmani imaju za cilj istovremeno blokiranje i VEGF / VEGFR signalnih puteva i drugih puteva koji su značajni za angiogenezu i rast tumora.

U zavisnosti od vrste malignog tumora i načina njegovog širenja, ciljana terapija može da se koristi za lečenje tumora, za usporavanje rasta tumora, za ubijanje malignih ćelija koje su se proširile na druge delove tela ili za ublažavanje simptoma izazvanih tumorom.

Bez obzira što se ciljana terapija sprovodi već dugo godina, ipak mnoga važna pitanja još uvek nisu razjašnjena, a jedno od njih je pitanje odgovarajućeg prediktivnog biomarkera, na bazi koga bi se selektovali pacijenti. Drugi problem je definisanje optimalne kombinacije lekova, zatim pitanje kako prevazići rezistenciju, a na kraju postoji i problem visokih materijalnih troškovi lečenja.

## **2.3. Biomarkeri kolorektalnog karcinoma**

Složeni mehanizmi kolorektalne karcinogeneze uslovljavaju neprestano traganje za novim prognostičkim i prediktivnim biomarkerima koji bi obezbedili personalizovanu i ciljanu primenu monoklonskih antitela u lečenju kolorektalnog karcinoma, poput EGFR i VEGF. Očekuje se da će poznavanje svih gena i njihovih sekvenci omogućiti saznanja o individualnim biološkim osobina karcinoma i razvoj efikasnije strategije prevencije i lečenja.

### **2.3.1. Stathmin 1 (STMN1)**

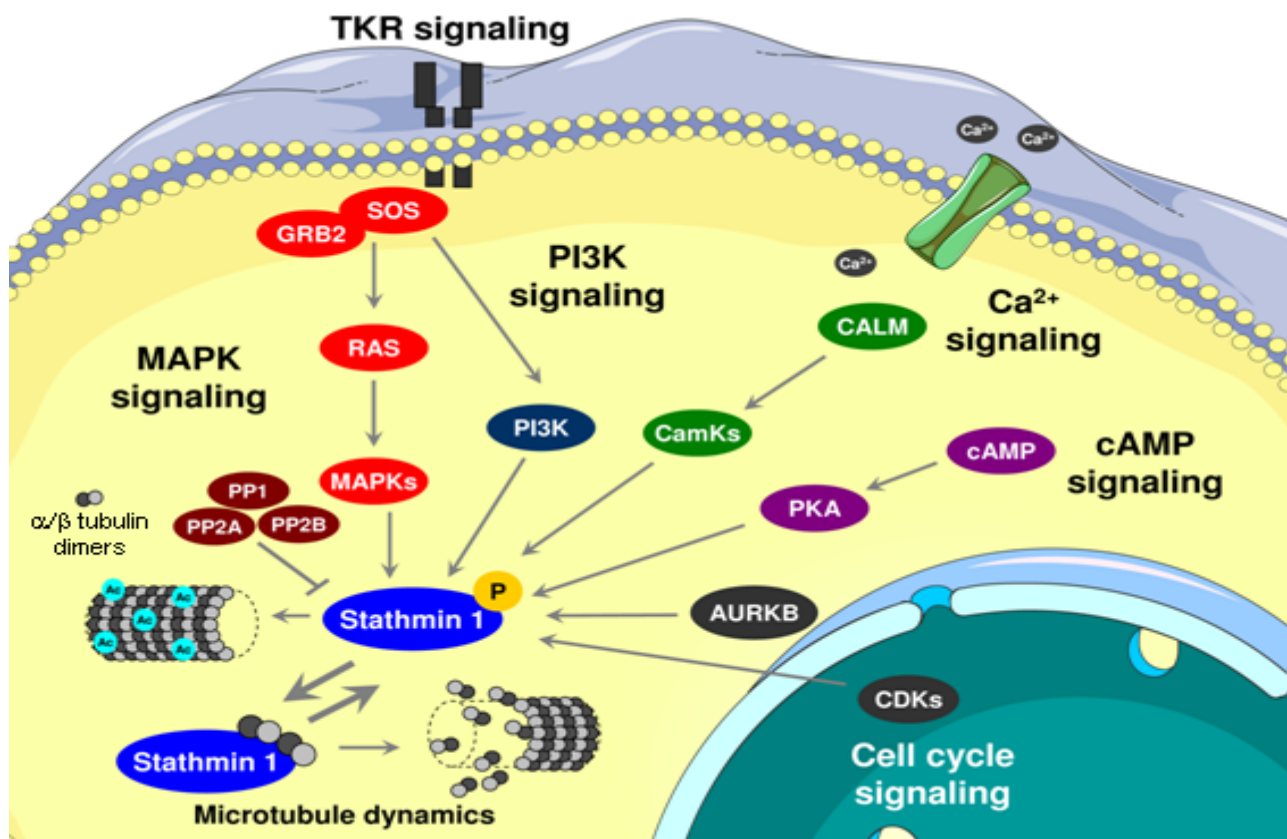
#### **2.3.1.1. Struktura i biološke osobine**

Stathmin1 (STMN1) poznat i kao onkoprotein 18 ili metablastin je citozolni fosfoprotein od 18kDa. Kodiran je STMN1 genom koji se nalazi na 1p35-36.1 hromozomu. Stathmin1 pripada Stathmin-proteinskoj porodici koja obuhvata Stathmin1 (STMN1), Stathmin like2 (STMN2), Stathmin like3 (STMN3) i Stathmin like4 (STMN4) onkoproteine (319).

Stathmin1 se sastoji od 149 aminokiselina koje su organizovane u četiri domena fosforilacije koji su označeni kao Ser 16,25,38 i 63. STMN1 ima značajnu ulogu u regulaciji citoskeleta mikrotubula, odnosno u montaži i demontaži deobnog vretena. Kao glavni protein koji vrši destabilizaciju mikrotubula STMN1 direktno komunicira sa rastvorljivim tubulinom da bi stvorio

kompleks koji odvaja slobodni tubulin i sprečava polimerizaciju mikrotubula (320). Na molekularnom nivou Stathmin1 depolimerizuje microtubule bilo odvajanjem dimera slobodnih tubulina ili direktnom indukcijom “katastrofe” mikrotubula (321). Fosforalizacija na domenu Ser16 ili Ser63 smanjuje ili ukida sposobnost STMN1 da rastvori tubulin. Stathmin1Ser16 može biti fosforalisan protein kinazom C, a Ser25 i Ser38 su mete mitogen aktiviranim protein kinazama (MAPK) iciklin zavisnih kinaza (CDK) (319). Aktivni nefosforilisani STHMN1 vrši depolimerizaciju mikrotubula tokom interfaze i kasne mitoze. Aktivnost mikrotubula depolimerizacijom STMN1 je regulisana fosforalizacijom kako bi se omogućila polimerizacija mikrotubula i sastavljanje deobnog vretena (322).

Stathmin 1 kontroliše  $G_1$ -S i  $G_2$ -M važne punktove progresije ćelijskog ciklusa utičući na dinamiku formiranja mikrotubula i napredovanje ćelijskog ciklusa. Inhibicija ekspresije STMN1 vodi do akumulacije ćelija u  $G_2$ -M fazama i povezana je sa ozbiljnim poremećajima deobenog vretena i poteškoćama na kraju mitoze (323). Takođe je zapaženo da STMN1 gen transkripcijski potiskuje funkcionalni p53-supresorni protein koji reguliše mnoge ćelijske procese putem transkripcije gena (32), a u prilog toga ide i izveštaj Kang i sar. koji su pokazali da je aberantna imunoreaktivnost p53 povezana sa većom ekspresijom Stathmin 1 u adenokarcinomu želuca, sugerišući da bi prekomerna ekspresija STMN1 mogla biti posledica inaktivacije p53 supresornog gena. Smatra se da p53 posreduje u represiji protumorske aktivnosti STMN1 što rezultuje negativnom regulacijom STMN1 i zaustavljanjem ćelijskog ciklusa u  $G_2$ -M fazi (324).



Slika 5: Signalizacija Stathmin 1: Stathmin 1 može biti fosforiliran na serinskim mestima pomoću ciklin-zavisnih kinaza (CDK) i mitogenom aktiviranih proteinskih kinaza (MAPK (Izvor: Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology, 2015)



### 2.3.1.2. Funkcija i prognostički značaj Stathmin1

Za optimalnu funkciju deobnog vretena i uredno napredovanje kroz ćelijski ciklus neophodna je normalna regulacija funkcije Stathmin1 putem fosforilacije i defosforilacije (325). Osim u regulaciji ćelijskog ciklusa Stathmin1 je uključen i u regulaciju drugih ćelijskih procesa kao što su polaritet epitela, apoptoza, promocija proliferacije, pokretljivost ćelija, metastaziranje i otpornost na antimikrotubulnu terapiju (319, 326). Tian i sar. 2015. su zapazili da je Stathmin1 umešan u molekularne mehanizme regulisanja migracije i invazije trofoblasta (327).

Jedna od prvih funkcija koja se pripisivala Stathminu1 je bila uloga u regulaciji hormonske sekrecije u ćelijskim linijama hipofize i insulinoma. U drugoj studiji je pokazano da je visok nivo Stathmin1 u testisu ograničen na germinativne ćelije u određenim razvojnim fazama, pa se smatra da on može imati ulogu i u spermatogenezi. Krajem prošlog veka je saopšteno zanimljivo zapažanje da nivo Stathmin1 dramatično raste tokom formiranja sinapse, što sugerise ulogu Stathmin1 u diferencijaciji neurona (325). U literaturi još uvek nije usaglašen stav da li su ove nemitotične funkcije Stathmin1 ostvaruju isključivo kroz depolimerizaciju mikrotubula ili kroz neke druge mehanizme koji još nisu definisani.

U brojnim studijama i meta-analizama je pokazano da je visoka ekspresija Stathmin1 povezana sa lošom diferencijacijom tumora, velikim dijametrom tumora, naprednom N fazom, kliničkom TNM klasifikacijom, invazijom tumora i udaljenim metastazama u različitim malignim tumorima (319). U opsežnoj meta-analizi koja je obuhvatila 25 studija sa ukupno 3571 pacijentom većinom iz istočne Azije, zatim iz Slovenije, Francuske i Amerike zapažena je ekspresija Stathmin1 u brojnim malignim tumorima uključujući kolorektalni karcinom, adenokarcinom pankreasa, hepatocelularni karcinom, karcinom želuca, jednjaka, pluća, larinksa, jajnika, endometrijuma, cerviksa, dojke, skvamocelularni karcinom kože, nasofaringealni karcinom, gliom i leukemiju. Rezultati iste metaanalize su pokazali da su pacijenti sa visokom ekspresijom Stathmin1 imali znatno kraće posthirurško preživljavanje (328). U skladu ovom meta-analizom Akhtar i sar. 2013. su otkrili da je Stathmin1 prediktor preživljavanja u pacijenata sa skvamocelularnim karcinomom jednjaka IIA stadijuma (323). Povezanost Stathmin1 sa lošom prognozom i metastazama u limfnim nodusima je saopštena u skvamocelularnom karcinomu oralne mukoze, karcinomu dojke, karcinomu urotela gornjih mikračnih puteva, karcinomu jajnika, melanomu, karcinomu grlića materice i endometrijuma (329,330,331,332,333,334).

Ekspresija Stathmin1 je identifikovana kako u pacijenata sa karcinomom kolona tako i u pacijenata sa ulceroznim kolitisom (322, 335). Stathmin1 je u kolorektalnom karcinomu povezan sa metastazama u limfnim čvorovima i sa TNM stadijumom bolesti. Ispitivanjem ekspresije Stathmin1 u odnosu na 5-godišnje preživljavanje zapaženo je da ono za Stathmin1 pozitivne pacijente sa kolorektalnim karcinomom iznosi 39%, dok za Stathmin1 negativne iznosi 64%. U ovoj analizi je istaknuto da je Stathmin1 nezavistan prediktor preživljavanja pacijenata sa kolorektalnim karcinomom (5).

Pre više od dve decinije je zapažena izražena ekspresija Stathmin1 u loše diferentovanim prostatičnim karcinomima, pri čemu se značajno povećanje nivoa Stathmina1 beleži u tumora Gleason 5 i u ćelijama androgen-nezavisnih karcinoma prostate (336).

U karcinomu dojke je ekspresija Statmin1 u inverznoj korelaciji sa ekspresijom estrogenih receptora i povezana je sa veličinom tumora, proliferativnim indeksom, ćelijskom aneuploidijom, sa BRCA1 pozitivnim statusom, sa ekspresijom markera matičnih ćelija- Nestina i sa smanjenim preživljavanjem (326). U eksperimentalnoj studiji Miceli i sar. 2013. je pokazana redukcija rasta karcinoma dojke nakon antistatmin terapije (337).

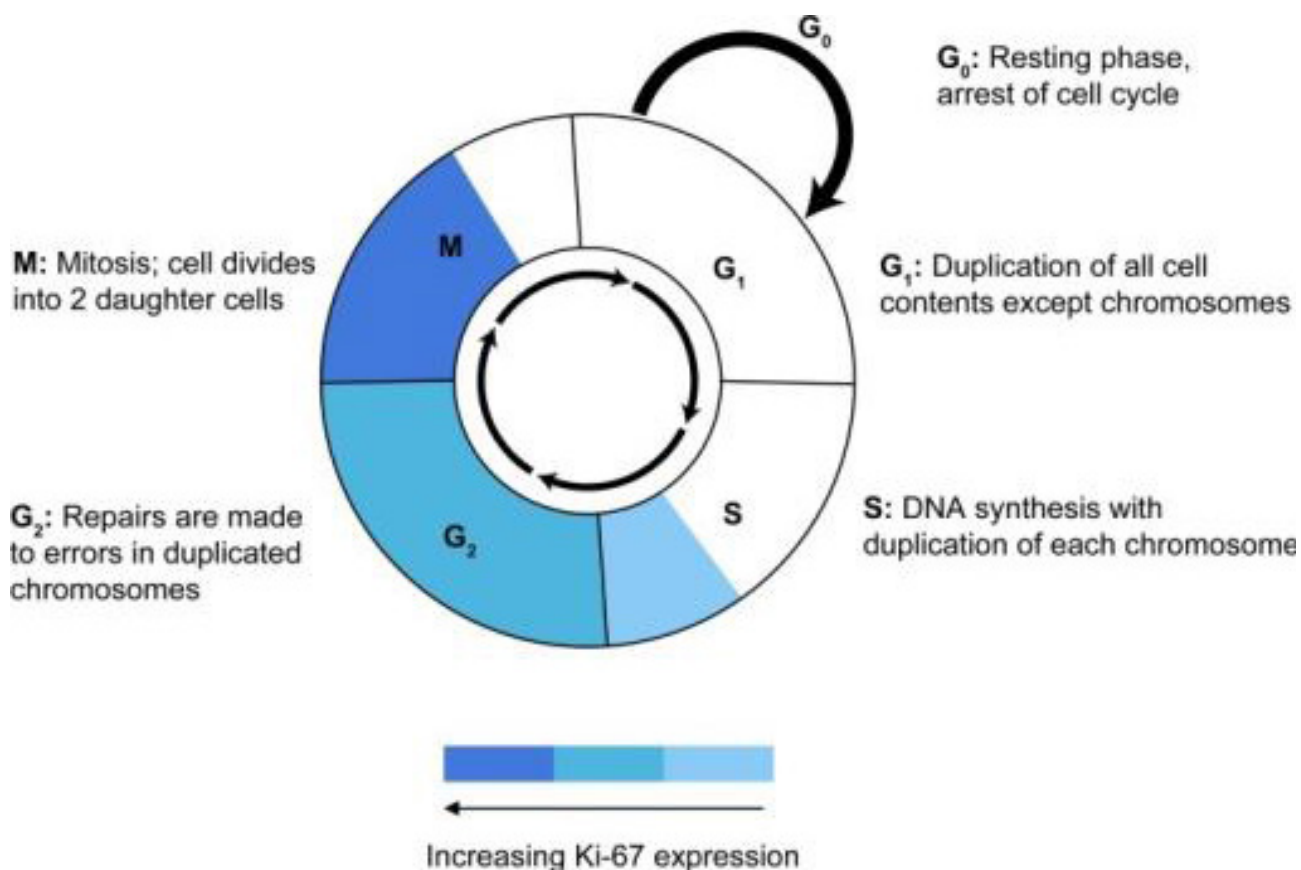
Postoji zapažanje da je nivo ekspresije Stathmina1 značajno veći u pacijenata sa difuznim karcinomom želuca, sa vaskularnom invazijom i sa metastazama u limfnim čvorovima. Takođe je potvrđeno da je pad ekspresije Stathmina1 povezan sa redukcijom proliferativne aktivnosti i migracijom ćelija karcinoma želuca (338).

Dokazano je da inhibicija Stathmina1 može povećati osetljivost mikrotubula na hemoterapiju. Tako je zapaženo da hemoterapeutik Paklitaksel ubrzava skupljanje mikrotubula što dovodi do stagnacije ćelijskog ciklusa u  $G_2$ -M fazi i na kraju do ćelijske apoptoze (339). Sa druge strane je pokazano da prekomerna ekspresija Stathmina1 smanjuje polimerizaciju mikrotubula i značajno smanjuje vezivanje i osetljivost na Paklitaksel(319). U vezi toga postoji mišljenje da Stathmin1 ima presudnu ulogu u blokadi polimerizacije mikrotubula i vezivanju za Paklitaksel, pa se sugeriše da Stathmin1 u odnosu na mikrotubule ima veći potencijal kao terapijski cilj (340).

## **2.3.2. Proliferativni Ki67 antigen**

### **2.3.2.1. Struktura i biološke osobine**

Nuklearni antigen proliferišućih ćelija Ki67 je monoklonsko antitelo napravljeno imunizacijom miša sa ćelijskom linijom L428 Hodgkin limfoma. Ime je dobio po broju originalnih klonova i gradu u kome je nastao (Kiel, Nemačka). Protein Ki67 je kodiran MKI67 genom koji se nalazi na hromozomu 10k25ter i sastoji se od 15 eksona (341). Ovaj gen kodira dva izoformna proteina sa molekulskom težinom od 345 i 395 kDa Protein Ki67 ima poluživot 60-90 minutainalazi se u jedrima ćelija, u aktivnoj fazi svakog ćelijskog ciklusa,odnosno prisutan je tokom  $G_1$ ,S, $G_2$  i M faze, a nije nađen u fazi mirovanja (Go fazi).Ekspresija ki67 varira tokom ćelijskog ciklusa. Ki67 postaje detektibilan tokom srednje-kasne  $G_1$  faze, zatim njegova ekspresija raste tokom S i  $G_2$  faze, a u kasnoj fazi mitoze dolazi do značajnog sniženja nivoa Ki67 proteina i na kraju je odsutan tokom Go faze ćelijskog ciklusa (342). Količina pKi67 u ćelijskom ciklusu reguliše se preciznom ravnotežom između sinteze i razgradnje. Ekspresija proteina Ki67 poklapa se sa ćelijskom tranzicijom tokom mitoze. Pokretanje mitoze zahteva aktivni ulaz ciklina B u jedro tokom tranzicije  $G_2$ / M i smatra se da je ekspresija Ki 67 regulisana proteolitičkim putem, koji kontroliše složeni regulatorni ciklin B / ciklin-zavisna kinaza 2(343).



Slika 6: Ki67 u ćelijskom ciklusu (Izvor: Mulyawan IM, 2019)

Ki67 ima ulogu kako u interfaznim tako i u mitotičnim ćelijama. Već je istaknuto da se njegova distribucija menja tokom napredovanja ćelijskog ciklusa, a ove lokalizacije su u korelaciji sa različitim funkcijama. Tako na primer, Ki67 je tokom interfaze potreban za normalnu ćelijsku distribuciju heterohromatinskih antigena, a tokom mitoze je neophodan za formiranje perihromosomskog sloja (ribonukleoproteinskog omotača koji prekriva hromozome) (341).

### 2.3.2.2. Funkcija i prognostički značaj Ki67 antigena

Protein Ki67 se već decenijama široko koristi kao marker proliferacije humanih malignih tumora (342). Dokazano je da je Ki67 važan za proliferaciju ćelija jer njegovo uklanjanje pomoću *antisense nucleotides* sprečava ćelijsku proliferaciju (344). U brojnim studijama je istaknut značajno veći indeks ekspresije Ki67 u malignim tumorima u poređenju sa benignim i normalnim tkivom. Takođe je zapaženo da se indeks ekspresije Ki67 povećava zajedno sa smanjenjem diferencijacije tumora, a korelira i sa metastazama i stadijumom tumora. Postoji značajan porast broja studija koje su pokazale da je ekspresija Ki67 važan faktor prognoze mnogih malignih tumora uključujući karcinom dojke, pluća, želuca, kolona, prostate, mokraćne bešike, grlića materice itd. (342, 345).

Prisustvo Ki67 u mnogim tumorima pokazuje da ga je moguće koristiti u rutinskoj dijagnostici karcinoma. Ekspresija Ki67 pokazuje proliferativnu aktivnost tumora i povezana je sa inicijacijom, evolucijom, metastazama i prognozom. Aktivnost proliferacije u tumoru može se odrediti izračunavanjem

mitoza, određivanjem citometrijskog protoka u frakciji faze sinteze i imunohistohemijom uz upotrebu reaktivnog antitela protiv ćelijskih proliferirajućih antigena. Najčešće je u upotrebi monoklonsko antitelo Ki67/MIB-1 koje reaguje sa nuklearnim antigenom (342).

Postoji zapažanje da je indeks proliferacije tumorskih ćelija utvrđen frakcijom S faze snažan prediktor ishoda karcinoma endometrijuma (32). U većini studija koje se odnose na karcinim dojke pokazana je signifikantna korelacija ekspresije Ki67 sa ishodom tumorske bolesti (346). Luo i sar. 2019. su u metaanalizi koja je obuhvatila 34 studije i 6180 pacijenata sa kolorektalnim karcinomom pokazali da je visoka ekspresija Ki67 u značajnoj korelaciji sa lošim ukupnim preživljavanjem i preživljavanjem bez bolesti, ukazujući da visoka ekspresija Ki67 može poslužiti kao dragocena prediktivna metoda koja ukazuje na lošu prognozu pacijenata sa karcinomom debelog creva(347).

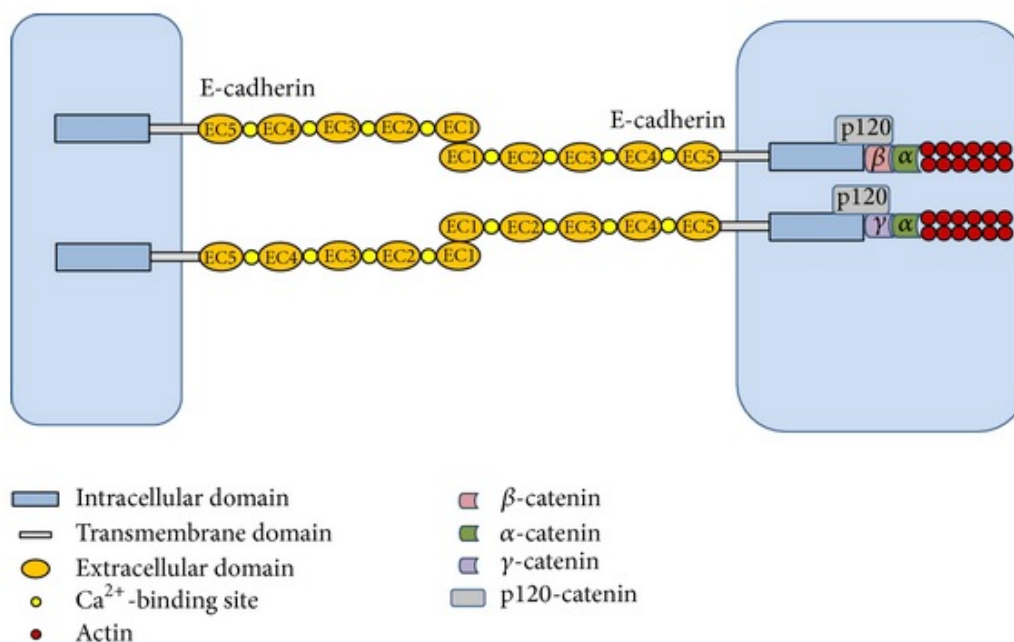
Zbog svoje sveprisutne ekspresije u proliferirajućim ćelijama i prognostičke vrednosti Ki67 indeksa kod mnogih karcinoma, protein Ki67 je potencijalno atraktivna terapijska meta kod raka, a strategije koje inaktiviraju pKi67 obećavajući su anti-proliferativni pristup, sa potencijalno širokom primenom u lečenju karcinoma (343).

### **2.3.3. E-cadherin (Uvomodulin)**

#### **2.3.3.1. Struktura i biološke osobine**

Kadherini čine familiju adhezionih molekula koja ima oko 80 članova. Na humanom hromozomu 16q22.1 je lociran CDH1 gen koji sadrži 16 eksona transkribovanih u 4,5 Kb mRNK i koji kodira onkoprotein E- cadherin. E- cadherin je po svojoj strukturi glikoprotein molekulske mase od 120kD i sastavljan od tri glavna strukturalna domena: jedan domen je transmembranski, drugi citoplazmatski i treći glavni domen je ekstracelularni. Transmembranski domen se povezuje sa citoplazmatskim i ekstracelularnim domenom i svi zajedno obezbeđuju međućelijske i veze ćelija sa ekstracelularnim matriksom čime se čuva integritet tkiva (348,349). Citoplazmatski domen E-cadherina je od ključnog značaja za međućelijske veze i on je u interakciji sa cateninima ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - i p120 catenin). E- catherinska stabilnost u ćelijskoj membrani zavisi od citoplazmatskog p120 catenina (350).

Postoje sledeće klase katherina: E (epitelni), P (placentarni), N (nervni), L-CAM (*liver cell adhesion molecule*) i R (retinalni) katherin (349). Najbolje proučen katherin je E- cadherin koji se nalazi u zonuli adherens epitelnih ćelija, gde spaja aktinske filamente susednih ćelija. E-cadherini obavljaju kalcijum-zavisnu intercelularnu adheziju na međućelijskim spojnica. Ćelijske spojnice su podeljene na tesne, sidrišne i adherentne spojnice. Tesne spojnice su građene od transmembranskih proteina i plazma-membrane susednih ćelija i spajaju citoskelet jedne sa citoskeletom okolnih ćelija i između njih ne postoji intercelularni prostor. Sidrišne spojnice vezuju citoskelet jedne sa citoskeletom druge ćelije ili sa matriksom. Adherentne spojnice vezuju aktinska vlakna između ćelija i između ćelija i matriksa. Spoj aktinskih filamenata sa matriksom obezbeđuju adhezioni proteini tkz. integrini (351).



Slika 7: Šematska struktura E-cadherina i njegovo vezivanje za katetinski protein  
(Izvor: Liu X and Kent M, 2014)

Jezgro atherentne spojnice čini stabilnost kompleksa katherin-catenin i njegove veze sa aktinskim filamentima. Stabilnost atherentne spojnice je od vitalnog značaja za inhibiciju individualne pokretljivosti ćelija i za obezbeđenje arhitektonike tkiva (350). Obzirom da je E-cadherin glavna komponenta athezione spojnice, smanjenje ekspresije ovog glikoproteina u tumorima doprinosi diseminaciji tumorskih ćelija i daljoj progresiji neoplazme (349).

### 2.3.3.2. Funkcije i prognostički značaj E-cadherina

Pored uloge u međućelijskim vezama E-cadherin je uključen u procese embriogeneze i morfogeneze, važan je u održavanju epitelnog fenotipa i u regulaciji homeostaze tkiva, modulacijom različitih signalnih puteva. Brojne studije su pokazale da je E-cadherin supresor tumorske invazije i metastaziranja (349,352). Kako smanjena ekspresija E-cadherina u epitelnim ćelijama dovodi do smanjenog polariteta ćelija i povećanja migratornih i invazivnih karakteristika, to se gubitakom E-cadherina aktiviraju signali koji stimuliraju epitelno-mezenhimnu tranziciju (EMT), pri čemu aktivnu ulogu u EMT imaju Wnt-signalizacija, Rho GTP-aza, EGFR idr. (353). Jedan od glavnih mehanizama za inhibiciju njegove supresorne funkcije je mutacija CDH1 gena. Somatske mutacije ovog gena su identifikovane kod sporadičnih difuznih karcinoma želuca, kolorektalnog karcinoma, lobularnog karcinoma dojke i karcinoma jajnika. Osim mutacija u CDH1 genu i epigenetski faktori takođe modulišu ekspresiju E-cadherina. U nekim tumorima, poput sporadičnog difuznog karcinoma želuca epigenetske promene (hipermetilacija promotora) CDH1 su češće od mutacije gena. Smatra se da *Helicobacter pylori* infekcija, u inicijaciji i progresiji karcinoma želuca, utiče na metilaciju promotora velikog broja supresornih gena uključujući i CDH1 gen (E-cadherin) (348). Redukovana ekspresija E-cadherina u karcinomu želuca je značajno udružena sa metastazama u limfnim čvorovima

i ne zavisi od pola, starosti pacijenta, histološkog gradusa tumora i Tstadijuma (354).

Osim u karcinomu želuca smanjena ekspresija E-cadherina je nađena i u mnogim drugim tumorima poput neuroblastoma, kolorektalnog karcinoma, karcinoma dojke, mokraćne bešike, prostate, pluća, jajnika, multipnom mijelomu i u mnogim tumorima glave i vrata (352, 354, 355, 356, 357, 358).

U kolorektalnom karcinomu smanjena ekspresija E-cadherina je udružena sa starosnom dobi pacijenata, sa infiltrativnim rastom tumora, sa BRAF mutacijama i sa višim AJCC pN statusom, ali ne zavisi od udaljenih metastaza. Brojne studije su identifikovale E-cadherin kao dobar biomarker za prognozu kolorektalnog karcinoma (349, 352).

U meta-analizi koja je obuhvatila 7353 pacijenata sa karcinomom dojke Li i sar. 2017., su zapazili povezanost niske ekspresije E-cadherina sa veličinom tumora, statusom limfnih čvorova, histološkim stepenom diferencijacije, TNM stadijumom i ukupnim preživljavanjem pacijenata (355). Ziaran i sar. 2017. su povezanost niske ekspresije E-cadherina pokazali u karcinomu mokraćne bešike (356), a Abdallah i sar. 2019. su nisku ekspresiju ovog glikoproteina našli kako u karcinomu, tako i u nodularnoj hiperplaziji prostate (357). Gubitak ili aberantna ekspresija E-cadherina je povezana sa metastazama, progresijom i lošom prognozom karcinoma prostate (359).

U skvamocelularnom karcinomu pluća redukovana ekspresije E-cadherina je u pozitivnoj korelaciji sa metastazama u limfnim čvorovima, udaljenim metastazama, invazijom pleure, proliferativnom aktivnošću, relapsom tumora i nepovoljnom prognozom. Istaknuto je da je E-cadherin nezavistan prediktor preživljavanja za skvamocelularni karcinom pluća (358).

U kulturi tkiva je ekspresija E-cadherina identifikovana kao dopunski prediktivni marker za EGFR- ciljanu terapiju RAS "wild" tipa kolorektalnog karcinoma koji može biti rezistentan na Cetuximab i Panitumumab (360).

Iako je E-cadherin transmembranski glikoprotein (od 120kD) on se može odvojiti od ektodomena i osloboditi u rastvorljivom obliku (solubilni sE-cadherin od 80kD) i to objašnjava smanjenu transmembransku ekspresiju E-cadherina. Ovaj solubilni sE-cadherin je visoko eksprimiran u serumu i u ascitesu obolelih od karcinoma jajnika i prediktor je loše prognoze. Malo se zna o tome da sE-cadherin ima biološku funkciju koja je presudna za metastatsko širenje tumora, odnosno da je on moćan induktor angiogeneze, pa u skladu sa tim Tang i sar. 2018. ističu da sE-cadherin može biti potencijalna terapijska meta za karcinom jajnika (361).

### 2.3.4. Angiogeneza

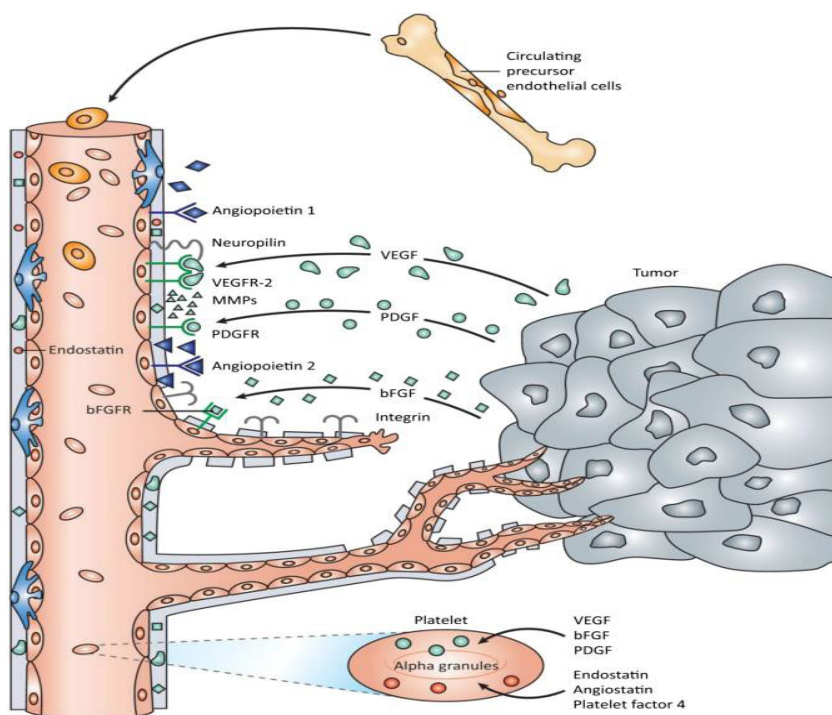
Angiogeneza je biološki proces u kojem novi kapilarni krvni sudovi rastu iz postojeće vaskulature, obezbeđujući tkivima kiseonik i hranljive materije. Proces angiogeneze je složen i sastoji se od četiri faze: **a)** Razgradnja glikoproteina bazalne membrane i druge komponente ekstracelularnog matriksa koji okružuju krvne sudove proteolitičkim enzimima; **b)** aktivacija i migracija endotelnih ćelija; **c)** proliferacija endotelnih ćelija; **d)** endotelne ćelije se transformišu u strukture slične cevčicama i formiraju kapilarne cevi i razvijaju se u nove bazalne membrane (12). U normalnim

uslovima, angiogeneza se javlja samo tokom embrionalnog razvoja, ženskog reproduktivnog ciklusa i sanacije rane, ali aberantna angiogeneza je ključni posrednik i glavni proces u razvoju karcinoma, podržavanju rasta, preživljavanju i migraciji malignih ćelija (362).

Indukcija angiogeneze se događa kada se poremeti ravnoteža između proangiogenih i antiangiogenih faktora. Poremećaji ove ravnoteže mogu biti izazvani hipoksijom i/ili genetskim alteracijama koje aktiviraju onkogene ili inaktiviraju tumor supresor gene (1). Tokom progresije malignih tumora postoji stalna sekrecija induktora angiogeneze poput vaskularnog endotelnog faktora rasta (VEGF), osnovnog faktora rasta fibroblasta (FGF), faktora tumorske nekroze (TNF), endotelnog faktora rasta izvedenog iz trombocita (PDGF), placentarnog faktora rasta (PGF), transformišućeg faktora rasta (TGF), epidermalnog faktora rasta (EGF) i dr (363). Najpotentniji predstavnik proangiogenih faktora je Vaskularni endotelni factor rasta (VEGF), koji je kodiran od VEGF gena lociranog na hromozomu 6p21.3(364).

### 2.3.4.1. Vaskularni endotelni factor rasta (VEGF)

VEGF je glikoprotein od 32-42 kDa, predstavlja ključni molekul koji determiniše formiranje vaskularne mreže. On je mitogen za endotelne ćelije i njegova ekspresija je u korelaciji sa rastom krvnih sudova (365).



Slika 8: Tumorska angiogeneza (Izvor: Zhao Y, 2015)

Porodica VEGF se sastoji iz VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D i faktora rasta placente. VEGF-A je najvažniji regulator angiogeneze. U uslovima hipoksije, Hypoxia-Inducible Factor  $\alpha$  (HIF $\alpha$ ) stimuliše sekreciju VEGF-A. Cirkulišući VEGF-A vezuje se za dva VEGF receptora (VEGFR1 /FLT1 i VEGFR2 /KDR) i podržava preživljavanje, proliferaciju, migraciju i diferencijaciju endotelnih

ćelija (3). VEGF i njegovi receptori su najčešće prekomerno eksprimirani u solidnim tumorima (365).

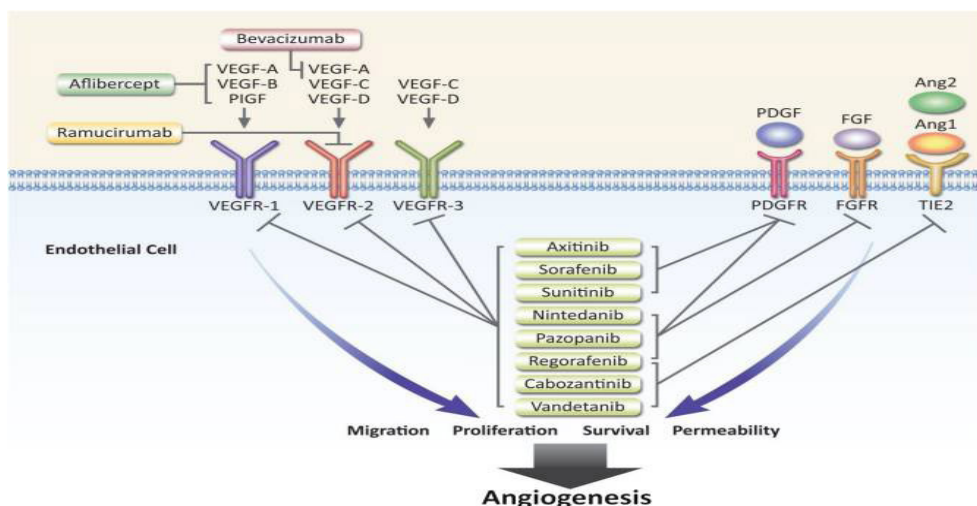
U kolorektalnom karcinomu izražena VEGF ekspresija je povezana sa metastazama u limfnim čvorovima i udaljenim metastazama. Takođe je zapaženo da je preživljavanje ovih pacijenata sa izraženom ekspresijom VEGF značajno gore nego kod onih slabijom ekspresijom VEGF (362). U drugoj studiji je pokazana povezanost ekspresije VEGF sa stepenom histološke diferencijacije i stadijumom kolorektalnog karcinoma (366).

U izveštaju Li i sar. 2019. je istaknuto da je ekspresija VEGF nezavistan prediktor preživljavanja za intestinalni tip karcinoma želuca, ali i da nije povezana sa Lauren klasifikacijom karcinoma želuca (367).

U karcinomu dojke je VEGF ekspresija povezana sa histološkim gradusom i stadijumom tumora, a u inverznoj je korelaciji sa ekspresijom estrogenih receptora (368). U karcinomu endometrijuma je zapaženo da ekspresija VEGF signifikantno korelira sa stadijumom bolesti i histološkim gradusom tumora. Takođe je zapaženo da su preoperativni serumski nivoi VEGF u korelaciji sa stadijumom endometrijalnog karcinoma. U istoj studiji je utvrđeno da je petogodišnje preživljavanje značajno niže u bolesnica sa prekomernom ekspresijom VEGF (369).

Poznato je da funkcija jajnika zavisi od mreže krvnih sudova koji omogućavaju folikulu i / ili žutom telu da dobijaju kiseonik, hranljive materije i hormonalnu podršku, ali abnormalna angiogeneza je uključena u indukciju i razvoj patoloških promena u jajniku, kao što su sindrom policističnih jajnika i karcinom jajnika. Postoji sugestija da je jedan od primarnih regulatora angiogeneze za bolesti jajnika Notch signalni put. Naime, eksperimentalno je pokazano da se ekspresija VEGF može povećati Notch signalizacijom (370).

Intenzivno proučavanje angiogeneze je omogućilo razvoj brojnih modela anti-angiogene terapije, koji se uglavnom baziraju na povećanju gena ili blokadi gena. Povećanje gena uključuje uvođenje egzogenih anti-angiogenih gena u ciljane ćelije, tako da se njihovom ekspresijom zaustavlja angiogeneza tumora. Blokada gena rezultuje inhibicijom prekomerne ekspresije pro-angiogenih gena u ćelijama endotela i drugim ćelijama tumora (363).



Slika 9. Signalizacija angiogeneze i ciljevi inhibicije (Izvor: Clarke JM,2013)



Najčešće korišćena anti-angiogena meta su VEGF-A i njegovi receptori. VEGF-A se vezuje za svoje receptore i stimuliše proliferaciju endotelnih ćelija preko RAS /RAF/MAPK signalnog puta. Prvi ciljani anti-antigen koji je odobren u onkologiji u SAD je Bevacizumab. Bevacizumab je humanizovano IgG1 monoklonsko antitelo protiv VEGF-A. Selektivno se vezuje za VEGF-A koji cirkuliše i sprečava njegovo vezivanje za receptore VEGFR-1 i-2 izraženim na površini endotelnih ćelija (371). Bevacizumab je odobren kao kombinovana terapija za lečenje prve i druge linije metastatskog karcinoma kolona, metastatskog karcinoma bubrega i za terapiju prve linije za neresektabilne, lokalno uznapredovane, rekurentne ili metastatske ne-mikrocelularne karcinome pluća. Bevacizumab je takođe odobren kao monoterapija za odrasle sa progresivnim glioblastomom, zatim za lečenje rekurentnog ili metastatskog karcinoma grlića materice. U SAD je upotreba ovog preparata za lečenje karcinoma dojke bila dovedena u pitanje jer je Uprava za hranu i lekove (FDA) opozvala licencu za proizvod u SAD (372).

#### **2.3.4.2. CD105 (Endoglin)i MVD (microvessel density)**

Endoglin (CD105) je integrisani membranski glikoprotein tip I koji služi kao ko-receptor (sa betaglikanom) za članove transformišuće super-familije faktora rasta-b (TGF-b). TGF-b je pleiotropni citokin koji reguliše osnovne ćelijske procese kao što su proliferacija, migracija, adhezija, organizacija citoskeleta, apoptoza i dr, a smatra se da ima i ključnu ulogu u karcinogenezi. S druge strane, Endoglin funkcioniše kao modulator (inhibira - pojačava) TGF-b-zavisne odgovore u nekoliko tipova ćelija (373).

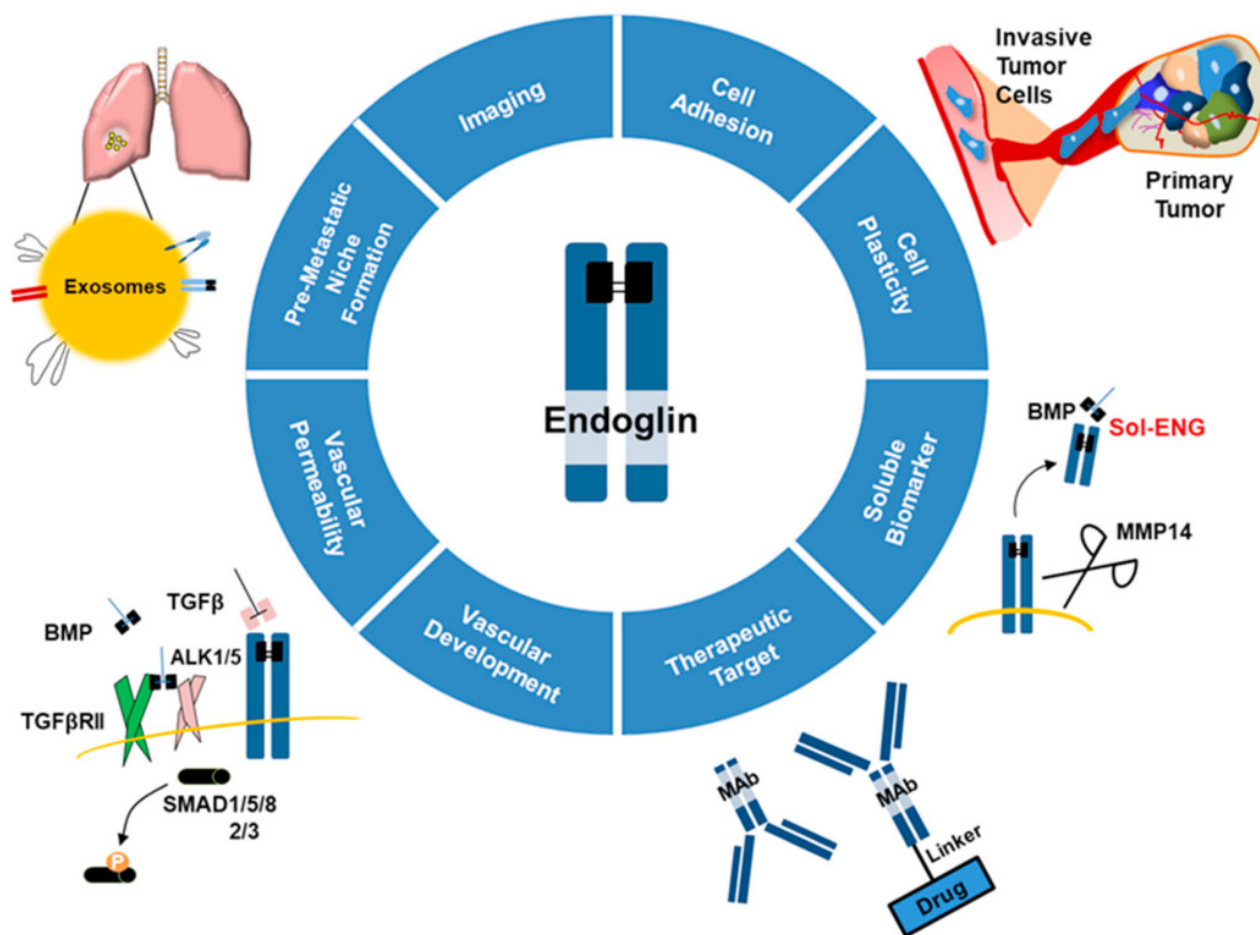
Po svojoj strukturi Endoglin je homodimer od 180 kDa i sastoji se od velikog vanćelijskog domena, pravilnog hidrofobnog transmembranskog domena i kratkog citoplazmatskog repa bogatog serinom/treoninom. Javlja se u dve izoforme, dugoj (L) i kratkoj (S), koje se razlikuju u dužini citoplazmatskog domena. Kratki Endoglin (S) je izoforma karakteristična za starenje ili starenje endotelnih ćelija. Endoglin je kodiran od strane ENG gena lokalizovanog na dugom kraku hromozoma 9 (9q34.11) (374).

Endoglin se takođe javlja i u rastvorljivom obliku (Sol-ENG) koji je otkriven u serumu zdravih i obolelih pacijenata. Sol-ENG je nastao proteolitičkim cepanjem ekstraćelijskog domena Endoglina pomoću matriks-metaloproteinaze 14 (MMP14). Ovaj oblik Endoglina ne izlučuju u krvotok samo endotelne ćelije, već i ćelije karcinoma koje sadrže Endoglin na svojoj površini (375). Rastvorljivi Endoglin (Sol-ENG) je uključen u etiopatogenezu preeklampsije. Kod ove bolesti, povećana ekspresija Sol-ENG-a kroz placentu i smanjena ekspresija VEGF-A uzrokuju poremećaj angiogeneze i vaskulogeneze. Intenzivan inflamatorni odgovor, oštećenje endotelnih ćelija, generalizovani vaskularni otpor i diseminovana intravaskularna koagulacija su opisani kao simptomi (376).

Mutacija gena Endoglina odgovorna je za autosomno dominantnu naslednu hemoragičnu telangiektaziju tipa-1 (HHT1; Osler-Weber-Renduov sindrom). Najistaknutiji simptomi HHT1 su kapilarna displazija i ponavljajuća krvarenja sa promenama u jetri koje se manifestuju kao velike arteriovenske malformacije (374).

Za kvantifikovanje intratumorske angiogeneze koristi se metoda procene gustine mikrocirkulacije (377). Najčešće korišćeni markeri za procenu stepena angiogeneze su CD34 i CD105(Endoglin). Postoji konceptus da je CD105 senzitivniji i specifičniji od CD34, jer CD105 markira one endotelne ćelije koje učestvuju u tumorskoj angiogenezi. Dokazano je da se anti-CD105 antitela vezuju za sve novostvorene endotelne ćelije i krvne sudove i da se vezuju za samo oko 20% prethodno formiranih ne-tumorskih krvnih sudova (378). Takođe je zapaženo da se anti-CD105 antitela ne vezuju za zapaljenske i stromalne ćelije, što smanjuje broj lažno pozitivnih rezultata. Pokazano je da je ekspresija CD105 u korelaciji sa gustinom mikrocirkulacije (379).

MVD (engl. *microvessel density*- mikrovaskularna gustina) određena korišćenjem CD105 antitela može da ukaže na povećan rizik za razvoj lokoregionalne rekurentne bolesti i dobar je pokazatelj tumorske prognoze, a prema savremenim saznanjima CD105 predstavlja i atraktivnu metu za primenu antiangiogene terapije (374,379).



Slika 10: Fiziološke i patološke osobine endoglina (Izvor:González Muñoz T, 2021)

Prekomerna ekspresija CD105 je nađena u aktivnim endotelim ćelijama tumora, a brojni izveštaji ukazuju na prediktorni značaj mikrovaskularne gustine u različitim malignim tumorima (32,377,379,380).

Za karcinom bubrega je pokazano da je CD105 nezavistan prognostički marker nepovoljne prognoze (380). Postoji mišljenje da je mikrovaskularna gustina nezavistan prognostički faktor preživljavanja u karcinomu endometrijuma i statistički je u korelaciji sa stadijumom tumorske bolesti, histološkim tipom i gradusom tumora, dubinom invazije miometrijuma i udaljenim metastazama (18,19,32). U karcinomu prostate je pokazana signifikantna povezanost mikrovaskularne gustine sa indeksom proliferacije, sa Gleason skorom, serumskim PSA nivoima i starijim životnim dobom pacijenta (381). Mikrovaskularna gustina procenjena sa CD105 u kolorektalnom karcinomu je okarakterisana kao nezavistan prognostički parametar za preživljavanje (378).

TRC105 je antitelo koje vezuje Endoglin i sprečava aktivaciju endotelних ćelija. Smatra se da ciljanje Endoglina i VEGF puta istovremeno poboljšava lečenje in vitro i čini se da sprečava rezistenciju na Bevacizumab kod nekih pacijenata sa karcinomom. U toku su randomizirana ispitivanja za procenu kliničke koristi od dodavanja TRC105 terapiji sa Bevacizumabom. Takođe u toku su i dalja ispitivanja za procenu aktivnosti TRC105 sa inhibitorima malih molekula VEGF puta u karcinomu bubrežnih ćelija, hepatocelularnom karcinomu i sarkomu mekih tkiva (379).

U eksperimentu je pokazano da liposomi koji ciljaju Endoglin mogu predstavljati nova strateška sredstva za buduću primenu neoplastičnih i anti-angiogenih terapija usmerenih na Endoglin (374).

## 2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Osnovni zadatak ove studije je ispitivanje povezanosti ekspresije athezionog molekula E-cadherina, regulatornog proteina Stathmin1, proliferativnog markera Ki67, proangiogenog faktora VEGF i mikrovaskularne gustine (MVD) sa kliničkim i patološkim parametrima kolorektalnog karcinoma. U skladu sa ovim, postavili smo sledeće ciljeve istraživanja:

- A) Ispitivanje distribucije kolorektalnih adenokarcinoma u odnosu na: starost i pol pacijenta, lokalizaciju tumora u kolonu, veličinu primarnog tumora, način tumorskog rasta, lokalnu tumorsku invaziju (invazija peritoneuma i/ili okolnih organa), metastaze u regionalnim limfnim čvorovima i udaljene metastaze.
- B) Ispitivanje kolorektalnih adenokarcinoma u odnosu na histološki gradus, invaziju limfatika, vaskularnu i perineuralnu invaziju.
- C) Imunohistohemijsko ispitivanje ekspresije E-cadherina, Stathmin1, Ki67, VEGF i CD105 u tumorskom tkivu.
- D) Korelacija ekspresije E-cadherina, Stathmin1, Ki67, VEGF i CD105 sa polom i starošću pacijenta, lokalizacijom tumora u kolonu, veličinom primarnog tumora, sa načinom tumorskog rasta, sa lokalnom invazijom, metastazama u regionalnim limfnim čvorovima, udaljenim metastazama, sa limfnom, vaskularnom i perineuralnom invazijom.

### **3. MATERIJAL I METODE**

Istraživanje je sprovedeno kao retrospektivno-prospektivna, kliničko-eksperimentalna studija. Za istraživanje je korišćen biopsijski operativni materijal Centra za abdominalnu hirurgiju Kliničkog Centra Crne Gore (KCCG), dobijen resekcijom kolorektalnog karcinoma u periodu od januara 2010. do decembra 2012. godine. U Centru za patologiju KCCG je prema protokolu, od svakog operativnog preparata, u zavisnosti od veličine tumora, uzimano 5 do 15 biopsija, uključujući i po 2-4 biopsije susednog ne-tumorskog tkiva kolona. Nakon fiksacije u 4% neutralnom puferizovanom rastvoru formaldehida, biopsijski material je rutinski obrađivan, kalupljen u parafin i arhiviran.

Na osnovu standardnih histopatoloških izveštaja, iz navedenog perioda, formirana je eksperimentalna (ispitivana) grupa koju su činile operativne biopsije kolorektalnog adenokarcinoma (n=72). Kontrolnu grupu (n=72) su činile operativne biopsije ne-tumorskog tkiva kolona, iz okoline tumora, koje se po protokolu uzimaju iz operativnog preparata koji je dostavljen Centru za patologiju.

Ovo istraživanje je obavljeno u skladu sa Helšinskom deklaracijom i preporukama Svetske Zdravstvene Organizacije, za eksperimente na humanom materijalu. Istraživanje je odobrio Etički odbor KCCG (br.03/01-10615/1, od 19.07.2018.) i Etički odbor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Nišu (br. 12-3182-2/9, od 26.03.2019)

#### **4.1. Ispitivani uzorak**

Za analizu kliničkih parametara (starost i pol pacijenta, lokalizacija tumora u kolonu, veličina primarnog tumora, način tumorskog rasta, lokalna tumorska invazija, metastaze u regionalnim limfnim čvorovima i udaljene metastaze) korišćeni su podaci iz istorija bolesti sa pratećom medicinskom dokumentacijom koja obuhvata kolonoskopiju sa biopsijom i patohistološkom verifikacijom, ultrazvuk (UZ) abdomena, multislajd kompjuterizovanu tomografiju (MSCT) abdomena, magnetnu rezonancu (MR) male karlice, RTG pluća, tumor markere - CEA, C19,9, biohemijske analize idr.

U studiju su uključeni ispitanici sa kolorektalnim adenokarcinomom koji je verifikovan kolonoskopski i potvrđen patohistološkim pregledom.

Iz studije su bili isključeni ispitanici kod kojih je sprovedena preoperativna zračna ili hemoterapija, pacijenti kod kojih je resekcija rađena zbog recidivantne bolesti kao i pacijenti

kod kojih je na definitivnom patohistološkom nalazu potvrđen R<sub>2</sub> resekcioni status. Iz studije su takođe isključeni i pacijenti sa kolorektalnim adenokarcinomoma nastalim na terenu inflamativnih bolesti creva i pacijenti kod kojih je patohistološki potvrđen drugi histološki subtip kolorektalnog carcinoma.

#### **4.1.1. Tkivni uzorci**

Sa parafinskih blokova 72 operisana pacijenta su na mikrotomu *LeicaRM2135(Austria)*, pravljene rezovi debljine 3-4µm, koji su zatim prebačeni na adherentna predmetna stakla. Za preseke koji će se bojiti klasičnom *Hematoxilin-Eosin(H&E)* metodom su korišćena standardna *Isolab (Germany)* predmetna stakla, dok su rezovi za imunohistohemijska bojenja montirani na visoko adherentnim *StarFrost, Waldemar Knittel* predmetnim staklima.

### **4.2. Metode**

Na presecima tkiva dobijenim sa parafinskih blokova su, posle deparafinizacije u ksilolu i hidratacije u opadajućim alkoholima, primenjene sledeće histopatološke metode:

A) Standardna H&E metoda za verifikaciju patohistoloških lezija. Na osnovu ove metode smo dobili informacije o histološkom subtipu tumora, stepenu diferencijacije tumora (histološki gradus), dubini invazije, o invaziji limfnih sudova, vaskularnoj i perineuralnoj invaziji, o inflamativnom infiltratu, dezmoplaziji i prisustvu nekroze.

B) Imunohistohemijska ABC metoda sa anti-stathmin1, anti-E-cadherin, anti-Ki67, anti-VEGF i anti-CD105 antitelima. Primenom odgovarajućih antitela specifičnih za određene vrste receptora u jedru, citoplazmi ili na ćelijskoj membrani, moguća je vizualizacija definisanih antigena u tkivnim presecima, vezivanjem antitela za specifične regione antigena (tkz. *epitope*), pomoću tkivnog enzima, najčešće peroksidaze.

#### **4.2.1. Imunohistohemijski metod**

Imunohistohemijske metode se koriste za imunotipizaciju ćelijskih molekula, a baziraju se na reakciji između antigena i antitela. Za imunohistohemijsko bojenje su korišćeni reprezentativni uzorci tumorskog i susednog netumorskog tkiva, odnosno odabrani su uzorci bez nekroze i hemoragije. Ispitivanje nivoa ekspresije Stathmin1, E-cadherina, Ki67, VEGF i CD105 je rađeno kompleksnom Avidin-biotin (ABC) metodom sa primarnim antitelima čije su karakteristike prikazane u tabeli 8.

Tabela 8. Primarna antitela korišćena u istraživanju

Antitelo	Proizvođač	Kat.br.	Klon	Razblaženje
Rabbit anti-Stathmin1 antibody	Abcam	Ab52630	Polyclonal	1:80
Rabbit monoclonal Ki67 antibody	Abcam	Ab16667	SP6	1:100
Mouse monoclonal E-cadherin antibody	DAKO	IR059	NCH-38	1:50
Purified mouse anti-human VEGF	BD Pharmingen	555036	G153-694	1:100
Mouse monoclonal anti-CD105 antibody	DAKO	M3527	SN6h	1:40

#### 4.2.1.1. Izvođenje imunohistohemijske reakcije

Tkivni rezovi su najpre preneti na adherentna *StarFrost, Waldemar Knittel* predmetna stakla, a zatim deparafinirani kroz seriju ksilola (4x5min), a zatim rehidrirani u seriji alkohola (3x5min). Demaskiranje antigena je rađeno u citratnom puferu (pH=6.00) u mikrotalasnoj pećnici. Posle ispiranja u fosfatnom puferu (PBS pH=7,49) usledilo je blokiranje endogene peroksidaze u trajanju od 20 minuta u 3% metanolskom rastvoru vodik peroksida (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Zatim je usledilo ispitivanje u PBS, a potom inkubacija preko noći na +4°C sa primarnim antitelima (anti-stathmin1, anti-E-cadherin, anti-Ki67, anti-VEGF i anti-CD105). Nakon ispiranja u PBS, obeleženi antigeni su inkubirani sa biotinisanim sekundarnim antitelom (VectastainElite ABCkit, Vector Laboratories, Burlingame, CA) 1 sat na sobnoj temperaturi. Ovo biotinisano antitelo reaguje sa avidinskim molekulima konjugovanim sa peroksidazom. Nakon ispiranja u PBS usledila je vizualizacija pomoću diamino-benzidin-tetrahloridom (DAB), kojim se markiraju mesta antigen-antitelo braon bojom. Zatim je rađeno kontrastno bojenje Mayer-ovim hematoksilinom. Procedura je nastavljena ispiranjem preparata u destilovanoj vodi, a potom je rađena dehidracija kroz rastuće alkohole (70%,95%, 100%) i ispiranje tri puta u ksilolu. Postupak se završava aplikacijom Canada balsama i pokrivanjem tkivnih uzoraka pokrovnim staklom.

#### 4.2.1.2. Evaluacija rezultata tkivne ekspresije

Za odrađivanje indeksa ekspresije Stathmin1 su uzimane u obzir samo imunoreaktivne ćelije sa akumulacijom Stathmin1 u citoplazmi, dok su za evaluaciju ekspresije Ki67 uzimane u obzir samo one imunoreaktivne ćelije kod kojih je antigen akumuliran u jedru ćelija. Gustina mikrocirkulacije je evaluirana određivanjem mikrovaskularnih CD105 pozitivnih struktura.

Gustine Stathmin1, Ki67 i CD105 imunopozitivnih ćelija su određivane po jedinici površine u

mm<sup>2</sup>, pri čemu je korišćen mnogonamenski testni sistem M42 po Weibelu. Objektivnim mikrometrom (Reichert Wien 2mm/200) je kalibrisan testni sistem na mikroskopu *Nikon Eclipse Ni (MBP 99 400)* na uvećanju 400 (10 okular x 40 objektiv), pri čemu je određeno merno polje od 0,016mm<sup>2</sup>. Za evaluaciju gustine imunopozitivnih ćelija/mm<sup>2</sup> se brojalo sukcesivno po 10 "vrućih tačaka". Apsolutna vrednost gustine imunopozitivnih ćelija u "vrućoj tački" se određivala sterometrijski (382). Aritmetička sredina dobijenih vrednosti "vrućih tačaka" je predstavljala konačan broj imunopozitivnih ćelija u mm<sup>2</sup> za slučaj. Zatim je određena medijana i ispitanici su podeljeni u dve grupe: oni sa niskim indeksom ekspresije (vrednosti manje ili jednake vrednosti medijane) i oni sa visokim indeksom ekspresije (vrednosti veće od vrednosti medijane).

Evaluacija ekspresije E-cadherina je određivana na osnovu procenta imunoreaktivnih ćelija, pri čemu su uzimane u obzir samo ćelije sa sitnozrnastim žuto-braon depozitima lokalizovanim na membranama imunoreaktivnih ćelija. Rezultati su klasifikovani na sledeći način: intramembranozna reakcija u <10% ćelija je klasifikovana kao negativna imunoreakcija (-); imunohistohemijska reakcija prisutna u <50% imunoreaktivnih ćelija je klasifikovana kao umerena ekspresija (1+); pozitivna imunoreakcija u >50% ćelija je klasifikovana kao izražena ekspresija (2+) (383). Vrednosti VEGF su evaluirane na identičan način kao i ekspresija E-cadherina.

Reprezentativna polja ekspresije ispitivanih markera za fotografije priložene u ovoj studiji su slikana korišćenjem tri mikroskopska uvećanja (x10,x20 i x40) na mikroskopu *Nikon Eclipse Ni (MBP 99 400)*, opremljenog kamerom.

#### **4.2.1.3. Kontrola kvaliteta i specifičnosti imunohistohemijskog bojenja**

Imunohistohemijske reakcije su urađene uz kontrolu kvaliteta i specifičnosti bojenja, primenom pozitivnih i negativnih kontrola prema preporukama UK NEQAS (UK National External Quality Assessment Service for Immunohistochemistry). Kao pozitivne kontrole su se koristili uzorci invazivnog tkiva kolorektalnog karcinoma koji su ranije višestruko testirani i sigurno sadrže ispitivane antigene. Za negativne kontrole imunohistohemijskog bojenja smo koristili uzorke tkiva koji su tretirani neimunim serumom umesto primarnog antitela.

Ekspresija ispitivanih markera je evaluirana od strane dva nezavisna istraživača (patologa).

#### **4.2.2. Statistička analiza**

U cilju izvođenja neophodnih statističkih testiranja korišćen je statistički programski paket SPSS (ver.19.0 IBM Corp).

Na početku istraživanja sve varijable su opisane klasičnim deskriptivnim metodama statistike. Posmatrane numeričke varijable opisane su klasičnim merama centralne tendencije i merama varijabiliteta: aritmetičkom sredinom, standardnom devijacijom i medijanom. Prikaz dobijenih rezultata dat je tabelarno i grafički.



Za poređenje atributivnih obeležja između analiziranih grupa ispitanika korišćeni su Pirson-ov  $\chi^2$  (Chi Square) test i Fisher-ov exact test.

Za analize vrednosti numeričkih obeležja posmatranja između grupa ispitanika, izbor testa zavisio je od normalnosti raspodele podataka. Normalnost raspodele podataka ispitivan je Kolmogorov-Smirnov testom. Kod neparametarskih podataka korišćen je Kruskal-Wallis test. Kod numeričkih obeležja posmatranja sa normalnom raspodelom podataka i poređenja između dve grupe ispitanika korišćen je t-test. Povezanost između posmatranih parametara ispitivan je koeficijentima korelacije: Pirsonov za parametarske podatke i Spirmanov za neparametarske podatke.

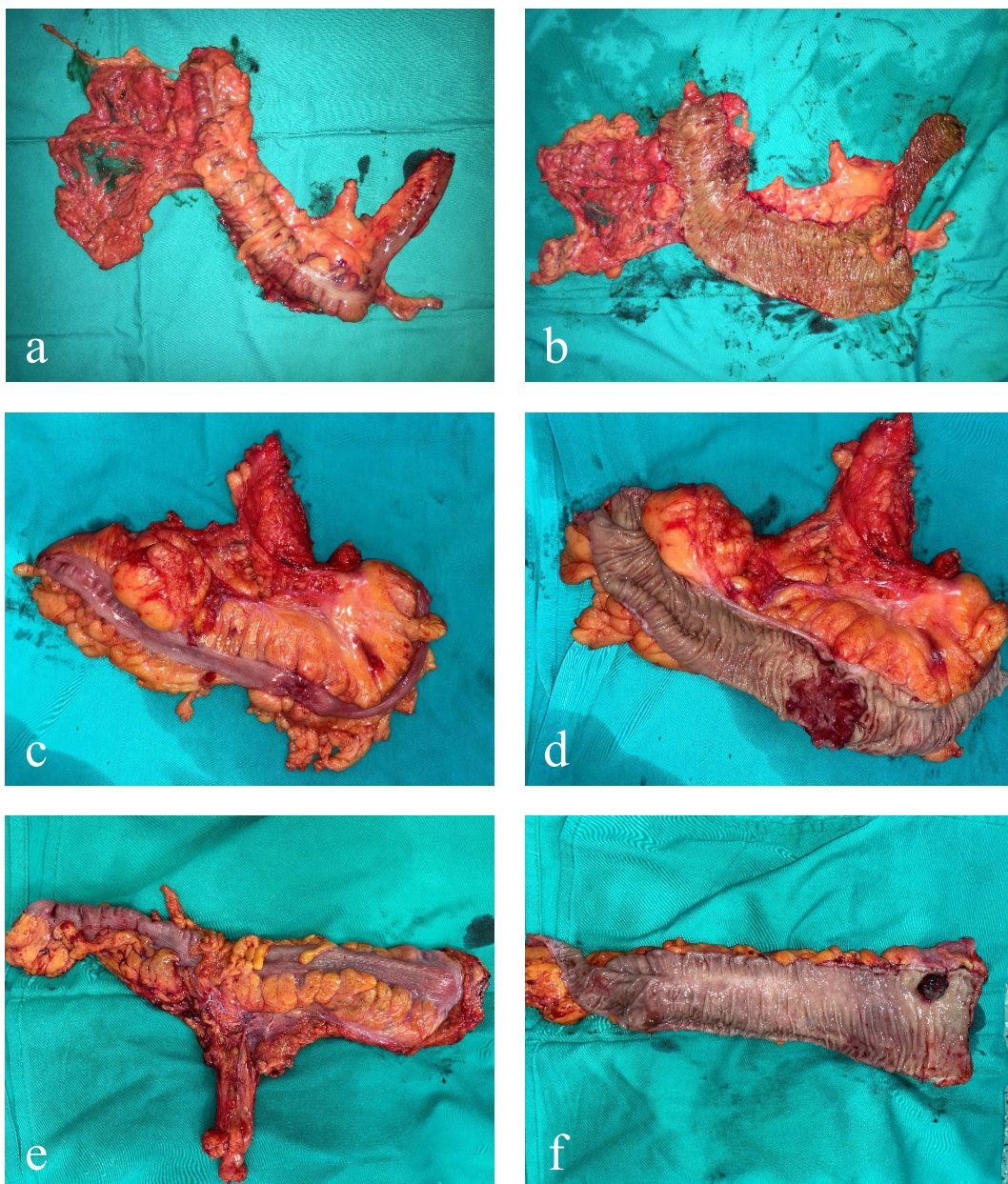
Pomoću ROC (Receiver Operating Characteristic) analize ispitivana je mogućnost da neka promenljiva bude marker i određena granična vrednost za ispitivane markere. Pomoću regresione analize ispitivana je linearna povezanost svakog od navedenih markera i progresija kolorektalnog karcinoma.

Testiranje značajnosti izvršeno je na nivou verovatnoće  $p < 0.05$ .

## 5. REZULTATI

### 5.1. Deskriptivna makro- i mikroskopska analiza

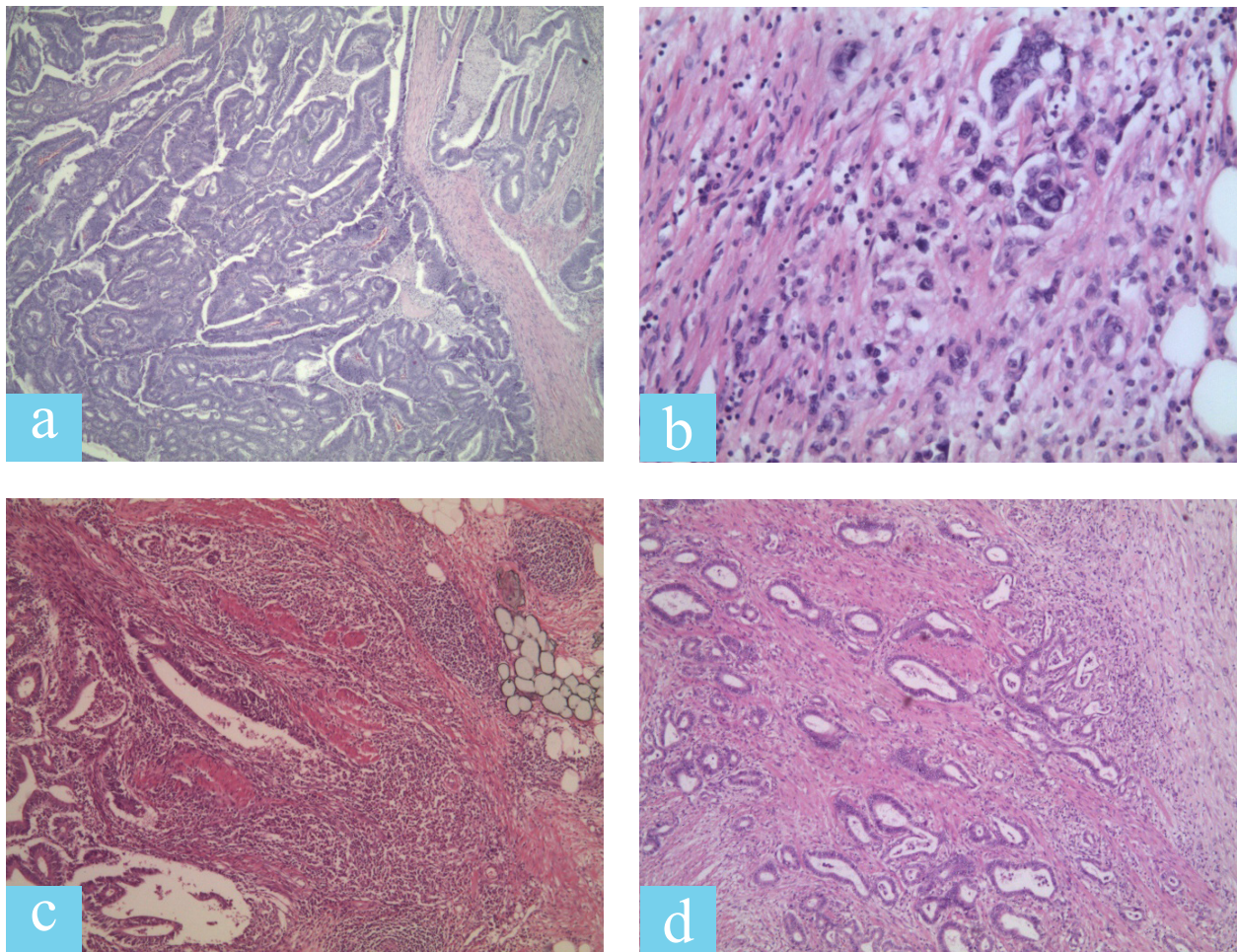
#### 5.1.1. Deskriptivna makroskopska analiza



Slika 1. Kolorektalni adenokarcinom: a) tumor lokalizovan u ascendentnom kolonu; b) ulceroinfiltrativni rast tumora u ascendentnom kolonu; c) seropozitivan tumor lokalizovan u sigmoidnom kolonu; d) ulceroinfiltrativni način rasta tumora u sigmoidnom kolonu; e) tumor lokalizovan u rektumu; f) ulceroinfiltrativni način rasta tumora u rektumu

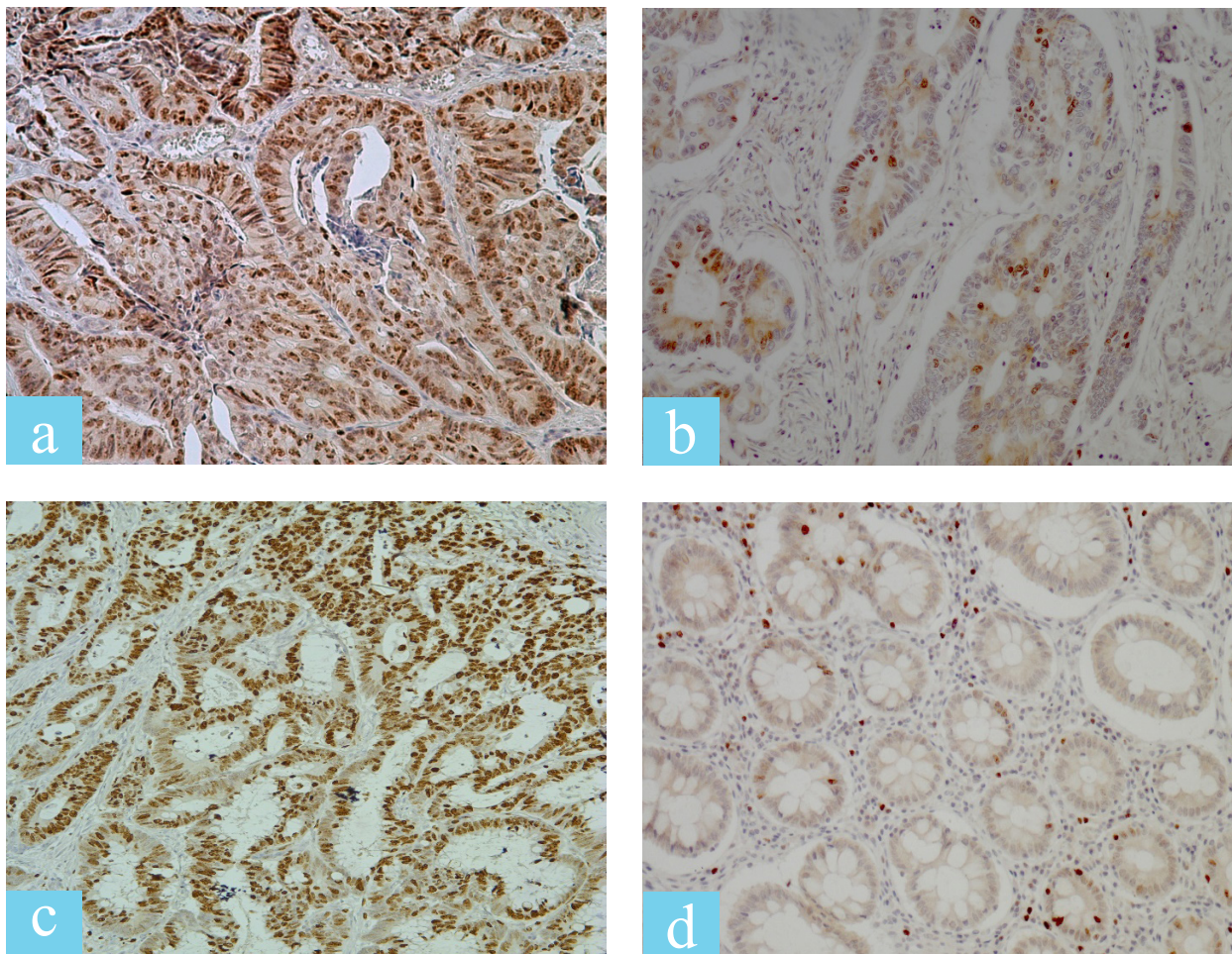
## 5.1.2. Deskriptivna mikroskopska analiza

### 5.1.2.1. Mikromorfološke karakteristike kolorektalnog adenokarcinoma



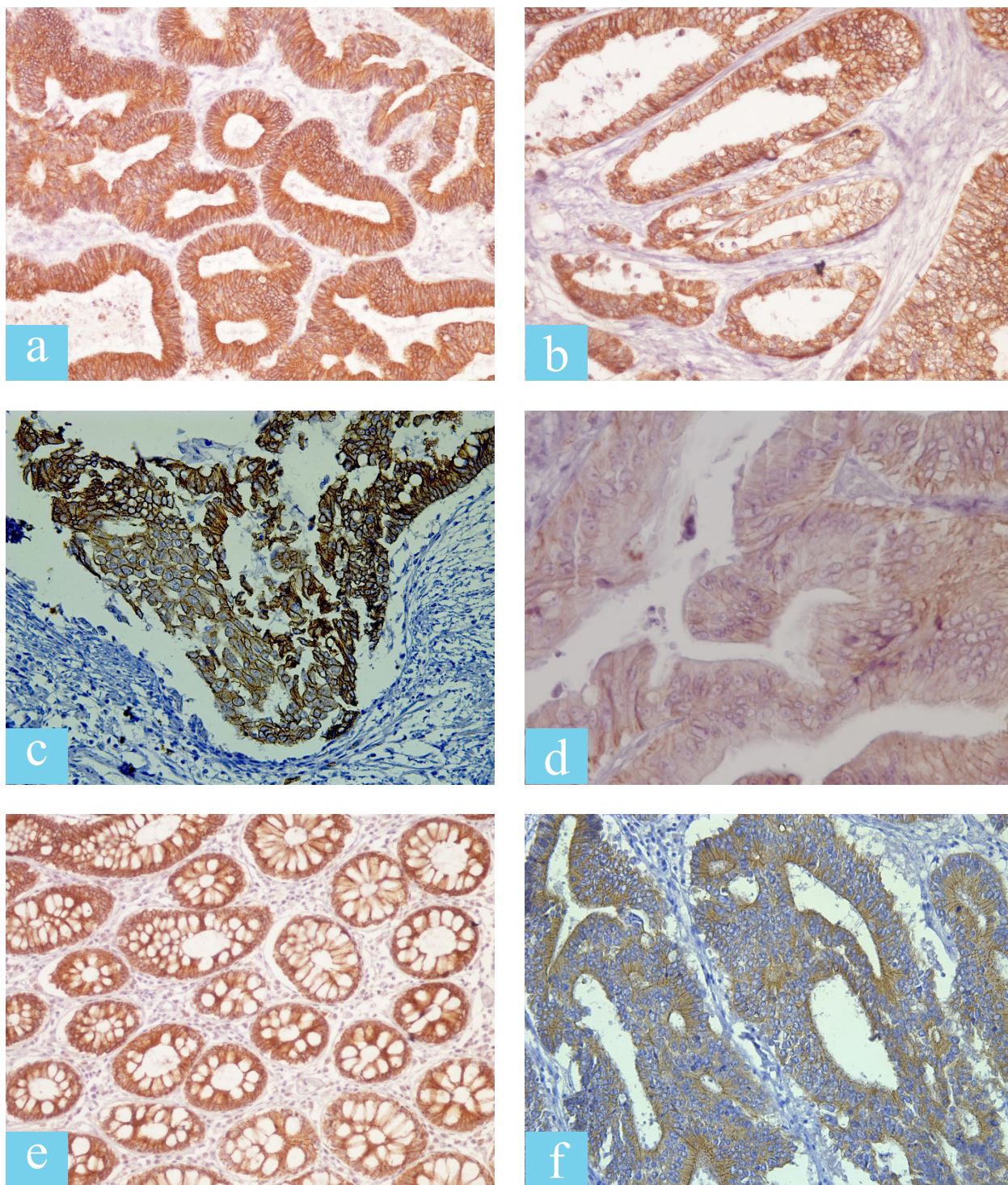
Slika 2. Kolorektalni adenokarcinom: a) dobro diferentovan konvencionalni adenokarcinom (HE x 100) b) tumorsko pupljenje u invazivnom frontu loše diferentovanog adenokarcinoma (HE x 200) c) Crohn-like reakcija u okolini tumorskih plaža ( HE x 100 ) d) dezmoplazija i limfocitni odgovor slabog do srednjeg intenziteta (HEx100)

### 5.1.2.2. Imunoekspresija Ki67/indeks proliferacije u kolorektalnom adenokarcinomu i susednom ne-tumorskom tkivu



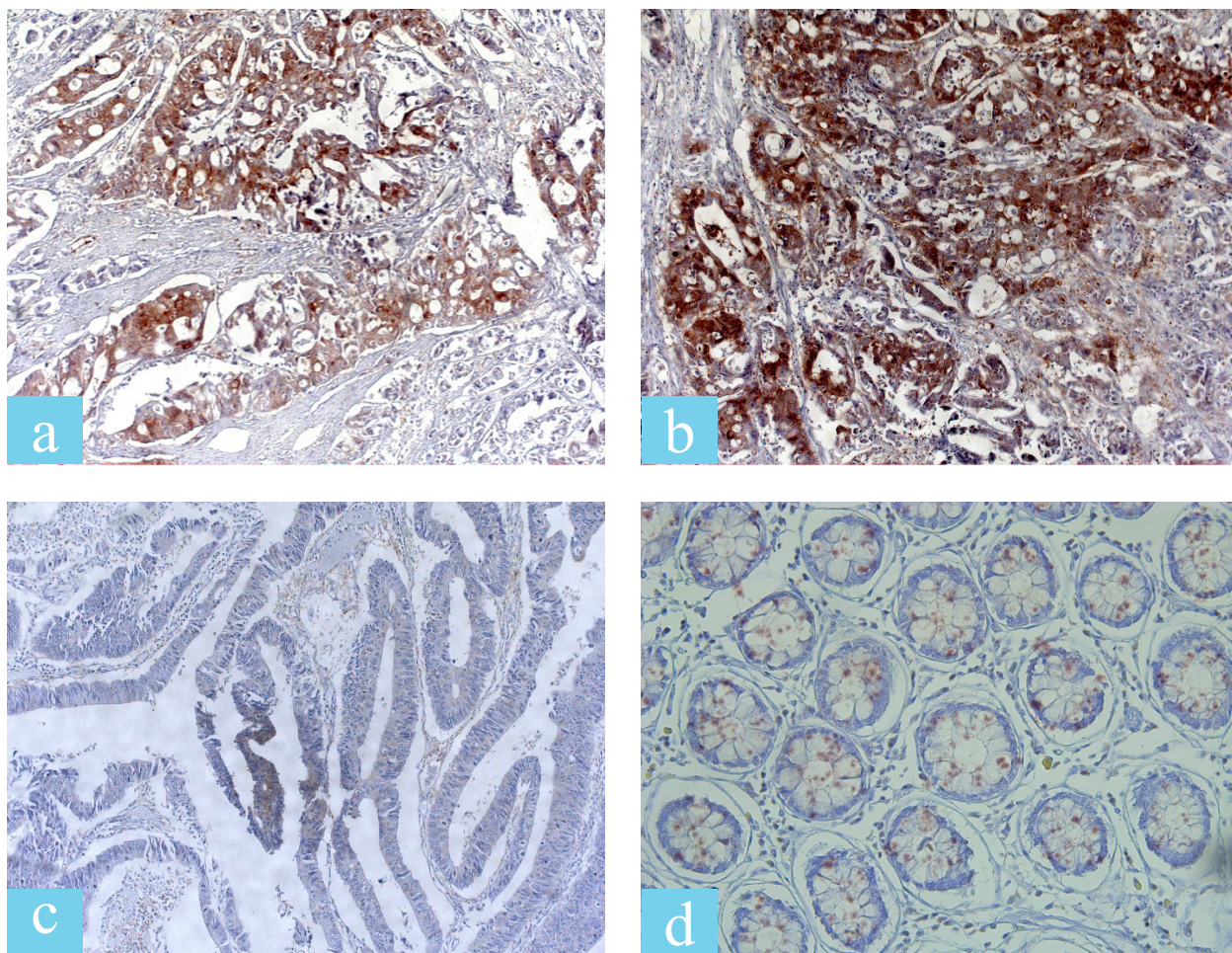
Slika 3. Kolorektalni adenokarcinom i susedno ne-tumorsko tkivo: a) visok proliferativni indeks/Ki67ekspresija u tumorskom tkivu; b) nizak proliferativni indeks/Ki67 ekspresija u tumorskom tkivu; c) izražena proliferativna aktivnost u tumorskom frontu; d) nizak proliferativni indeks u susednom normalnom epitelu (ABCx200)

### 5.1.2.3. Imunoekspresija E-cadherina u kolorektalnom adenokarcinomu i susednom ne-tumorskom tkivu



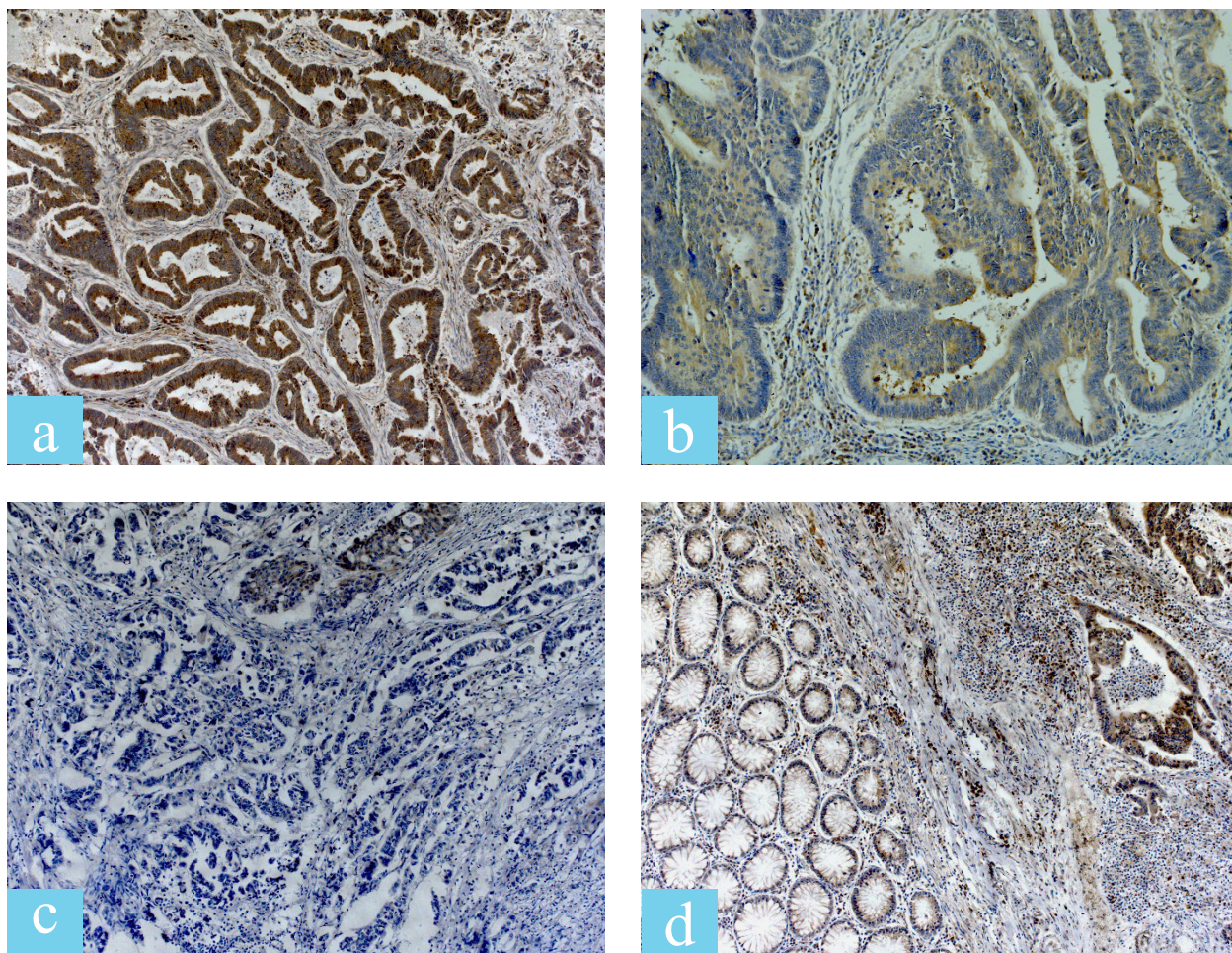
Slika 4. Kolorektalni karcinom i susedno ne-tumorsko tkivo; a) Izražena ekspresija E-cadherina u tumorskom tkivu (ABCx100); b)heterogena ekspresija u epitelu kancerskih žlezda (ABCx200); c) redukovana ekspresije E-cadherina u tumorskim ćelijama na invazivnom frontu (ABCx400); d) odsustvo ekspresije E-cadherina u tumorskom tkivu (ABCx400); e) izražena ekspresija E-cadherina u susednom normalnom epitelu (ABCx200 f) redukovana ekspresija E-cadherina u epitelu kancerskih žlezda (ABCx400)

#### 5.1.2.4. Imunoekspresija Stathmin1 u kolorektalnom adenokarcinomu i susednom ne-tumorskom tkivu



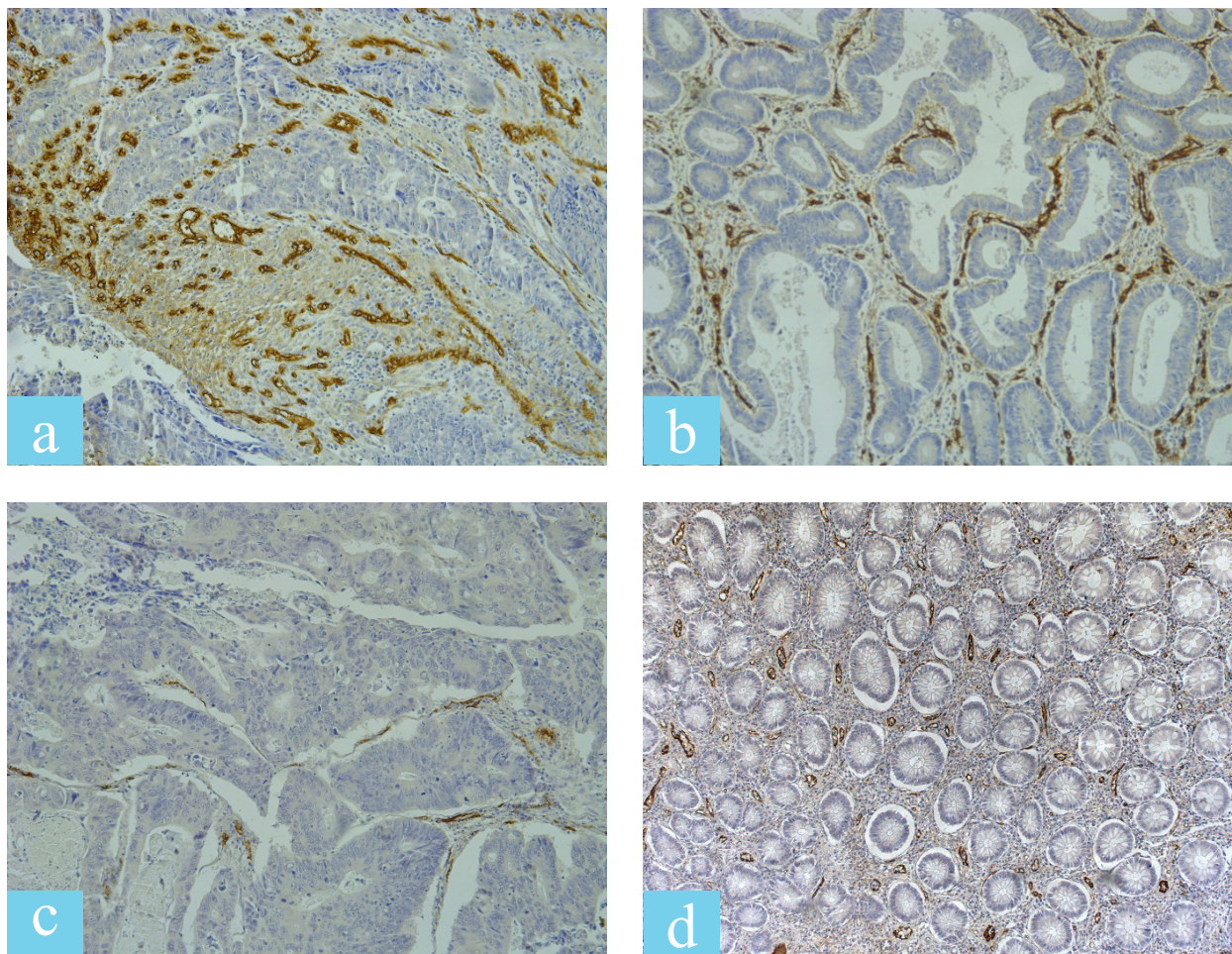
Slika 5. Kolorektalni adenokarcinom i susedno ne-tumorsko tkivo: a) visok indeks ekspresije Stathmin1 u tumorskom tkivu; b) umerena ekspresija Stathmin1 u kancerskim žlezdama; c) nizak indeks ekspresije Stathmin1 u tumorskom tkivu; d) nizak indeks ekspresije Stathmin1 u susednom normalnom epitelu (ABCx200)

### 5.1.2.5. Imunoekspresija VEGF u kolorektalnom adenokarcinomu i susjednom ne-tumorskom tkivu



Slika 6. Kolorektalni adenokarcinom i susjedno ne-tumorsko tkivo: a) izražena ekspresija VEGF u tumorskom tkivu (ABC x100); b) umerena ekspresija VEGF u epitelu kancerskih žlezda (ABCx200); c) nizak nivo ekspresije VEGF u tumorskom tkivu (ABCx100); d) VEGF- ekspresija u tumorskom tkivu i susjednom normalnom epitelu (ABCx100)

### 5.1.2.6. Imunoekspresija Endoglina (CD105) u kolorektalnom adenokarcinomu i susednom ne-tumorskom tkivu



Slika 7. Kolorektalni karcinom i susedno ne-tumorsko tkivo: a) visok indeks mikrovaskularne gustine/CD105ekspresije u tumorskom tkivu (ABCx100); b) Gusta mreža mikrovaskularnih struktura u okolini kancerskih žlezda (ABCx200); c) Nizak indeks mikrovaskularne gustine/CD105ekspresije u tumorskom tkivu (ABCx200); d) CD105-ekspresija u susednom normalnom epitelu (ABCx100).



## 5.2. Statistička analiza

### 5.2.1. Demografske karakteristike ispitanika

#### 5.2.1.1. Pol ispitanika

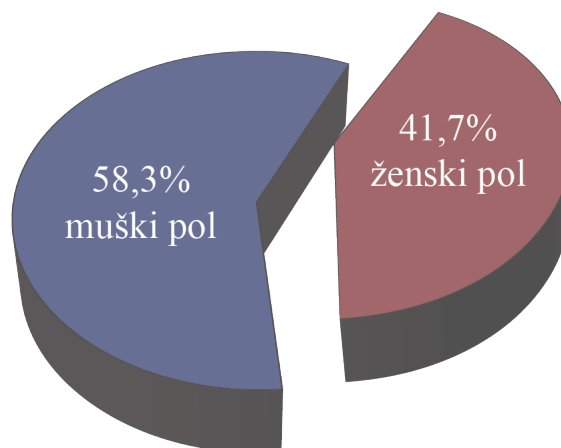
U ispitivanom uzorku pacijenata obolelih od kolorektalnog adenokarcinoma bilo je 42 osobe muškog pola (58.3%) i 30 žena (41.7%) (tabela 1, grafikon 1).

Razlika u zastupljenosti ispitanika po polu nije statistički značajna, na usvojenom nivou pouzdanosti  $p < 0.05$ . ( $\chi^2$ -test=2.000,  $p=0.157 > 0.05$ ).

Tabela 1. Raspodela ispitanika po polu

pol	n	%
Muški	42	58.3
Ženski	30	41.7
UKUPNO	72	100.0

Grafikon 1. Raspodela ispitanika po polu



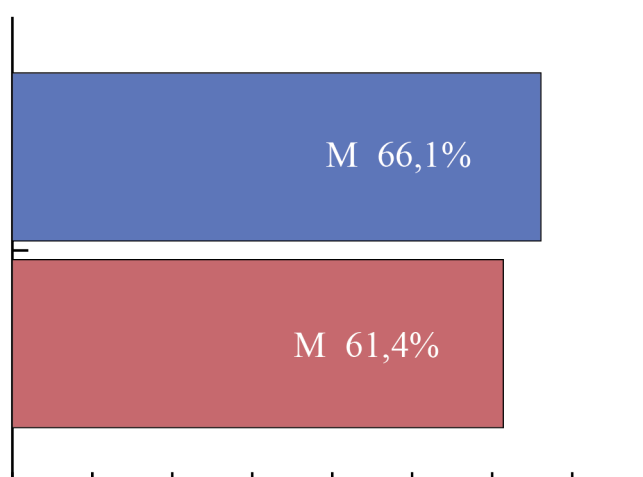
#### 5.2.1.2. Starosno doba ispitanika

Prosečna starosna dob u ispitivanom uzorku bila je  $64.1 \pm 12.3$  godina. Prosečna starost muškaraca ( $66.1 \pm 10.6$  godina) i žena ( $61.4 \pm 14.2$  godina) obolelih od kolorektalnog adenokarcinoma se statistički značajno ne razlikuje (Student-ov t-test,  $p=0.113$ ) (tabela 2. i grafikon 2).

Tabela 2. Deskriptivna statistika starosne dobi po polu i ukupno

pol	kolorektalni adenokarcinom					p
	N	Min	Max	$\bar{X}$	Sd	
Muški	42	34	83	66.1	10.6	0.113
Ženski	30	27	83	61.4	14.2	
Ukupno	72	27	83	64.1	12.3	-

$\bar{X}$ - aritmetička srednja vrednost, Sd-standardna devijacija  
\*signifikantna razlika  $p < 0.05$ , Student-ov t-test



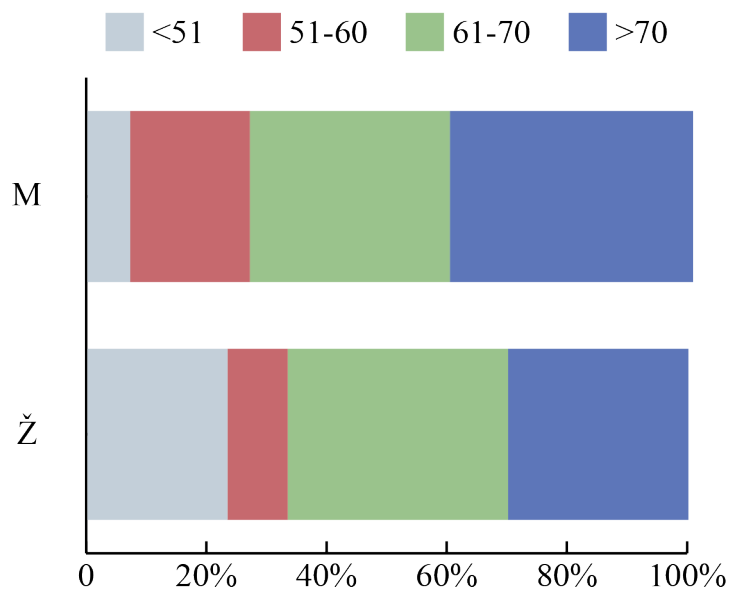
Grafikon 2. Prosečna starosna dob ispitanika po polu

Raspodela po intervalima godina starosti se takođe ne razlikuje značajno po polu pacijenata ( $\chi^2$ -test,  $p=0.185$ ). Sličnost raspodela vidi se na tabeli 3 i grafikonu 3.

Zapaža se da je veća zastupljenost ispitanika u starosnim intervalima od 61-70 i preko 70 godina u odnosu na intervalnu starosnu grupu od 51-60 i do 51 godine starosti u oba pola, ali bez statističke značajnosti.

Tabela 3. Raspodele po intervalima godina starosti i polu

Lokalizacija	n	%
Rectum (+ anorectum +rectosigma)	48	<b>66.7</b>
Sigma (+sin. colon)	9	12.5
Colon ascedens (desni kolon)	11	15.3
Colon transversum	1	1.4
Cekum (+ ileocecum)	3	4.2
UKUPNO	72	100.0



Grafikon 3. Raspodele po intervalima godina starosti i polu

## 5.2.2. Kliničko-patološke karakteristike

### 5.2.2.1. Lokalizacija tumora u kolonu

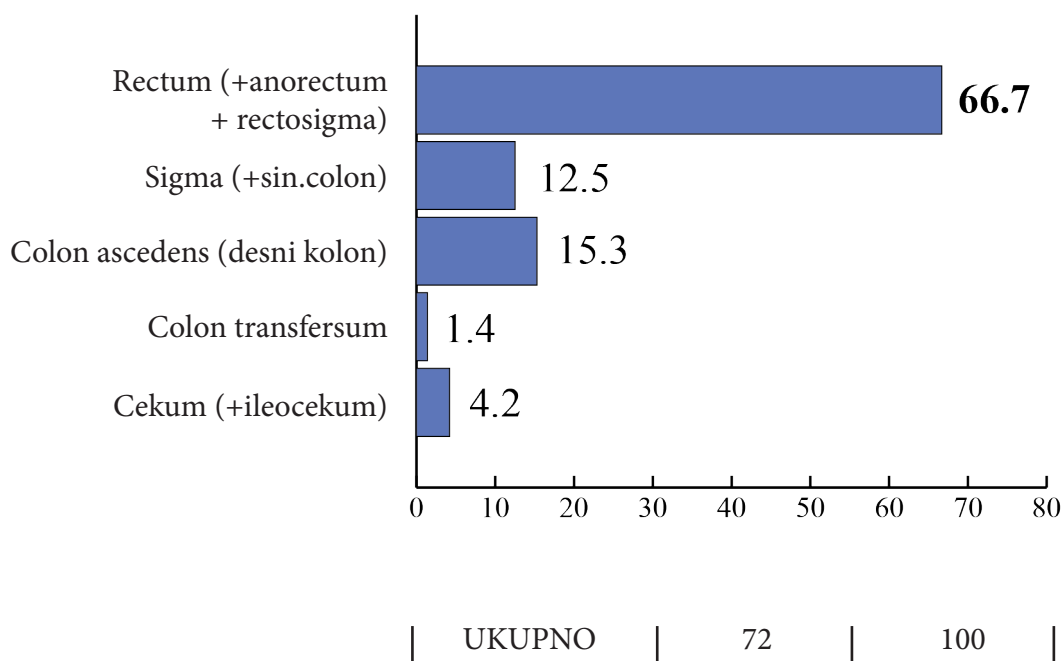
U ispitivanom uzorku pacijenata najčešća lokalizacija karcinoma je bila na rektumu (+ anorectum +rectosigma). Učestalost ove lokalizacije sa 66,7% slučajeva je visoko statistički značajna u odnosu na sve ostale lokalizacije ( $\chi^2$ test,  $p= 0.005$ )

Lokalizacija ovog tumora na sigmi i kolon ascendensu, znatno je ređa (oko 12-15 % slučajeva), dok je lokalizacija u transversalnom kolonu i cekumu izuzetno retka (oko 1-4% slučajeva). (tabela 4., grafikon 4).

Tabela 4. Lokalizacija kolorektalnog adenokarcinoma

Godine starosti	pol			
	muški		ženski	
	n	%	n	%
<51	3	7.1	7	23.3
51-60	8	19.0	3	10.0
61-70	14	33.3	11	36.7
>70	17	40.5	9	30.0
UKUPNO	42	100.0	30	100.0

Lokalizacija kolorektalnog adenokarcinoma  
%



Grafikon 4. Lokalizacija kolorektalnog adenokarcinoma

### 5.2.2.2. Način rasta tumora (makroskopski tip)

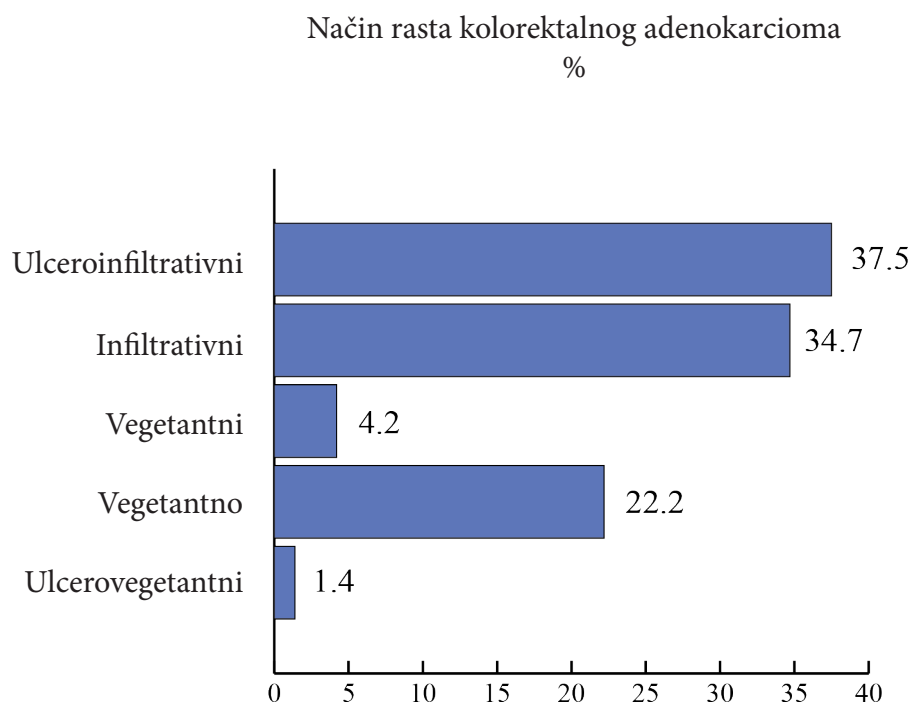
U odnosu na način tumorskog rasta kolorektalni adenokarcinom je najčešće ulceroinfiltrativni, a sa sličnom vjerojatnošću (oko 35% -37% slučajeva) je infiltrativni. Po zastupljenosti sledi vegetantno-infiltrativni način rasta (22.2%). Između ovih, najčešćih izgleda tumora, nema statistički značajne razlike u zastupljenosti na ovom ispitanom uzorku pacijenata ( $\chi^2$ -test,  $p=0.782$ ).

Pojava ostalih makroskopskih tipova tumora (vegetantni, ulcero-vegetantni) veoma je retka pojava (oko 1-4% slučajeva (tabela 5, grafikon 5))

Tabela 5. Način rasta (makroskopski tip) tumora

Makroskopski izgled	N	%
Ulcero-infiltrativni	27	37.5
Infiltrativni	25	34.7
Vegetantni	3	4.2
Vegetantno-infiltrativni	16	22.2
Ulcero-vegetantni	1	1.4
<b>UKUPNO</b>	<b>72</b>	<b>100.0</b>

Grafikon 5. Način rasta (makroskopski tip) tumora



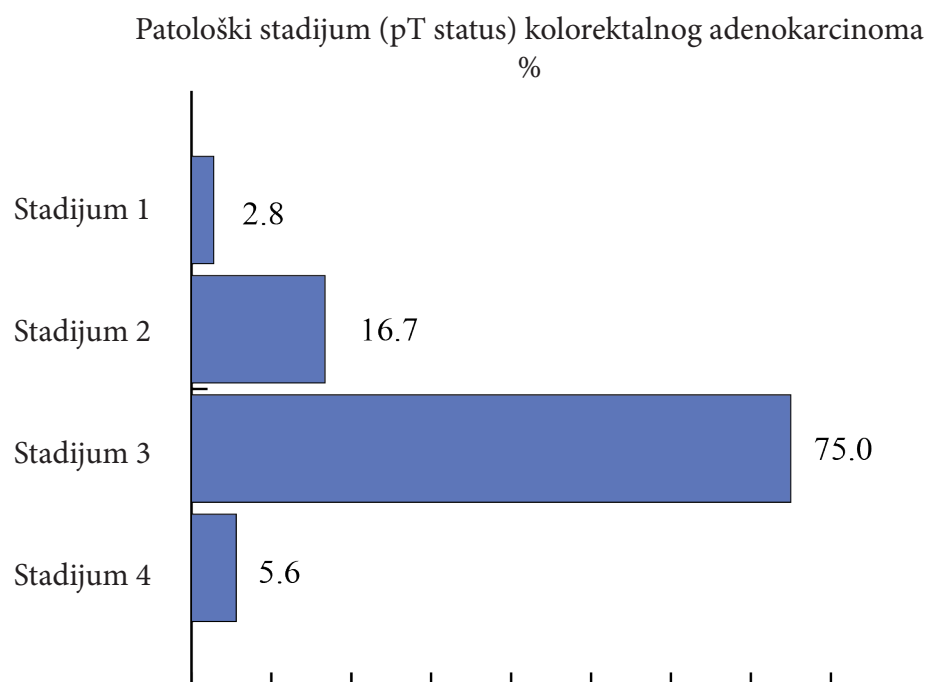
### 5.2.2.3. pT stadijum tumora

Najučestaliji patološki stadijum kolorektalnog carcinoma je pT<sub>3</sub>. U statistički značajnom broju ispitanika kolorektalni karcinom je identifikovan u pT<sub>3</sub> stadijumu ( $\chi^2$ -test,  $p < 0.001$ ).

U 16.7% slučajeva tumor je bio u pT<sub>2</sub> stadijumu, dok se ovi tumori znatno ređe javljaju u pT<sub>1</sub> ili pT<sub>4</sub> stadijumu (2.8- 5.6 % slučajeva) (tabela 6, grafikon 6).

Tabela 6. Patološki stadijum tumora (pTstatus)

Patološki stadijum	n	%
pT1	2	2.8
pT2	12	16.7
pT3	54	75.0
pT4	4	5.6
UKUPNO	72	100.0



Grafikon 6. Patološki stadijum (pTstatus) kolorektalnog adenokarcinoma

#### 5.2.2.4. Metastaze u limfnim čvorovima (pN status)

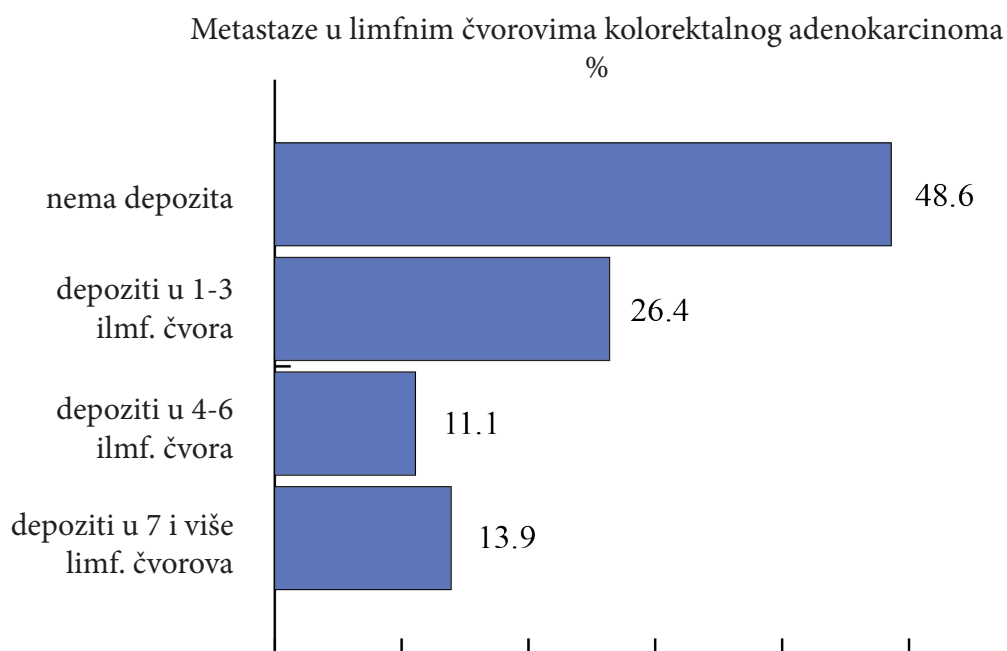
Najveći broj pacijenata sa kolorektalnim karcinomom nije imao metastaze u limfnim čvorovima (35 pacijenata ili 48.6 %), što je značajno više u odnosu na slučajeve prisustva depozita u 1-3 limfna čvora (19 pacijenata ili oko 26.4%,  $\chi^2$ -test,  $p=0.029$  (tabela 7, grafikon7).

Prisustva depozita u 1-3 limfna čvora javlja se sa statistički značajno većom učestalošću (26.4%) u odnosu na broj slučajeva depozita u 4-6 (11.1%) ili 7 i više (13.9%) limfnih čvorova, na usvojenom nivou pouzdanosti ( $\chi^2$ -test,  $p=0.034 < 0.05$ ).

Između učestalosti pojave depozita u 4-6 limfnih čvorova ili 7 i više limfnih čvorova nema značajne razlike (11.1 do 13.9 % slučajeva (tabela12, grafikon 12).

Tabela 7. Metastaze u limfnim čvorovima

Metastaze	n	%
nema depozita	35	48.6
depoziti u 1-3 limf. čvora	19	26.4
depoziti u 4-6 limf. čvora	8	11.1
depoziti u 7 i više limf. čvorova	10	13.9
UKUPNO	72	100.0



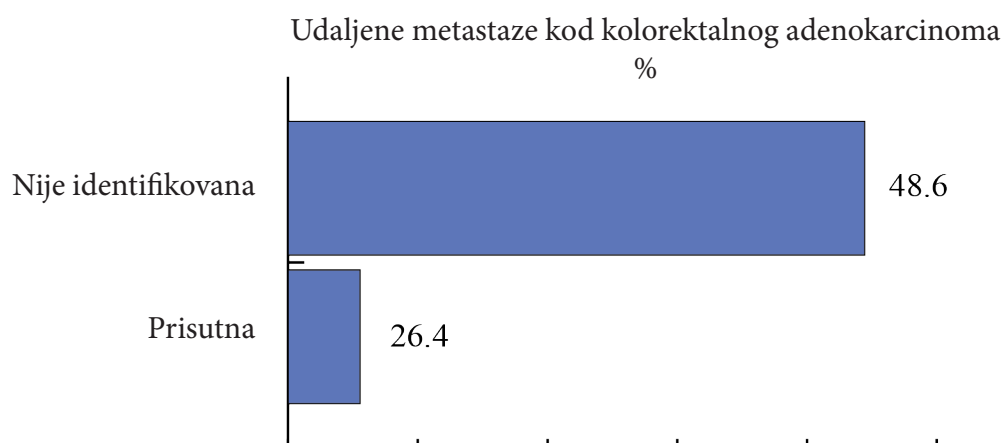
Grafikon 7. Metastaze u limfnim čvorovima

#### 5.2.2.5. Udaljene metastaze

Prisustvo udaljenih metastaza kod kolorektalnog adenokarcinoma je retka pojava sa učestalošću od oko 11%. Sa statistički visokom vjerovatnošću, čiju značajnost nije potrebno dokazivati (89% slučajeva), kod ispitivanog tumora, udaljene metastaze nisu identifikovane. (tabela 8, grafikon 8).

Tabela 8. Udaljene metastaze

Udaljene metastaze	n	%
Nisu identifikovane	64	88.9
Prisutne	8	11.1
UKUPNO	72	100.0



Grafikon 8. Udaljene metastaze

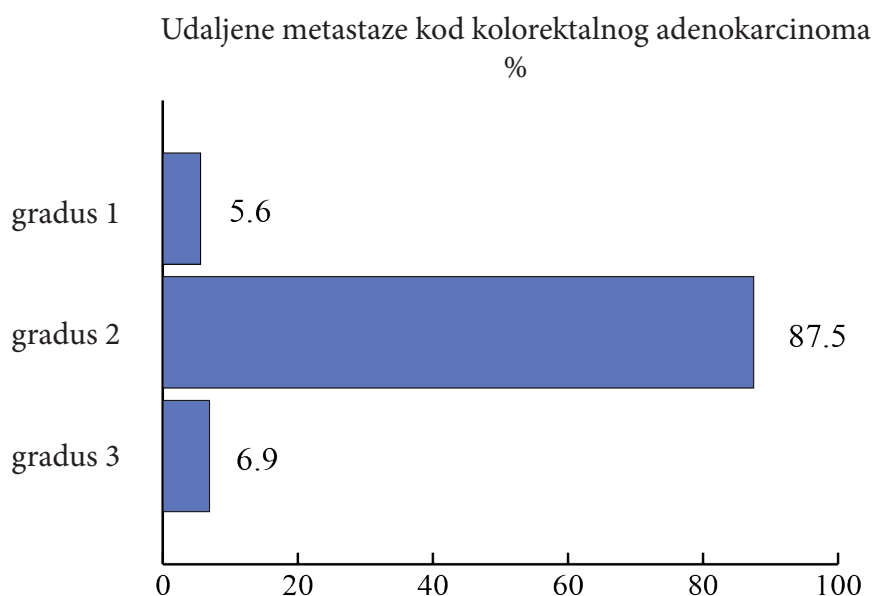
### 5.2.2.6. Histološki gradus

Najveći broj kolorektalnih adenokarcinoma (87,5%) je bio srednje diferentovan (HG 2), što je signifikantna učestalost koja se ne mora posebno dokazivati ( $\chi^2$ -test,  $p < 0.001$ ).

Samo u 5.6- 6.9 % slučajeva ovaj tip tumora je bio u histološkom gradusu 1 ili 3 (tabela 9, grafikon 9).

Tabela 9. Histološki gradus tumora

Histološki gradus	n	%
gradus 1	4	5.6
gradus 2	63	<b>87.5</b>
gradus 3	5	6.9
UKUPNO	72	100.0



Grafikon 9. Histološki gradus kolorektalnog adenokarcinoma

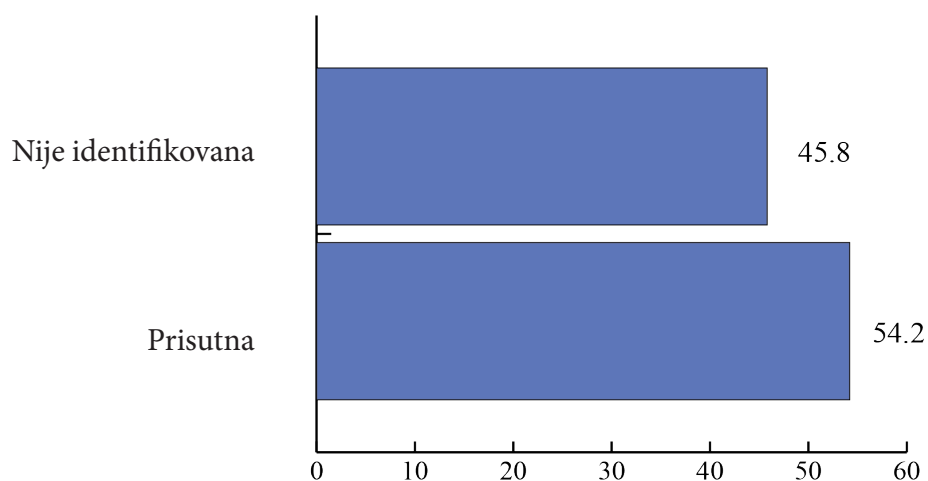
### 5.2.2.7. Invazija limfnih sudova

Postoji mala razlika u učestalosti broja slučajeva kolorektalnog adenokarcinoma sa invazijom limfnih sudova u odnosu na slučajeve kod kojih invazija limfatika nije identifikovana (54.2% prema 45.8% slučajeva). Statističkim testiranjem je utvrđeno da razlika između ovih učestalosti nije značajna ( $\chi^2$ -test,  $p = 0.480$ ) (tabela 10, grafikon 10).



Tabela 10. Invazija limfnih sudova

Invazija limfnih sudova	n	%
Nije indetifikovana	33	45.8
Prisutna	39	54.2
Ukupno	72	100.0

Invazija limfnih sudova kod kolorektalnog adenokarcinoma  
%

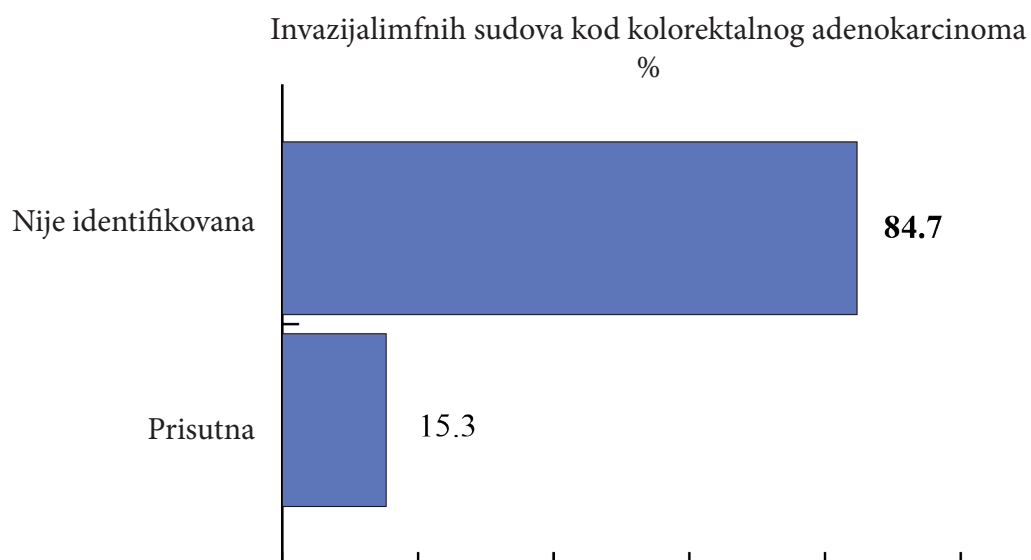
Grafikon 10. Invazija limfnih sudova

#### 5.2.2.8. Invazija krvnih sudova

U signifikantno velikom broju slučajeva (84,7% slučajeva,  $\chi^2$ -test,  $p < 0.001$ ), invazija krvnih sudova nije identifikovana u pacijenata sa kolorektalnim adenokarcinomom (tabela 11, grafikon 11).

Tabela 11. Invazija krvnih sudova

Invazija krvnih sudova	n	%
Nije identifikovana	61	<b>84.7</b>
Prisutna	11	15.3
UKUPNO	72	100.0



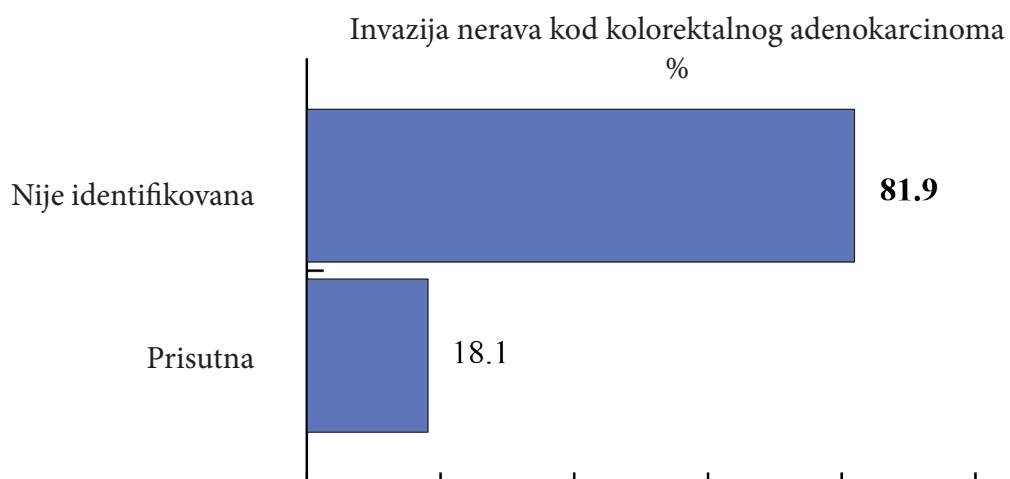
Grafikon 11. Invazija krvnih sudova

#### 5.2.2.9. Perineuralna invazija

U statistički značajnom broju slučajeva (81,9%;  $\chi^2$ -test,  $p < 0.001$ ) kolorektalnog karcinoma perineuralna invazija nije identifikovana (tabela 12, grafikon 12).

Tabela 12. Perineuralna invazija

Perineuralna invazija	H	%
Nije identifikovana	59	81.9
Prisutna	13	18.1
UKUPNO	72	100.0



Grafikon 12. Perineuralna invazija

### 5.2.2.10. Astler Coller stadijum tumorske bolesti

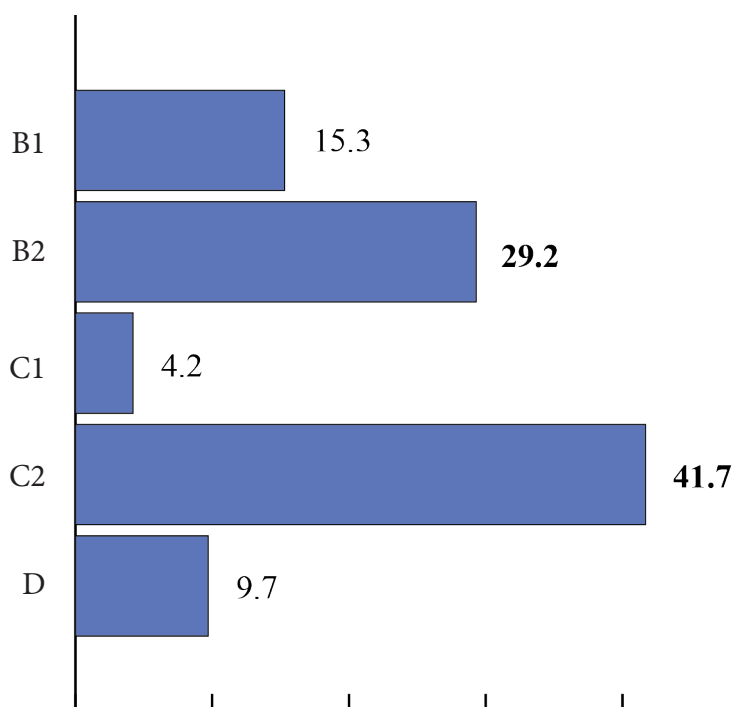
Po Astler Coller klasifikaciji, kolorektalni karcinom je naučestaliji u C<sub>2</sub> stadijumu tumorske bolesti (41,7% slučajeva). Po zastupljenosti sledi B<sub>2</sub> stadijum (29,2% slučajeva), pri čemu ne postoji signifikantna razlika u distribuciji kolorektalnog karcinoma između ova dva stadijuma ( $\chi^2$ -test,  $p=0.208$ ).

Takođe, ne postoji značajna razlika u učestalosti tumora između stadijuma B<sub>1</sub> i B<sub>2</sub> ( $\chi^2$ -test,  $p=0.077>0.05$ ), po ovoj klasifikaciji. Međutim, učestalost kolorektalnog karcinoma u stadijumu C<sub>2</sub> značajno je veća nego u B<sub>1</sub> stadijumu ( $p=0.003<0.05$ ). Znatno je ređa pojava kolorektalnog karcinoma u D stadijumu (oko 10% slučajeva) (tabela 13, grafikon 13).

Tabela 13. Astler Coller stadijum tumora

Astler Coller stadijum	n	%
B1	11	15.3
B2	21	29.2
C1	3	4.2
C2	30	41.7
D	7	9.7
UKUPNO	72	100.0

Astler Coller stadijum kolorektalnog adenokarcinoma  
%



Grafikon 13. Astler Coller stadijum tumora

## 5.2.3. Imunohistohemijsko ispitivanje ekspresije Ki67, Stathmin1, E-cadherina, VEGF i CD105 u kolorektalnom karcinomu i susednom ne-tumorskom tkivu

### 5.2.3.1. Ekspresija nuklearnog proliferativnog antigena Ki67

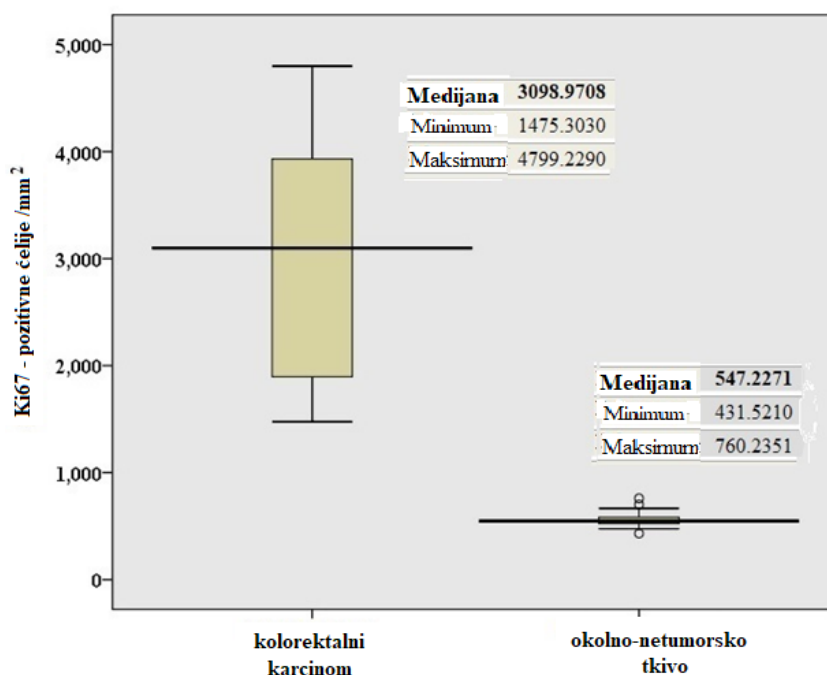
Imunohistohemijskim ispitivanjem ekspresije nuklearnog proliferativnog antigena Ki67 dobijene su apsolutne veličine rasprostranjenosti imunopozitivnih ćelija u mm<sup>2</sup>.

Osnovne karakteristike ovih veličina (medijana, minimalne i maksimalne vrednosti, signifikantnost razlika) za ekspresiju Ki67 u tumorskom i kontrolnom netumorskom tkivu prikazuju tabela 14 i grafikon 14.

U odnosu na kontrolnu grupu - ne tumorsko tkivo, u tumorskom tkivu se uočavaju statistički značajno više vrednosti ekspresije Ki67 imunopozitivnih ćelija u jedinici površine ( $p < 0.001$ ).

Tabela 14. Ekspresija Ki67 u kolorektalnom adenokarcinoma i u susednom netumorskom tkivu

Varijable	Grupa		p
	Kolorektalni karcinom	Susedno netumorsko tkivo	
Ekspresija Ki67			
<b>Medijana</b>	<b>3098.9708</b>	<b>547.2271</b>	<b>&lt;0.001*</b>
Minimum	1475.3030	431.5210	
Maksimum	4799.2290	760.2351	
<b>*signifikantna razlika <math>p &lt; 0.05</math> (Medijana test)</b>			



Grafikon 14. Box-plot dijagram Ki67

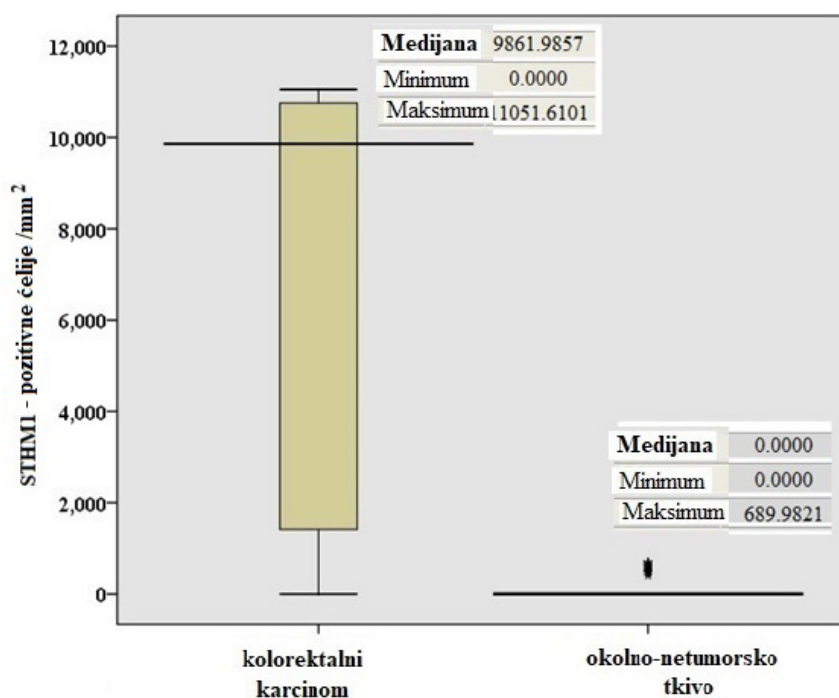
### 5.2.3.2. Ekspresija Stathmin 1 (STMN1)

Imunohistohemijska ekspresija Stathmin1 izražena apsolutnim brojem imunopozitivnih ćelija u mm<sup>2</sup> (medijana = 9861.9857) u tkivu kolorektalnog karcinoma značajno je veća u odnosu na kontrolnu grupu-netumorsko tkivo ( $p < 0.001$ ). U uzorcima ne-tumorskog tkiva samo su u 20.8% (15 uzoraka od ukupno 72) otkrivene Stathmin1 imunopozitivne ćelije. Znatna većina ćelija je bila imunonegativna pa je označena nulom i zato je medijana ove grupe = 0.000 (tabela 15 i grafikon 15).

Tabela 15. Ekspresija STMN1 u kolorektalnog adenokarcinomu i u susjednom netumorskom tkivu

Variable	Grupa		p
	Kolorektalni karcinom	Susedno netumorsko tkivo	
Ekspresija STMN1			
<b>Medijana</b>	<b>9861.9857</b>	<b>0.0000</b>	<b>&lt;0.001*</b>
Minimum	0.0000	0.0000	
Maksimum	11051.6101	689.9821	

\*signifikantna razlika  $p < 0.05$  (medijana test)



Grafikon 15. Box-plot dijagram STMN1

### 5.2.3.3. Ekspresija E-cadherina

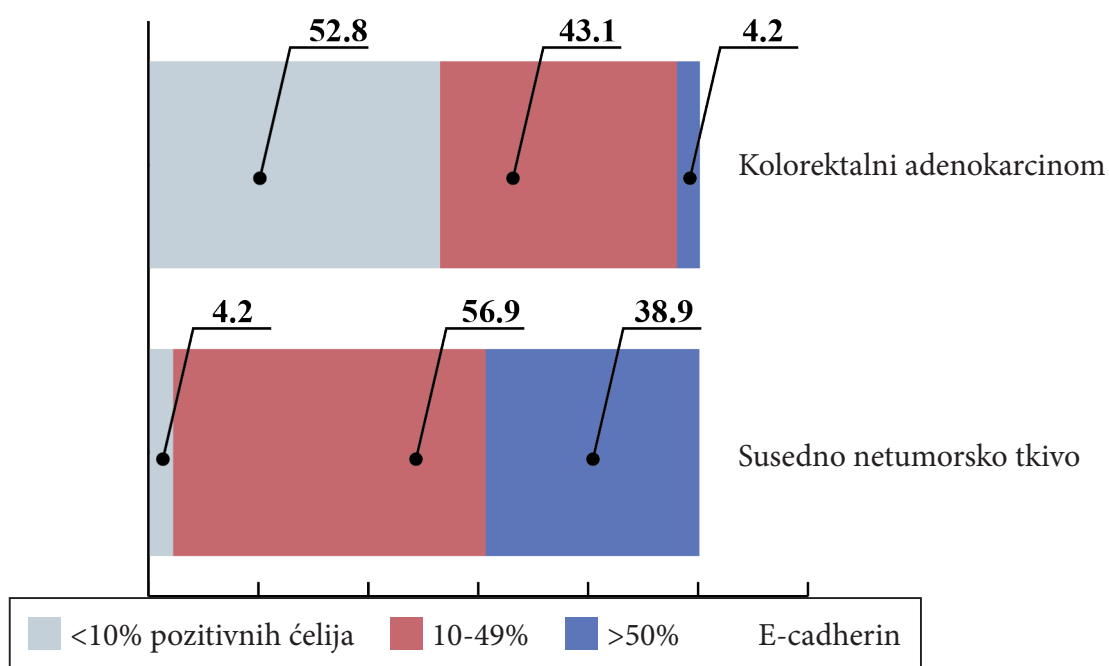
Upoređenjen ekspresije E-cadherina u kolorektalnom karcinomu i u kontrolnoj grupi (susedno ne-tumorsko tkivo) uočava se statistički znalajna razlika ( $p < 0.001$ ).

Grupe se statistički ne razlikuju po zastupljenosti umerene ekspresije, budući da je umerena ekspresija E-cadherina verifikovana u 43,1% slučajeva u grupi kolorektalnih karcinoma i u 56.9 % slučajeva u kontrolnoj grupi ( $\chi^2$ -test,  $p = 0.239$ .)

Značajna razlika u ekspresiji E-cadherina između grupa se uočava kada se uporede slučajevi odsustva ekspresije (<10% pozitivnih ćelija), kojih je kod kolorektalnog adenokarcinoma bilo u 52,8% slučajeva prema 4,2% u susednom ne-tumorskom tkivu ( $p < 0.001$ ). Zatim postoji značajno veća zastupljenost izražene ekspresije, E-cadherina u ne-tumorskom tkivu u odnosu na tkivo kolorektalnog adenocarcinoma (38,9% prema 4,2% slučajeva,  $p < 0.001$ ) (tabela 16 i grafikon 16).

Tabela 16. Ekspresija E-cadherina u kolorektalnom adenokarcinomu i u okolnom netumorskom tkivu

E-cadherin	Grupe				p
	Kolorektalni karcinom		Susedno netumorsko tkivo		
	n	%	n	%	
0- <10% (-)	38	52.8	3	4.2	<0.001*
10-49% (+)	31	43.1	41	56.9	
>50% (++)	3	4.2	28	38.9	



Grafikon 16. Ekspresija E-cadherina u kolorektalnom adenokarcinomu i u susednom netumorskom tkivu

### 5.2.3.4. Ekspresija VEGF

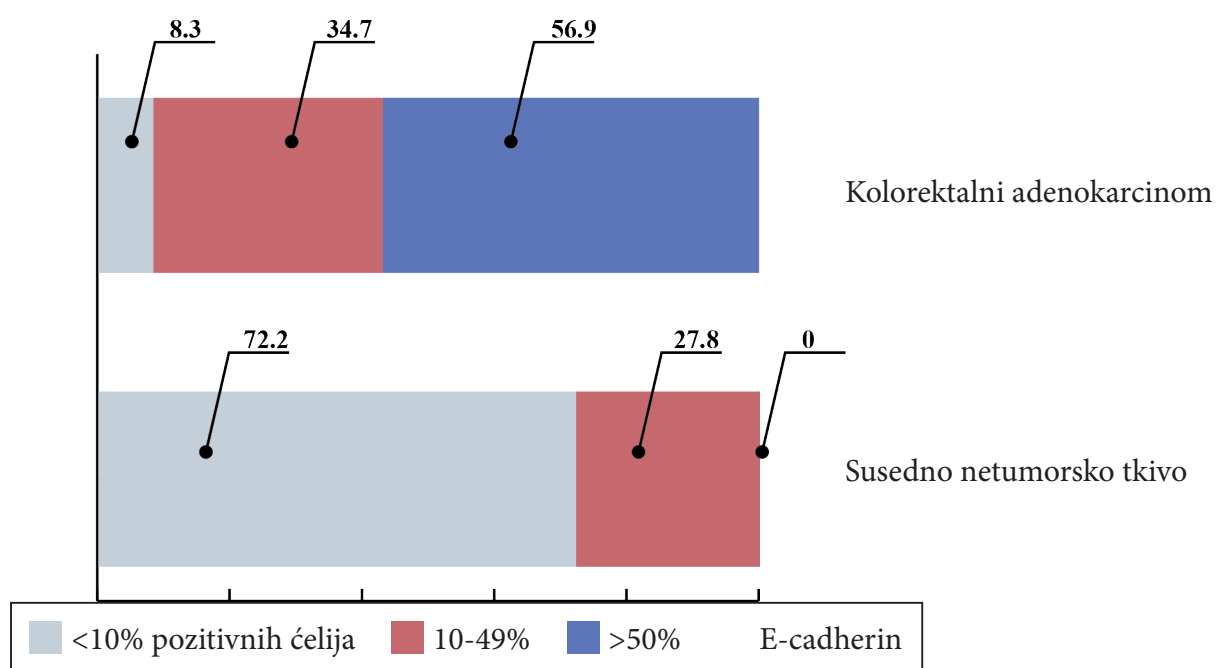
Uočeno je da postoji signifikantna razlika u ekspresiji VEGF u kolorektalnom adenokarcinomu i u kontrolnoj grupi - susednom ne tumorskom tkivu ( $p < 0.001$ ).

Međutim, ispitivana i kontrolna grupa se ne razlikuju po zastupljenosti umerene ekspresije (35% u grupi kolorektalnog karcinoma prema 29% u netumorskom tkivu) ( $\chi^2$ -test,  $p = 0.456$ ).

Značajna razlika u ekspresiji VEGF između grupa nastaje kada se uporede slučajevi odsustva ekspresije (<10% pozitivnih ćelija), kojih je kod kolorektalnog adenokarcinoma bilo u 8,3 % slučajeva naspram 72,2 % u netumorskom tkivu ( $p < 0.001$ ). Zatim, izražena ekspresija VEGF prisutna je samo u tkivu kolorektalnog adenokarcinoma (56,9 % slučajeva) dok u ne tumorskom tkivu nije utvrđena ni u jednom slučaju (tabela 17 i grafikon 17).

Tabela 17. Ekspresija VEGF u kolorektalnom adenokarcinomu i u susednom netumorskom tkivu

Ekspresija VEGF	Grupe				p
	Kolorektalni karcinom		Susjedno netumorsko tkivo		
	n	%	n	%	
0- <10% (-)	6	8.3	52	72.2	<0.001*
10-49% (+)	25	34.7	20	27.8	
>50% (++)	41	56.9	0	.0	



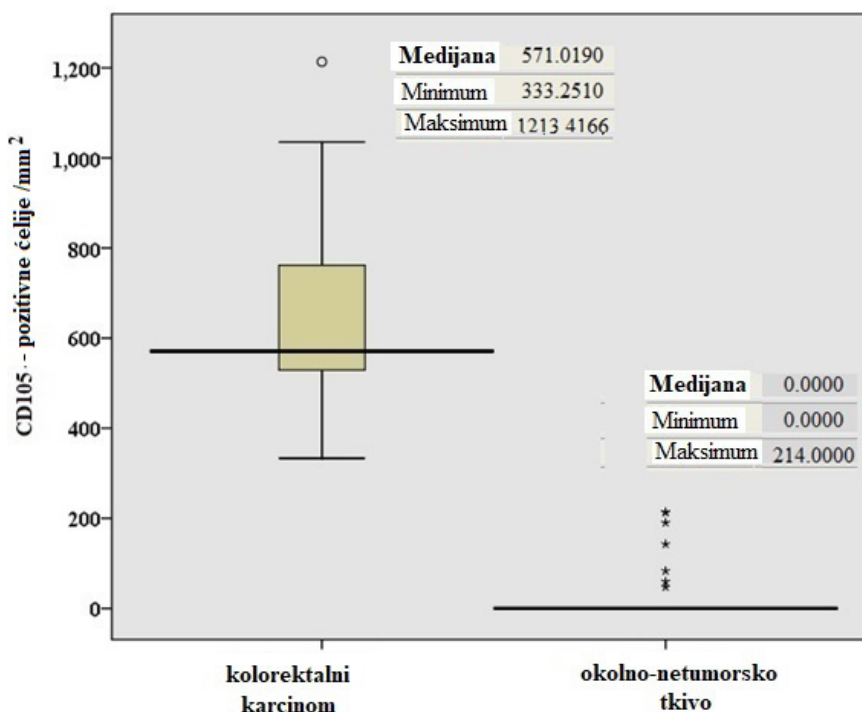
Grafikon 17. Ekspresija VEGF u kolorektalnom adenokarcinomu i u susednom netumorskom tkivu

### -+5.2.3.5. Ekspresija Endoglina (CD105)

Ekspresija CD105 izražena apsolutnim brojem imunopozitivnih ćelije u mm<sup>2</sup> (medijana=571.0190), u kolorektalnom karcinomu, signifikantno je veća u odnosu kontrolnu grupu – ne tumorsko tkivo (p<0.001). U uzorcima ne-tumorskog tkiva samo u 9.7% (7 uzoraka od ukupno 72 otkrivene su imunopozitivne strukture). Znatana većina vaskularnih struktura bila je CD105 negativna i označena je nulom, pa je medijana ove grupe=0.000 (tabela 18 i grafikon 18).

Tabela 18. Ekspresija CD105 u kolorektalnom adenokarcinomu i susednom netumorskom tkivu

Varijable	Grupe		p
	Kolorektalni karcinom	Susedno netumorsko tkivo	
Ekspresija CD105			
Medijana	<b>571.0190</b>	<b>0.0000</b>	<b>&lt;0.001*</b>
Minimum	333.2510	0.0000	
Maksimum	1213.4166	214.0000	
*signifikantna razlika p<0.05 (Medijana test)			



Grafikon 18. Box-plot dijagram CD105



## 5.2.4. Ekspresija Ki67, CD105, Stathmin1, E-cadherina i VEGF u odnosu na kliničko-patološke karakteristike

### 5.2.4.1. Ekspresija biomarkera u odnosu na pol ispitanika

Ne postoji statistički značajna razlika u ekspresiji nijednog od ispitivanih biomarkera (Ki67, CD105, Stathmin1, E-cadherina i VEGF) u odnosu na pol ispitanika. U slučaju ekspresije Ki67 postoji jednaka zastupljenost niskog i visokog indeksa proliferacije u oba pola (tabela 19).

Tabela19. Ekspresija Ki67, CD105, stathmin1, E-cadherina i VEGF u kolorektalnom karcinomu u odnosu na pol ispitanika

Parametar	Pol				p
	M		Ž		
	n	%	n	%	
<b>Ki67</b>					
Nizak nivo ekspresije	21	50.0	15	50.0	-
Visok nivo ekspresije	21	50.0	15	50.0	
<b>CD105</b>					
Nizak nivo ekspresije	21	50.0	18	60.0	0.401
Visok nivo ekspresije	21	50.0	12	40.0	
<b>Stathmin1</b>					
Nema ekspresije	12	28.6	4	13.3	0.142
Nizak nivo ekspresije	8	19.0	11	36.7	
Visok nivo ekspresije	22	52.4	15	50.0	
<b>E-cadherin</b>					
(-)	22	52.4	16	53.3	0.096
(+)	20	47.6	11	36.7	
(++)	0	.0	3	10.0	
<b>VEGF</b>					
(-)	5	11.9	1	3.3	0.431
(+)	14	33.3	11	36.7	
(++)	23	54.8	18	60.0	
*signifikantna razlika $p < 0.05$ , $\chi^2$ -test, Fisher's exact- test					

### 5.2.4.2. Ekspresija biomarkera u odnosu na starosno doba ispitanika

Nije nađena statistički značajna razlika u ekspresiji ispitivanih biomarkera (Ki67, CD105, Stathmin1, E-cadherina i VEGF) u odnosu na starosno doba ispitanika, do 65 godina i preko 65 godina starosti (tabela 20).

Tabela20. Ekspresija Ki67, CD105, Stathmin1, E-cadherina i VEGFu kolorektalnom karcinomu u odnosu na starosnu dob ispitanika

Parametar	Godine starosti				p
	<=65		>65		
	n	%	n	%	
<b>Ki67</b>					
Nizak nivo ekspresije	14	42.4	22	56.4	0.237
Visok nivo ekspresije	19	57.6	17	43.6	
<b>CD105</b>					
Nizak nivo ekspresije	16	48.5	23	59.0	0.373
Visok nivo ekspresije	17	51.5	16	41.0	
<b>Stathmin1</b>					
Nema ekspresije	7	21.2	9	23.1	0.786
Nizak nivo ekspresije	10	30.3	9	23.1	
Visok nivo ekspresije	16	48.5	21	53.8	
<b>E-cadherin</b>					
(-)	18	54.5	20	51.3	0.891
(+)	14	42.4	17	43.6	
(++)	1	3.0	2	5.1	
<b>VEGF</b>					
(-)	0	.0	6	15.4	0.061
(+)	13	39.4	12	30.8	
(++)	20	60.6	21	53.8	
*signifikantna razlika p<0.05, $\chi^2$ -test, Fisher's exact- test					

#### 5.2.4.3. Ekspresija biomarkera u odnosu lokalizaciju tumora u kolonu

Nije uočena statistički značajna razlika u ekspresiji ispitivanih biomarkera (Ki67, CD105, Stathmin1, E-cadherina i VEGF) u odnosu na lokalizaciju kolorektalnog karcinoma u kolonu (tabela 21).

Na preovlađujućoj lokalizaciji, u rektumu (+ anorectum +rectosigma) nizak i visok nivo ekspresije Ki67 i CD105 se raspoređuju na sličan način, u oko 50%. Na ovoj lokalizaciji je izražena ekspresija VEGF prisutna u nešto većem broju slučajeva (60,6%), ali bez statističke značajnosti.

U sličnom broju Ki67 i CD105 imali su na ovoj lokalizaciji niske ekspresije (oko 50% slučajeva, p=0.773). Za Stathmin1 ili nije bilo ekspresije ili je ona bila niska, bez veće razlike (29.2 prema 18.8%, p=0.297). VEGF je bio umerene ekspresije ili ekspresije nije bilo takođe bez značajnije razlike (27.1 prema 12.5, p=0.108).

U slučaju raspoređivanja nivoa ekspresije analiziranih parametara i na ostalim lokalizacijama tumora, ne postoji značajna razlika, kao što se vidi na tabeli 21.

Samo je E-cadherin na ovoj najzastupljenijoj lokaciji u većem broju slučajeva bio bez ekspresije ili je ekspresija bila umerena, bez značajne razlike u zastupljenosti (p=0.297) i na ovoj kao i ostalim lokacijama (tabela 21).

Tabela 21. Ekspresija Ki67, CD105, Stathmin1, E-cadherina i VEGF u kolorektalnom karcinomu u odnosu na lokalizaciju.

Parametar	Lokalizacija										p
	Rectum (+anorectum +rectosigma)		Sigma (+sin.colon)		Colon ascendens (desni kolon)		Colon transversum		Cekum (+ileocecum)		
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	
<b>Ki67</b>											
Nizak	23	47.9	7	77.8	5	45.5	0	.0	1	33.3	0.369
Visok	25	52.1	2	22.2	6	54.5	1	100.0	2	66.7	
<b>CD105</b>											
Nizak	25	52.1	6	66.7	7	63.6	0	.0	1	33.3	0.600
Visok	23	47.9	3	33.3	4	36.4	1	100.0	2	66.7	
<b>Stathmin1</b>											
nema	14	29.2	0	.0	2	18.2	0	.0	0	.0	0.068
Nizak	9	18.8	6	66.7	4	36.4	0	.0	0	.0	
Visok	25	52.1	3	33.3	5	45.5	1	100.0	3	100.0	
<b>E-cadherin</b>											
(-)	26	54.2	4	44.4	5	45.5	1	100.0	2	66.7	0.893
(+)	19	39.6	5	55.6	6	54.5	0	.0	1	33.3	
(++)	3	6.2	0	.0	0	.0	0	.0	0	.0	
<b>VEGF</b>											
(-)	6	12.5	0	.0	0	.0	0	.0	0	.0	0.383
(+)	13	27.1	6	66.7	5	45.5	0	.0	1	33.3	
(++)	29	60.4	3	33.3	6	54.5	1	100.0	2	66.7	
* signifikantna razlika p<0.05, $\chi^2$ -test, Fisher's exact- test											

#### 5.2.4.4. Ekspresija biomarkera u odnosu na način rasta tumora (makroskopski tip)

Ekspresija većine biomarkera se, osim Stathmin1 i VEGF u odnosu na način tumorskog rasta, ne razlikuje značajno. (tabela 22).

Nije uočena statistički značajna razlika u ekspresiji Ki67 i CD105 u odnosu na način tumorskog rasta. Postoji sličnost u raspodeli visoke i niske ekspresije Ki67 i CD105 ne samo u odnosu na najučestaliji (ulcero-infiltrativni i infiltrativni) način rasta, već i u odnosu na ostale makroskopske tipove kolorektalnog karcinoma.

Potpun izostanak ekspresije Ki67 i CD105, kojih je bilo u vrlo malom broju (1-3) je uočen u ulcero-vegetantnom i vegetantnom načinu tumorskog rasta

Ekspresija Stathmin1 se statistički značajno razlikuje u odnosu na način tumorskog rasta ( $p=0.039 < p < 0.05$ ). Kako su niska i visoka ekspresija ovog proteina raspoređene sa sličnom čestinom (25%-3% niska i 48-59,3% visoka), različitost postoji u zastupljenosti broja slučajeva odsustva ekspresije ovog proteina. Najveći broj slučajeva odsustva ekspresije Stathmin1 je kod infiltrativnog (24%), a zatim vegetantno-infiltrativnog tipa (18.8 %), dok je takvih slučajeva kod ulcero-infiltrativnog bilo 11,1%.

U većem broju slučajeva (59,3%-68,8%) nema ekspresije E-cadherin-a pri ulcero-infiltrativnom i vegetantno-infiltrativnom načinu rasta, ali ne značajno. Takođe ni u infiltrativnom tipu umerena ekspresija

ovog athezionog molekula nije značajno veća u odnosu na odsustvo ekspresije (52% i 44%,  $p=296$ ). Visoka ekspresija ovog parametra, pri bilo kom makroskopskom tipu tumora, vrlo je retka pojava.

Ekspresija VEGF se statistički značajno razlikuje u odnosu na način tumorskog rasta (tabela 22). Najveći broj slučajeva visoke ekspresije VEGF je kod ulcero-infiltrativnog i vegetantno-infiltrativnog tipa (70.4% i 68.8%), Kod ulcero-infiltrativnog tipa tumora zastupljenost visoke ekspresije je značajno veća u odnosu na umerenu ekspresiju (29.6% slučajeva,  $p=0.034$ ). U slučajevima vegetantno-infiltrativnog makroskopskog tipa zastupljenost visoke ekspresije je značajno veća (68.8%) u odnosu na umerenu ekspresiju (18.8% slučajeva) ili u odnosu na odsustvo ekspresije ovog markera (12.5% slučajeva,  $p=0.010$ ). Veća je zastupljenost umerene ekspresije VEGF u vegetantnom makroskopskom tipu, što nije i statistički više u odnosu na odsustvo ekspresije ovog parametra (66.7% ili 2 slučaja prema 33.3% u jednom slučaju,  $p=0.733$ ). Umerena ekspresija ovog parametra bila je zastupljena u jedinom slučaju ulcero-vegetantnog makroskopskog tipa (100%).

Tabela 22. Ekspresija Ki67, CD105, Stathmin1, E-cadherina i VEGF u kolorektalnom karcinomu u odnosu na način rasta tumora

Parametar	Makroskopski izgled tumora										p
	Ulcero-infiltrativni		Infiltrativni		Vegetantni		Vegetantno-infiltrativni		Ulcero-vegetantni		
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	
<b>Ki67</b>											
nizak	12	44.4	13	52.0	3	100.0	7	43.8	1	100.0	0.328
visok	15	55.6	12	48.0	0	.0	9	56.2	0	.0	
<b>CD105</b>											
nizak	13	48.1	16	64.0	3	100.0	6	37.5	1	100.0	0.162
visok	14	51.9	9	36.0	0	.0	10	62.5	0	.0	
<b>Stathmin1</b>											
Nema eksp.	3	11.1	6	24.0	3	100.0	3	18.8	1	100.0	0.039*
nizak	8	29.6	7	28.0	0	.0	4	25.0	0	.0	
visok	16	59.3	12	48.0	0	.0	9	56.2	0	.0	
<b>E-cadherin</b>											
(-)	16	59.3	11	44.0	0	.0	11	68.8	0	.0	0.124
“(+)”	10	37.0	13	52.0	2	66.7	5	31.2	1	100.0	
(++)	1	3.7	1	4.0	1	33.3	0	.0	0	.0	
<b>VEGF</b>											
(-)	0	.0	3	12.0	1	33.3	2	12.5	0	.0	0.036*
(+)	8	29.6	11	44.0	2	66.7	3	18.8	1	100.0	
(++)	19	70.4	11	44.0	0	.0	11	68.8	0	.0	
*signifikantna razlika $p<0.05$ , $\chi^2$ -test, Fisher's exact- test											

#### 5.2.4.5. Ekspresija biomarkera u odnosu na pT stadijum tumora

Uočena je statistička značajna povezanost ekspresije svih ispitivanih biomarkera (Ki67, CD105, Stathmin1, E-cadherina i VEGF) sa pT statusom kolorektalnog adenokarcinoma (tabela 23).

U pT2 stadijumu u značajno visokom broju slučajeva (91,7%) je uočen nizak proliferativni indeks (proIDX) / ekspresija Ki67 ( $p=0,004$ ).

U istom pT<sub>2</sub> stadijumu je uočen i u značajno visokom broju slučajeva (83,3%) i nizak indeks mikrovaskularne gustine (mvdIDX) /ekspresija CD105 ( $p=0,021$ ).

U najzastupljenijem pT<sub>3</sub> stadijumu visok proIDX/Ki67 i visok mvdIDX/CD105 su zastupljeni u visokom broju slučajeva (61,6% i 51,9%), ali ova učestalost nije i značajno veća u odnosu na nizak proIDX i nizak mvdIDX (p=0,102 i p=0,785), a slično je i u pT<sub>4</sub> stadijumu gde je zastupljen vrlo mali broj slučajeva (ukupno 4). Isto je stanje i u pT<sub>1</sub> stadijumu sa samo po 2 slučaja niske ekspresije Ki67 i CD105.

Ekspresija Stathmin1 je značajno povezana sa pT stadijumom tumora i to tako da je visok nivo ekspresije Stathmin1 u signifikantno visokom broju slučajeva (63%) ekspimiran u pT<sub>3</sub> stadijumu (p=0,007). U pT<sub>2</sub> stadijumu je izostanak ekspresije Stathmin1 nađen u visokom procentu (75%), ali bez statističke značajnosti u odnosu na učestalost niske ekspresije ovog markera (3 slučaja, 25%; p=0.083>0.05), na usvojenom nivou pouzdanosti.

Ekspresija E-cadherina je statistički značajno povezana sa pT stadijumom tumora i to tako što se uočava izostanak ekspresija E-cadherina u signifikantnom broju slučajeva (63%, p=0,039), u pT<sub>3</sub> stadijumu, kao i u sva 4 slučaja (100%) ovog protein u pT<sub>4</sub> stadijumu. Međutim u pT<sub>2</sub> kao i u pT<sub>1</sub>, signifikantna je umerena ekspresije ovog molekula (83.3% slučajeva, p=0.021).

Ekspresija VEGF je značajno povezana sa pT stadijumom tumora. U pT<sub>3</sub> stadijumu je visoka ekspresija VEGF u značajnom broju slučajeva visoke ekspresije (66.7%; p= 0.009), kao i u stadijumu pT<sub>4</sub> (100% slučajeva), sa statističkom značajnošću koja je očigledna U pT<sub>2</sub>, kao i u pT<sub>1</sub>, ne postoji značajna razlika u zastupljenosti umerene ekspresije i broja slučajeva odsustva ekspresije ovog biomarkera. (58.3% slučajeva, p=0.366).

Tabela 23. Ekspresija Ki67, CD105, Stathmin1, E-cadherina i VEGFu kolorektalnom karcinomu u odnosu na patološki stadijum tumora

Parametar	Patološki stadijum (pT status)								p
	pT <sub>1</sub>		pT <sub>2</sub>		pT <sub>3</sub>		pT <sub>4</sub>		
	n	%	n	%	n	%	n	%	
<b>Ki67</b>									
Nizak	2	100.0	11	91.7	21	38.9	2	50.0	0.005*
Visok	0	.0	1	8.3	33	61.1	2	50.0	
<b>CD105</b>									
Nizak	2	100.0	10	83.3	26	48.1	1	25.0	0.047*
Visok	0	.0	2	16.7	28	51.9	3	75.0	
<b>Stathmin1</b>									
Nema	2	100.0	9	75.0	5	9.3	0	.0	<0.001*
Nizak	0	.0	3	25.0	15	27.8	1	25.0	
Visok	0	.0	0	.0	34	63.0	3	75.0	
<b>E-cadherin</b>									
(-)	0	.0	0	.0	34	63.0	4	100.0	<0.001*
(+)	2	100.0	10	83.3	19	35.2	0	.0	
(++)	0	.0	2	16.7	1	1.9	0	.0	
<b>VEGF</b>									
(-)	1	50.0	4	33.3	1	1.9	0	.0	<0.001*
(+)	1	50.0	7	58.3	17	31.5	0	.0	
(++)	0	.0	1	8.3	36	66.7	4	100.0	
*signifikantna razlika p<0.05, $\chi^2$ -test, Fisher's exact- test									

#### 5.2.4.6. Ekspresija biomarkera u odnosu na histološki gradus tumora

Nije uočena signifikantna povezanost ispitivanih biomarkera (Ki67, CD105, Stathmin1, E-cadherina i VEGF) sa stepenom diferencijacije (histološkim gradusom- HG) kolorektalnog karcinoma (tabela 24)

Unutar grupe sa HG2, koji je najzastupljeniji u uzorku pacijenata, ne postoji značajna razlika između nivoa (nizak-visok) ekspresije analiziranih biomarkera.

U većem broju slučajeva tumora sa HG2 je uočeno da Ki67 ima nizak nivo ekspresije što se ne razlikuje značajno od broja visokog nivoa ekspresije ovog biomarkera (50.8% prema 49.2%,  $p=0.900$ ).

Na sličan način raspoređena je i ekspresija CD105, gde se takođe nizak nivo ekspresije ne razlikuje značajno od broja visokog nivoa ekspresije (55.6% prema 44.4% ,  $p=0.378$ ).

Stathmin1 je u najvećem broju slučajeva (49,2%) visoke ekspresije u srednje diferentovanih tumora (HG2), što se ne razlikuje značajno u odnosu, na slučajeve niske ekspresije ili odsustva ekspresije koje su zastupljene u sličnom broju (oko 22,2- 28,6% slučajeva;  $p=0.063>0.05$ ).

E-cadherin u najvećem broju slučajeva nema ekspresije ili je ekspresija bila umerena u sličnom broju slučajeva (49% i 46%). Zanimljivo je mali broj slučajeva visoke ekspresije ovog markera u najzastupljenijem HG2 tumora (ukupno 3 slučaja).

U tumora HG2 VEGF je u najvećem broju slučajeva bio visoke ekspresije (55.6% slučajeva) ili je ekspresija bila umerena (36.5% slučajeva), što nije značajna razlika ( $p=0.115$ ). Vrlo je mali broj slučajeva odsustva ekspresije ovog biomarkera pri najzastupljenijem tumoru gradusa 2 (ukupno 5 slučajeva).

Veoma mali broj pacijenata (4-5) je imao tumore HG1 i HG3 pa se u tim grupama nije utvrdio statistički značajan broj. Posledica ovakvog rasporeda histološkog nalaza unutar grupa je da se grupe histološkog nalaza (gradus 1,2 i 3) ne razlikuju značajno u raspodelama ekspresija ni u jednom analiziranom markeru. (tabela 24)

Tabela 24. Ekspresija Ki67, CD105, Stathmin1, E-cadherina i VEGF u kolorektalnom karcinomu u odnosu na histološki gradus

Parametar	Histološki gradus						p
	Gradus 1		Gradus 2		Gradus 3		
	n	%	n	%	n	%	
<b>Ki67</b>							
Nizak	3	75.0	32	50.8	1	20.0	0.245
Visok	1	25.0	31	49.2	4	80.0	
<b>CD105</b>							
Nizak	2	50.0	35	55.6	2	40.0	0.786
Visok	2	50.0	28	44.4	3	60.0	
<b>Stathmin1</b>							
Nema ekspresije	2	50.0	14	22.2	0	.0	0.331
Nizak	0	.0	18	28.6	1	20.0	
Visok	2	50.0	31	49.2	4	80.0	
<b>E-cadherin</b>							
(-)	2	50.0	31	49.2	5	100.0	0.285
(+)	2	50.0	29	46.0	0	.0	
(++)	0	.0	3	4.8	0	.0	
<b>VEGF</b>							
(-)	1	25.0	5	7.9	0	.0	0.598
(+)	1	25.0	23	36.5	1	20.0	
(++)	2	50.0	35	55.6	4	80.0	
* signifikantna razlika $p<0.05$ , $\chi^2$ -test, Fisher's exact- test							

#### 5.2.4.7. Ekspresija ispitivanih biomarkera u odnosu na invaziju limfnih sudova

Uočeno je da su svi analizirani biomarkeri (Ki67, CD105, Stathmin1, E-cadherin i VEGF) signifikantno povezani sa invazijom limfnih sudova (Tabela 25). Statistička značajnost razlika u ekspresijama svih analiziranih parametara je visoka ( $p < 0.001$ ) kada se upoređuje grupa sa prisutnom invazijom limfnih sudova u odnosu na grupu gde invazija nije identifikovana.

U okviru ekspresije Ki67 i CD105 po upoređivanim grupama, značajnost razlika je očigledna: kod niskih ekspresija Ki67 i CD105 u značajno većem broju slučajeva (87,9 %) invazija limfnih sudova nije identifikovana i obrnuto: u značajno većem broju slučajeva kada je invazija limfnih sudova prisutna ekspresije Ki67 i CD105 su visoke (oko 82,1% i 74,4% slučajeva,  $p < 0.001$ ).

Visoka ekspresija Stathmin1 je u značajnih 87,2% slučajeva povezana sa invazijom limfnih sudova. Međutim, ukoliko invazija limfatika nije identifikovana tada nema značajne razlike u odsustvu ekspresije ili niskom nivou ekspresije Stathmin1. (42.4% prema 48.5%,  $p = 0.715$ ).

Odsustvo ekspresije E-cadherina je u značajnih 87.2% slučajeva povezano sa invazijom limfnih sudova. Umerena ekspresija E-cadherina je takođe signifikantno povezana sa odsustvom invazije limfatika u 78,8% slučajeva.

Visoka ekspresija VEGF je značajno povezana sa invazijom limfnih sudova u 87,2% slučajeva. Ukoliko invazija limfatika nije identifikovana ne postoje značajne razlike u odsustvu ekspresije ili niskom nivou ekspresije VEGF (42.4% prema 48.5%,  $r = 0.715$ ). (tabela 25).

Tabela 25. Ekspresija Ki67, CD105, Stathmin1, E-cadherina i VEGF u kolorektalnom karcinomu u odnosu na invaziju limfnih sudova

Parametar	Invazija limfnih sudova				p
	Nije indetifikovana		Prisutna		
	n	%	n	%	
<b>Ki67</b>					
Nizak nivo ekspresije	29	<b>87.9</b>	7	17.9	<b>&lt;0.001*</b>
Visok nivo ekspresije	4	12.1	32	<b>82.1</b>	
<b>CD105</b>					
Nizak nivo ekspresije	29	<b>87.9</b>	10	25.6	<b>&lt;0.001*</b>
Visok nivo ekspresije	4	12.1	29	<b>74.4</b>	
<b>Stathmin1</b>					
Nema ekspresije	14	42.4	2	5.1	<b>&lt;0.001*</b>
Nizak nivo ekspresije	16	48.5	3	7.7	
Visok nivo ekspresije	3	9.1	34	<b>87.2</b>	
<b>E-cadherin</b>					
(-)	4	12.1	34	<b>87.2</b>	<b>&lt;0.001*</b>
(+)	26	<b>78.8</b>	5	12.8	
(++)	3	9.1	0	.0	
<b>VEGF</b>					
(-)	14	42.4	2	5.1	<b>&lt;0.001*</b>
(+)	16	48.5	3	7.7	
(++)	3	9.1	34	<b>87.2</b>	
*signifikantna razlika $p < 0.05$ , $\chi^2$ -test, Fisher's exact- test					

#### 5.2.4.8. Ekspresija ispitivanih biomarkera u odnosu na invaziju krvnih sudova

Svi analizirani biomarkeri (Ki67, CD105, Stathmin1, E-cadherin i VEGF) značajno su povezani sa invazijom krvnih sudova (tabela 26).

Visoka ekspresija Ki67, CD105, Stathmin1 i VEGF je u signifikantnih po 90,9% slučajeva povezana sa invazijom krvnih sudova. Ukoliko ne postoji invazija krvnih sudova niske i visoke ekspresije Ki67, CD105, Stathmin1 i VEGF ne razlikuju se značajno ( $p > 0.05$ ).

Odsutna ekspresije E-cadherina je signifikantno povezana sa invazijom krvnih sudova u 90.9% slučajeva. Ukoliko ne postoji invazija krvnih sudova između odsutne i umerene ekspresija E-cadherina ne postoji statistički značajna razlika (45,9% i 49,2;  $p = 793$ )

Tabela 26. Ekspresija Ki67, CD105, Stathmin1, E-cadherina i VEGF u kolorektalnom karcinomu u odnosu na invaziju krvnih sudova

Parametar	Invazija krvnih sudova				p
	Nije indetifikovana		Prisutna		
	n	%	n	%	
<b>Ki67</b>					
Nizak nivo ekspresije	35	57.4	1	9.1	<b>0.003*</b>
Visok nivo ekspresije	26	42.6	10	<b>90.9</b>	
<b>CD105</b>					
Nizak nivo ekspresije	38	62.3	1	9.1	<b>0.001*</b>
Visok nivo ekspresije	23	37.7	10	<b>90.9</b>	
<b>Stathmin1</b>					
Nema ekspresije	15	24.6	1	9.1	<b>0.015*</b>
Nizak nivo ekspresije	19	31.1	0	.0	
Visok nivo ekspresije	27	44.3	10	<b>90.9</b>	
<b>E-cadherin</b>					
(-)	28	45.9	10	<b>90.9</b>	<b>0.022*</b>
(+)	30	49.2	1	9.1	
(++)	3	4.9	0	.0	
<b>VEGF</b>					
(-)	6	9.8	0	.0	<b>0.046*</b>
(+)	24	39.3	1	9.1	
(++)	31	50.8	10	<b>90.9</b>	
*signifikantna razlika $p < 0.05$ , $\chi^2$ -test, Fisher's exact- test					



### 5.2.4.9. Ekspresija ispitivanih biomarkera u odnosu na perineuralnu invaziju

Svi analizirani biomarkeri (Ki67, CD105, Stathmin1, E-cadherin i VEGF) značajno su povezani sa perineuralnom invazijom (Tabela 27) i to tako da su visoki nivoi ekspresije: Ki67 u 92,3% slučajeva, CD105 u 76,9% slučajeva, Statmin1 u 84,6% i VEGF u 92,3% slučajeva značajno povezani sa invazijom nerava. Međutim, kada ne postoji invazija nerava niske i visoke ekspresije Ki67, CD105, Stathmin i VEGF se ne razlikuju značajno ( $p > 0.05$ ).

Odsustvo ekspresije E-cadherina je u 92,3% slučajeva signifikantno povezano sa invazijom nerava. U slučaju odsutne perineuralne invazije ekspresija E-cadherina je odsutna ili je umerena sa učestalošću koja se ne razlikuje značajno (44,1% prema 52,5 % slučajeva;  $p = 693$ ) (tabela 27).

Tabela 27. Ekspresija Ki67, CD105, Stathmin1, E-cadherina i VEGF u kolorektalnom karcinomu u odnosu na perineuralnu invaziju

Parametar	Perineuralna invazija				p
	Nije indetifikovana		Prisutna		
	n	%	n	%	
<b>Ki67</b>					
Nizak nivo ekspresije	35	59.3	1	7.7	<b>0.001*</b>
Visok nivo ekspresije	24	40.7	12	<b>92.3</b>	
<b>CD105</b>					
Nizak nivo ekspresije	36	61.0	3	23.1	<b>0.013*</b>
Visok nivo ekspresije	23	39.0	10	<b>76.9</b>	
<b>Stathmin1</b>					
Nema ekspresije	15	25.4	1	7.7	<b>0.030*</b>
Nizak nivo ekspresije	18	30.5	1	7.7	
Visok nivo ekspresije	26	44.1	11	<b>84.6</b>	
<b>E-cadherin</b>					
(-)	26	44.1	12	<b>92.3</b>	<b>0.020*</b>
(+)	31	52.5	0	.0	
(++)	2	3.4	1	7.7	
<b>VEGF</b>					
(-)	6	10.2	0	.0	<b>0.017*</b>
(+)	24	40.7	1	7.7	
(++)	29	49.2	12	<b>92.3</b>	
*signifikantna razlika $p < 0.05$ , $\chi^2$ -test, Fisher's exact- test					

#### 5.2.4.10. Ekspresija ispitivanih biomarkera u odnosu na metastaze u limfnim čvorovima

U ekspresiji proliferativnog antigena Ki67 postoji značajna razlika između grupa koje prikazuju prisustvo metastaza u limfnim čvorovima u bilo kom broju ili odsustvo metastaza ( $p < 0.001$ ). Niska ekspresija Ki67 praćena je odsustvom depozita u limfnim čvorovima (u 94,3% slučajeva), što je visoka signifikantnost ( $r < 0.001$ ). Istovremeno, već pri prisustvu depozita u 1-3 limfna čvora, kao i 4-6 i 7 i više limfnih čvorova, visoka je signifikantnost ( $r < 0.001$ ) prisustva većeg broja slučajeva visoke ekspresije Ki67.

Slična je situacija u ekspresiji CD105, samo u ovom slučaju u grupi depozita u 4-6 limfna čvora nije dokazana značajna razlika u niskoj i visokoj ekspresiji ovog faktora mikrovaskularne gustine (3 ili 5 slučajeva, ili 37.5 prema 62.5,  $p = 0.480$ ).

Regulatorni protein Stathmin1, ima visoke nivoe ekspresije u svim grupama koje su definisane sa prisutnim depozitima od najmanje 1-3 pa sve do preko 7 limfnih čvorova. Statistička značajnost prisustva visokih ekspresija ovog proteina je visoka (94,7%-100% slučajeva,  $p < 0.001$ ). U odsustvu depozita ekspresija Statmin1 je niska (51.4%) ili je odsutna (45,7% slučajeva), što se značajno ne razlikuje ( $p = 0.732$ ).

U visoko značajnom broju slučajeva (94,7%-100%), nema ekspresije E-cadherin-a, kada su prisutni depoziti u bilo kom broju limfnih čvorova. U odsustvu depozita u limfnim čvorovima, u signifikantnom broju slučajeva, ekspresija ovog athezionog molekula je umerena. (85.7%,  $p < 0.001$ ).

U visoko značajnom broju slučajeva (84,2%-100%), postoji izražena ekspresija VEGF, kada su prisutni depoziti u bilo kom broju limfnih čvorova. U odsustvu depozita u limfnim čvorovima u značajnom broju slučajeva (62,9%) ekspresija je umerena sa većom učestalošću u odnosu na odsustvo ekspresije (17,1%) ili na broj slučajeva (20%) sa izraženom ekspresijom VEGF (62.9%,  $p = 0.002$ ).

Rezultati ekspresije ispitivanih markera su prikazani na tabeli 28.

Tabela 28. Ekspresija Ki67, CD105, Stathmin1, E-cadherina i VEGF u kolorektalnom karcinomu u odnosu na metastaze u limfnim čvorovima

Parametar	Metastaze u limfnim čvorovima								p
	Nema depozita		Depoziti u 1-3 limf. čvorova		depoziti 4-6 limf. čvora		Depoziti u 7 i više limfnih čvorova		
	n	%	n	%	n	%	n	%	
<b>Ki67</b>									
Nizak	33	<b>94.3</b>	3	15.8	0	.0	0	.0	<b>&lt;0.001*</b>
Visok	2	5.7	16	<b>84.2</b>	8	<b>100.0</b>	10	<b>100.0</b>	
<b>CD105</b>									
nizak	30	<b>85.7</b>	5	26.3	3	37.5	1	10.0	<b>&lt;0.001*</b>
visok	5	14.3	14	<b>73.7</b>	5	62.5	9	<b>90.0</b>	
<b>Stathmin1</b>									
Nema	16	45.7	0	.0	0	.0	0	.0	<b>&lt;0.001*</b>
Nizak	18	51.4	1	5.3	0	.0	0	.0	
Visok	1	2.9	18	<b>94.7</b>	8	<b>100.0</b>	10	<b>100.0</b>	
<b>E-cadherin</b>									
(-)	2	5.7	18	<b>94.7</b>	8	<b>100.0</b>	10	<b>100.0</b>	<b>&lt;0.001*</b>
(+)	30	<b>85.7</b>	1	5.3	0	.0	0	.0	
(++)	3	8.6	0	.0	0	.0	0	.0	
<b>VEGF</b>									
(-)	6	17.1	0	.0	0	.0	0	.0	<b>&lt;0.001*</b>
(+)	22	<b>62.9</b>	3	15.8	0	.0	0	.0	
(++)	7	20.0	16	<b>84.2</b>	8	<b>100.0</b>	10	<b>100.0</b>	
* signifikantna razlika p<0.05, $\chi^2$ -test, Fisher's exact- test									

#### 5.2.4.11. Ekspresija ispitivanih biomarkera u odnosu na udaljene metastaze

Kada su prisutne udaljene metastaze, što je utvrđeno samo u 8 slučajeva od ukupno 72, tada su Ki67, CD105, Stathmin1 i VEGF prezentovani sa značajno visokom ekspresijom u 100% slučajeva. Ukoliko ne postoje udaljene metastaze tada se niske i visoke ekspresije Ki67, CD105, Stathmin1 i VEGF ne razlikuju značajno ( $p>0.05$ ) (tabela 29).

Ekspresija E-cadherina je takođe značajno povezana sa udaljenim metastazama tako da u svih 8 (100%) slučajeva postoji odsustvo ekspresije ovog markera. Ukoliko ne postoje udaljene metastaze ekspresija E-cadherina je odsutna ili je umerena sa učestalošću koja se ne razlikuje značajno (46,9% prema 48,4 % slučaja;  $p=882$ ) (tabela 29).

Tabela 29. Ekspresija Ki67, CD105, Stathmin1, E-cadherina i VEGF u kolorektalnom karcinomu u odnosu na udaljene metastaze

Parametar	Udaljene metastaze				p
	Nisu identifikovane		Prisutne		
	n	%	n	%	
<b>Ki67</b>					
Nizak nivo ekspresije	36	56.2	0	.0	0.003*
Visok nivo ekspresije	28	43.8	8	100.0	
<b>CD105</b>					
Nizak nivo ekspresije	39	60.9	0	.0	0.001*
Visok nivo ekspresije	25	39.1	8	100.0	
<b>Stathmin1</b>					
Nema ekspresije	16	25.0	0	.0	0.014*
Nizak nivo ekspresije	19	29.7	0	.0	
Visok nivo ekspresije	29	45.3	8	100.0	
<b>E-cadherin</b>					
(-)	30	46.9	8	100.0	0.018*
(+)	31	48.4	0	.0	
(++)	3	4.7	0	.0	
<b>VEGF</b>					
(-)	6	9.4	0	.0	0.033*
(+)	25	39.1	0	.0	
(++)	33	51.6	8	100.0	
* signifikantna razlika $p < 0.05$ , $\chi^2$ -test, Fisher's exact- test					

#### 5.2.4.12. Ekspresija ispitivanih biomarkera u odnosu na Astler Coller stadijum

Ekspresija Ki67, CD105, Stathmin1, E-cadherina i VEGF u kolorektalnom karcinomu sa značajnom razlikom dele stadijume po Astler Coller klasifikaciji na dva dela. Stadijum C1 je indiferentan u ovoj podeli s obzirom da je u ovom stadijumu prisutan minimalan broj slučajeva (3) u raspodeli.

Astler Coller stadijumi B<sub>1</sub> i B<sub>2</sub> u značajno većem broju slučajeva (82% do 100% slučajeva,  $p < 0.05$ ) imaju nizak nivo ekspresije Ki67 i CD105. Istovremeno, visoke ekspresije ovih markera raspoređene su u značajno većem broju (70%-100% slučajeva,  $p = 0.021$  do  $p < 0.001$ ) u višim Astler Coller stadijumima (C<sub>2</sub>, D).

Stathmin1 u najnižem Astler Coller stadijumu (B<sub>1</sub>) nema ekspresiju u signifikantnom broju slučajeva (81.8% slučajeva,  $p = 0.035$ ), dok u stadijumu B<sub>2</sub> nema značajne razlike u zastupljenosti

niske ekspresije ovog proteina (61.9%) i odsustva njegove ekspresije (33.3% slučajeva,  $p=0.180$ ). U stadijumu C<sub>1</sub> koji je bio zastupljen u ukupno 3 slučaja, ekspresija Stathmin1 bila je niska u 2 slučaja ili 66.7% prema jednom slučaju visoke ekspresije ovog parametra (33.3%), što u ovim slučajevima, nije statistički značajna razlika ( $p>0.05$ ). Najveća učestalost pojave visoke ekspresije Stathmin1 je u Astler Coller stadijumima C<sub>2</sub> i D (93%-100%), što je visoko signifikantna razlika u odnosu na ostale stadijume.

E-cadherin je u značajno većem broju slučajeva (81.8%- 90.5%,  $p=0.021$ ) umerene ekspresije u tumorskom tkivu, pri nižim Astler Coller stadijumima (B<sub>1</sub> i B<sub>2</sub>). U C<sub>2</sub> i D stadijumu kolorektalnog karcinoma nema ekspresije E-cadherin-a u 100% slučajeva, što čini raspodelu ovog molekula signifikantno različitom po Astler Coller klasifikaciji ( $p<0.001$ ).

VEGF je samo u stadijumu B<sub>2</sub> u značajnom broju u umerenoj ekspresiji (81%, slučajeva  $p=0.030$ ). U C<sub>2</sub> i D stadijumu kolorektalnog karcinoma ovaj proangiogeni faktor je u visokoj ekspresiji sa signifikantnom verovatnoćom (93,3% i 100% slučajeva) (tabela 30).

Tabela 30. Ekspresija Ki67, CD105, Stathmina1, E-cadherina i VEGF u kolorektalnom karcinomu u odnosu na Astler Coller stadijum

Parametar	Astler Coller stadijum										r
	B1		B2		C1		C2		D		
	H	%	H	%	H	%	H	%	H	%	
<b>Ki67</b>											
Nizak	10	90.9	21	100.0	2	66.7	3	10.0	0	.0	<0.001*
Visok	1	9.1	0	.0	1	33.3	27	90.0	7	100.0	
<b>CD105</b>											
Nizak	9	81.8	20	95.2	1	33.3	9	30.0	0	.0	<0.001*
Visok	2	18.2	1	4.8	2	66.7	21	70.0	7	100.0	
<b>Stathmin1</b>											
Nema eksp.	9	81.8	7	33.3	0	.0	0	.0	0	.0	<0.001*
Nizak	2	18.2	13	61.9	2	66.7	2	6.7	0	.0	
visok	0	.0	1	4.8	1	33.3	28	93.3	7	100.0	
<b>E-cadherin</b>											
(-)	0	.0	1	4.8	0	.0	30	100.0	7	100.0	<0.001*
(+)	9	81.8	19	90.5	3	100.0	0	.0	0	.0	
(++)	2	18.2	1	4.8	0	.0	0	.0	0	.0	
<b>VEGF</b>											
(-)	5	45.5	1	4.8	0	.0	0	.0	0	.0	<0.001*
(+)	5	45.5	17	81.0	1	33.3	2	6.7	0	.0	
(++)	1	9.1	3	14.3	2	66.7	28	93.3	7	100.0	
*signifikantna razlika $r<0.05$ , $\chi^2$ -test, Fisher's exact- test											

### 5.2.5. Korelacija ekspresije Ki67, CD105, Sthathmin1, E-cadherina i VEGF sa kliničko-patološkim parametrima

Korelativna analiza je pokazala da pol i starosno doba pacijenata obolelih od kolorektalnog karcinoma nemaju značajnu povezanost ni sa jednim od analiziranih kliničko-patoloških parametara i biomarkera korišćenih u ovoj studiji. Takođe je zapaženo da od svih kliničko-patoloških parametara lokalizacija, histološki gradus i način rasta tumora nemaju značajnu povezanost sa ostalim parametrima iz analize (tabela 31).

Patološki stadijum tumora (pT) je umerenim, pozitivnim i visoko značajnim koeficijentima korelacije povezan sa Astler Coller stadijumom ( $r=0.638$ ), invazijom limfnih sudova ( $r=0.429$ ) i metastazama u limfnim čvorovima ( $r=0.372$ ).

U odnosu na ekspresiju posmatranih biomarkera umerena i visoko značajna pozitivna veza postoji između patološkog stadijuma (pT) i Sthathmin1 ( $r=0.607$ ), zatim VEGF-a ( $r=0.578$ ), i u istom intenzitetu veze i značaju, ali u negativnom predznaku, sa E-cadherinom ( $r=-0.515$ ). Nešto slabija uzajamna povezanost, ali značajna na usvojenom nivou pouzdanosti, je između patološkog stadijuma i proliferativnog antigena Ki67 ( $r=0.352$ ) i markera mikrovaskularne gustine CD105 ( $r=0.328$ ).

Astler Coller stadijum u odnosu na kliničko-patološke parametare pokazuje dobru, pozitivnu i značajnu povezanost prema invaziji limfnih sudova ( $r=0.756$ ) i metastazama u limfnim čvorovima ( $r=0.726$ ). Sledi po značaju umerena i značajna, pozitivna korelacija ovog parametra sa patološkim stadijumom ( $r=0.638$ ), zatim sa udaljenim metastazama ( $r=0.503$ ), invazijom krvnih sudova ( $r=0.468$ ) i nerava ( $r=0.437$ ). (tabela 31).

Ipak, po intenzitetu povezanosti i visokom značaju, ističu se korelacije Astler Coller stadijuma i ekspresije svih analiziranih parametara. Povezanost Astler Coller stadijuma je umerena i pozitivna sa markerom mikrovaskularne gustine CD105 ( $r=0.630$ ), dobra i pozitivna je sa proangiogenim faktorom VEGF ( $r=0.782$ ), i još jača sa proliferativnim antigenom Ki67. ( $r=0.818$ ).

Međutim, najveća međusobna veza, definisana signifikantnim i pozitivnim koeficijentom postoji između Astler Coller stadijuma i Sthathmin1 ( $r=0.865$ ), a slična po jačini ali negativna povezanost je između ovog stadijuma i ekspresije athezionog molekula E-cadherina ( $r=-0.875$ ).

Invazija limfnih sudova je dobrim, pozitivnim i visoko signifikantnim koeficijentom korelacije predstavljena u vezi sa Astler Coller stadijumom ( $r=0.756$ ) a sledi umerena, negativna korelacija ovog parametra sa ekspresijom E-cadherina ( $-0.726$ ).

Zatim, sledi pozitivna korelacija sa Sthathmin1 ( $r=0.713$ ), sa metastazama u limfnim čvorovima ( $r=0.698$ ), sa Ki67 ( $r=0.697$ ), CD105 ( $r=0.622$ ) i VEGF ( $r=0.563$ ) i nešto slabija korelacija sa patološkim stadijumom tumora ( $r=0.429$ ).

Ostale korelacije ovog parametra sa invazijom krvnih sudova ( $r=0.391$ ), invazijom nerava ( $r=0.359$ ) i udaljenim metastazama ( $r=0.325$ ), slabe su po jačini povezanosti ali postoje sa značajnim koeficijentom ( $p>0.05$ ).

Za razliku od invazije limfnih sudova invazija krvnih sudova je u jačoj vezi sa udaljenim

metastazama ( $r=0.710$ ), a zatim sledi povezanost sa Astler Coller stadijumom ( $r=0.468$ ) i invazijom nerava ( $r=0.403$ ).

Ostale korelacije invazije krvnih sudova sa CD105 ( $r=0.384$ ), Ki67 ( $r=0.347$ ), E-cadherinom ( $r=-0.311$ ), VEGF ( $r=0.278$ ) i Stathmin1 ( $r=0.277$ ), slabe su po jačini povezanosti ali postoje sa značajnim koeficijentom ( $p>0.05$ ).

Slične značajne korelacije postoje kod perineuralne invazije, prvenstveno sa udaljenim metastazama gde postoji pozitivna, dobra i značajna veza ( $r=0.638$ ). Invazija nerava je u dobroj i značajnoj vezi i sa Astler Coller stadijumom ( $r=0.437$ ), sa invazijom krvnih sudova ( $r=0.403$ ) i sa invazijom limfnih sudova ( $r=0.359$ ).

U odnosu na ispitivane markere perineuralna invazija je u dobroj i značajnoj vezi sa Ki67 ( $r=0.397$ ) i VEGF ( $r=0.318$ ), dok su veze sa CD105 ( $r=0.293$ ), Stathmin1 ( $r=0.278$ ) i E cadherinom ( $r=-0.293$ ) nešto slabije ali značajne.

Metastaze u limfnim čvorovima u dobroj su, pozitivnoj i značajnoj povezanosti, prvenstveno sa Ki67( $r=0.766$ ), zatim u nešto slabijoj vezi sa E-cadherinom ( $r=-0.729$ ), Astler Coller stadijumom ( $r=0.726$ ), invazijom limfnih sudova ( $r=0.698$ ), VEGF ( $r=0.612$ ) i CD105 ( $r=0.553$ ). Veze sa ostalim parametrima kao što su patološki stadijum (pT), invazija krvnih sudova i invazija nerava slabije, ali značajne na usvojenom nivou pouzdanosti ( $p>0.05$ )

Udaljene metastaze u najboljoj su povezanosti sa invazijom krvnih sudova ( $r=0.710$ ), invazijom nerava ( $r=0.638$ ) i Astler Coller stadijumom ( $r=0.503$ ), dok je veza sa ostalim parametrima poput invazije limfnih sudova ( $r=0.325$ ), CD105 ( $r=0.384$ ), Ki67 ( $r=0.354$ ), E-cadherinom ( $r=-0.315$ ), Stathmin1 ( $r=0.310$ ) i VEGF ( $r=0.282$ ) slaba ali značajna (tabela 31).

Tabela 31. Korelaciona matrica kliničko –patoloških parametara i ekspresija markera kolorektalnog adenocarcinoma

parametri	Pol	Starost	Lokal	pT.st	HG.tu	AC.St	MAK	ILS	IKS	PNI	MET.LČ	UM	Ki67	CD 105	STMN 1	E-cadh	VEGF	
Pol	kk	1.000	-0.188	-0.058	0.102	-0.113	0.034	-0.204	-0.071	-0.202	0.043	0.024	-0.030	0.000	-0.099	0.079	0.077	0.105
	p		0.113	0.630	0.394	0.345	0.776	0.086	0.555	0.088	0.722	0.840	0.803	1.000	0.408	0.512	0.519	0.378
Starost	kk	-0.188	1.000	0.099	-0.141	0.012	-0.025	-0.057	-0.029	0.068	-0.046	0.021	0.072	-0.031	-0.012	0.033	0.015	-0.073
	p	0.113		0.408	0.238	0.917	0.833	0.635	0.807	0.569	0.700	0.860	0.546	0.798	0.922	0.784	0.904	0.543
Lok.TU	kk	-0.058	0.099	1.000	0.158	0.088	0.104	-0.155	0.160	-0.037	-0.079	0.141	0.037	0.053	0.024	0.172	-0.060	0.074
	p	0.630	0.408		0.184	0.464	0.384	0.193	0.179	0.754	0.511	0.238	0.757	0.661	0.840	0.148	0.617	0.537
pTstad	kk	0.102	-0.141	0.158	1.000	0.154	0.638	-0.131	0.429	0.128	0.142	0.372	0.187	0.352	0.328	0.607	-0.515	0.578
	p	0.394	0.238	0.184		0.196	0.000	0.274	0.000	0.284	0.236	0.001	0.117	0.002	0.005	0.000	0.000	0.000
HG.TU	kk	-0.113	0.012	0.088	0.154	1.000	0.120	-0.104	0.115	-0.017	0.084	0.224	-0.014	0.197	0.043	0.181	-0.171	0.153
	p	0.345	0.917	0.464	0.196		0.316	0.382	0.336	0.889	0.484	0.058	0.908	0.098	0.721	0.129	0.150	0.199
AC.stad	kk	0.034	-0.025	0.104	0.638	0.120	1.000	-0.082	0.756	0.468	0.437	0.726	0.503	0.818	0.630	0.865	-0.875	0.782
	p	0.776	0.833	0.384	0.000	0.316		0.494	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
MAK	kk	-0.204	-0.057	-0.155	-0.131	-0.104	-0.082	1.000	0.071	-0.120	0.061	-0.153	-0.083	-0.059	0.023	-0.148	-0.013	-0.133
	p	0.086	0.635	0.193	0.274	0.382	0.494		0.551	0.316	0.609	0.201	0.489	0.625	0.851	0.214	0.912	0.264
ILS	kk	-0.071	-0.029	0.160	0.429	0.115	0.756	0.071	1.000	0.391	0.359	0.698	0.325	0.697	0.622	0.713	-0.726	0.563
	p	0.555	0.807	0.179	0.000	0.336	0.000	0.551		0.001	0.002	0.000	0.005	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
IKS	kk	-0.202	0.068	-0.037	0.128	-0.017	0.468	-0.120	0.391	1.000	0.403	0.255	0.710	0.347	0.384	0.277	-0.311	0.278
	p	0.088	0.569	0.754	0.284	0.889	0.000	0.316	0.001		0.000	0.030	0.000	0.003	0.001	0.018	0.008	0.018
PNI	kk	0.043	-0.046	-0.079	0.142	0.084	0.437	0.061	0.359	0.403	1.000	0.279	0.638	0.397	0.293	0.278	-0.293	0.318
	p	0.722	0.700	0.511	0.236	0.484	0.000	0.609	0.002	0.000		0.018	0.000	0.001	0.013	0.018	0.013	0.007
MET.L...	kk	0.024	0.021	0.141	0.372	0.224	0.726	-0.153	0.698	0.255	0.279	1.000	0.156	0.766	0.553	0.725	-0.729	0.612
	p	0.840	0.860	0.238	0.001	0.058	0.000	0.201	0.000	0.030	0.018		0.190	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
UM	kk	-0.030	0.072	0.037	0.187	-0.014	0.503	-0.083	0.325	0.710	0.638	0.156	1.000	0.354	0.384	0.310	-0.315	0.282
	p	0.803	0.546	0.757	0.117	0.908	0.000	0.489	0.005	0.000	0.000	0.190		0.002	0.001	0.008	0.007	0.017
Ki67	kk	0.000	-0.031	0.053	0.352	0.197	0.818	-0.059	0.697	0.347	0.397	0.766	0.354	1.000	0.585	0.775	-0.794	0.667
	p	1.000	0.798	0.661	0.002	0.098	0.000	0.625	0.000	0.003	0.001	0.000	0.002		0.000	0.000	0.000	0.000
CD105	kk	-0.099	-0.012	0.024	0.328	0.043	0.630	0.023	0.622	0.384	0.293	0.553	0.384	0.585	1.000	0.566	-0.578	0.646
	p	0.408	0.922	0.840	0.005	0.721	0.000	0.851	0.000	0.001	0.013	0.000	0.001	0.000		0.000	0.000	0.000
STMN1	kk	0.079	0.033	0.172	0.607	0.181	0.865	-0.148	0.713	0.277	0.278	0.725	0.310	0.775	0.566	1.000	-0.829	0.768
	r	0.512	0.784	0.148	0.000	0.129	0.000	0.214	0.000	0.018	0.018	0.000	0.008	0.000	0.000		0.000	0.000
E-cadh	kk	0.077	0.015	-0.060	-0.515	-0.171	-0.875	-0.013	-0.726	-0.311	-0.293	-0.729	-0.315	-0.794	-0.578	-0.829	1.000	-0.708
	p	0.519	0.904	0.617	0.000	0.150	0.000	0.912	0.000	0.008	0.013	0.000	0.007	0.000	0.000	0.000		0.000
VEGF	kk	0.105	-0.073	0.074	0.578	0.153	0.782	-0.133	0.563	0.278	0.318	0.612	0.282	0.667	0.646	0.768	-0.708	1.000
	p	0.378	0.543	0.537	0.000	0.199	0.000	0.264	0.000	0.018	0.007	0.000	0.017	0.000	0.000	0.000	0.000	
<b>parametri</b>	<b>POL</b>	<b>STAR</b>	<b>Lok</b>	<b>PT.st</b>	<b>HG.tu</b>	<b>AC.St</b>	<b>MAK</b>	<b>ILS</b>	<b>IKS</b>	<b>PNI</b>	<b>MET.LČ</b>	<b>UM</b>	<b>Ki67</b>	<b>CD 105</b>	<b>STMN 1</b>	<b>E-cadh</b>	<b>VEGF</b>	

\*signifikantno p<0.05, kk/ Spearman / koeficijent korelacije

U kolorektalnom adenokarcinomu odlična korelativna povezanost definisana visoko značajnim i negativnim koeficijentom ( $r=-0.875$ ), postoji između E-cadherina i Astler Coller stadijuma, zatim pozitivna između Stathmin1 i Astler Coller stadijuma ( $r=0.865$ ), a dobra, pozitivna i značajna između ovih stadijuma Ki67 ( $r=0.818$ ) i VEGF ( $r=0.782$ ). Slabija, ali u rangu umerene je pozitivna i značajna korelacija CD105 i Astler Coller stadijuma ( $r=0.630$ ) (tabela 31).

U međusobnoj korelaciji ekspresije E-cadherina, Stathmin1, Ki67, VEGF i CD105, dominira po negativnoj povezanosti i signifikantnosti korelacija Stathmin1 i E-cadherin ( $r=-0.829$ ). Obrnuta proporcionalnost (negativan predznak korelacije) znači da sa povećanjem ekspresije E-cadherin-a opada nivo ekspresije Stathmin1, i obrnuto. Sledi negativna korelacija E-cadherin-a i Ki67 ( $r=-0.794$ ), zatim E-cadherin-a i VEGF ( $r=-0.768$ ), kao i umerena povezanost E-cadherina i CD105 ( $r=-0.578$ ).

Ki67 je u dobroj, negativnoj i značajnoj korelaciji sa E-cadherinom ( $r=-0.794$ ), u dobroj, pozitivnoj i značajnoj korelaciji sa Stathmin1 ( $r=0.775$ ), VEGF ( $r=0.667$ ) i u umerenoj korelaciji sa CD105 ( $r=0.585$ ).



CD105 je u umerenoj, pozitivnoj i značajnoj korelaciji sa Stathmin1( $r=0.566$ ), Ki67( $r=0.5859$ ), VEGF ( $r=0.646$ ) i umerenoj negativnoj sa E-cadherinom ( $r=-0.578$ ).

Stathmin1 je u dobroj, negativnoj i značajnoj korelaciji sa E-cadherinom ( $r=-0.829$ ), u dobroj i pozitivnoj sa VEGF ( $r=0.768$ ) i Ki67( $r=0.775$ ) i u umerenoj povezanosti sa CD105 ( $r=0.566$ ).

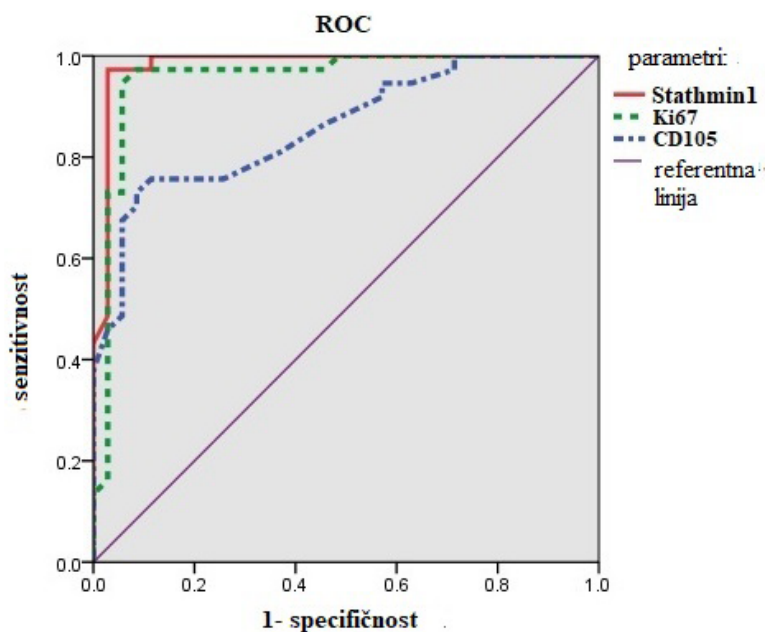
VEGF je u dobroj, pozitivnoj i značajnoj vezi sa Stathmin1( $r=0.768$ ), i sličnoj, ali negativnoj sa E-cadherinom ( $r=-0.829$ ), zatim sa Ki67 ( $r=0.667$ ) i CD105( $r=0.646$ ) (tabela 31).

### 5.2.6. ROC analiza

Primenom ROC (receiver operating characteristics) analize određene su granične vrednosti nuklearno proliferativnog antigena (Ki67), markera angiogeneze (CD105) i regulatornog proteina Stathmin1, iznad kojih se, sa visokom pouzdanošću, može tvrditi da će kolorektalni adenokarcinom biti u progresiji sa pojavom i uvećanjem metastatskog potencijala. (grafikon 19).

Visoko signifikantna vrednost površine ispod krive AUC (area under the curve), pokazuje da su dobijene cut off vrednosti, uz visoku senzitivnost i specifičnost, pouzdani dijagnostički markeri progresije kolorektalne karcinogeneze. (tabela32).

Najveći predikcioni potencijal (performanse) u progresiji kolorektalnog adenokarcinoma ima STMN1, zatim Ki67, i na kraju CD 105 (tabela 32).



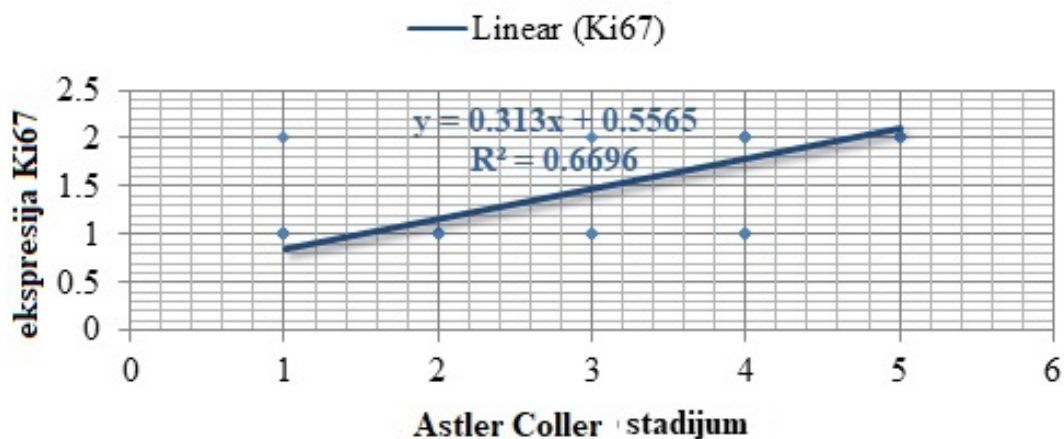
Grafikon 19. Određivanje graničnih vrednosti parametara u predikciji razvoja kolorektalnog adenokarcinoma.

Tabela 32. Karakteristike graničnih vrednosti (Cut off) – ROC analiza

Parametri	AUC	p	CI (95%)	Cut off	Senzitivnost	Specifičnost
<b>Stathmin1</b>	0.982	<0.0001	0.951-1.013	<b>1891.50*</b>	97.3%	91.4%
<b>Ki67</b>	0.956	<0.0001	0.902-1.011	<b>2902.68*</b>	97.3%	91.4%
<b>CD105</b>	0.860	<0.0001	0.775-0.944	<b>565.07*</b>	73.7%	74.3%
AUC- Area Under the Curve		*broj pozitivnih ćelija u tkivu mm2		CI- interval poverenja		

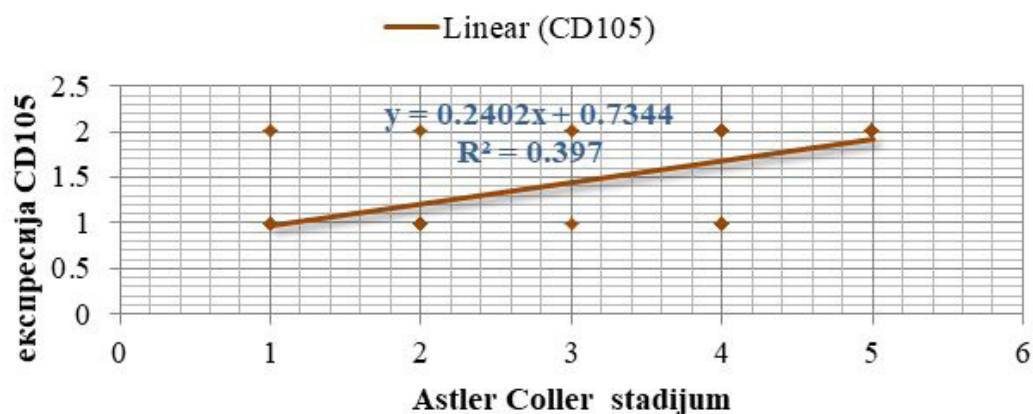
### 5.2.7. Regresiona analiza

Kako je prethodna korelaciona analiza pokazala da je jačina povezanosti, nuklearnog proliferativnog antigena (Ki67), markera angiogeneze (CD105) i regulatornog proteina Stathmin1, značajna i vrlo visoka, to je poslužilo kao osnov za primenu regresione analize. Jednačine pojedinačne, linearne povezanosti svakog od navedenih markera i progresije kolorektalnog adenokarcinoma (preko Astler Coller stadijuma), prikazuju grafikoni 20. 21 i 22.



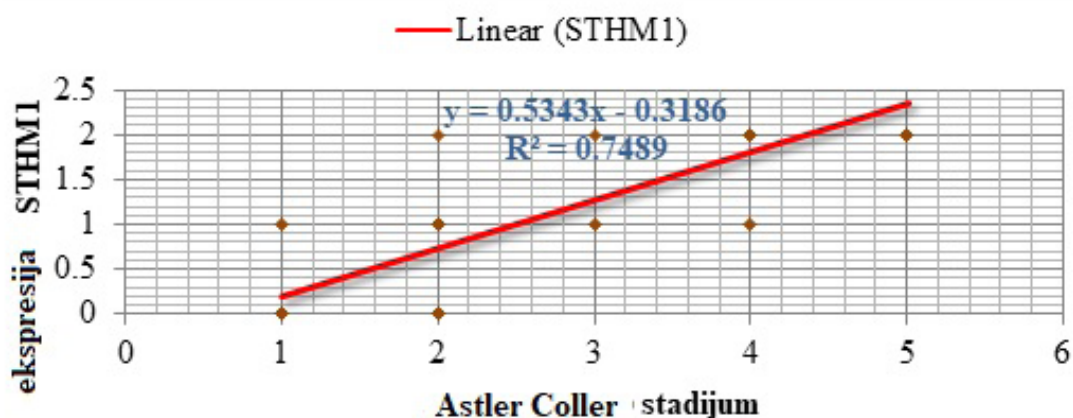
R2- Koeficijent determinacije regresionog modela

Grafikon 20. Linearna zavisnost ekspresije Ki67 i stadijuma razvoja kolorektalnog adenokarcinoma



R2- Koeficijent determinacije regresionog modela

Grafikon 21. Linearna zavisnost ekspresije CD105 i stadijuma razvoja kolorektalnog adenokarcinoma



R2- Koeficijent determinacije regresionog modela

Grafikon 22. Linearna zavisnost ekspresije Stathmina1 i stadijuma razvoja kolorektalnog adenokarcinoma

U nastavku primene regresione analize cilj je bio da se ustanovi model koji bi predstavljao vezu zavisne promenljive, koja je u ovom slučaju predstavljala progresiju kolorektalnog adenokarcinoma i seta nezavisnih promenljivih. Set nezavisnih promenljivih činili su svi relevantni parametri razmatrani u pojedinačnim analizama ove studije. Primenjena je višestruka *stepwise* linearna regresija.

Višestruka regresija daje model u koji su uključene sve varijable sa kojima je analiza i započeta, bez obzira na njihov različiti značaj, a takođe i u slučaju kada je prisutna velika multi-kolinearnost. *Stepwise* regresija omogućuje da se prevaziđe problem multi-kolinearnosti i sa nezavisnim varijablama koje su od malog značaja. Kada je multi-kolinearnost velika, onda mnoge varijable imaju slično značenje, pa nije potrebno da sve one budu uključene u model. *Stepwise* regresija omogućava da se eliminišu varijable koje se preklapaju sa drugima i zbog toga malo ili uopšte ne doprinose tačnosti u predviđanju modela. Kao rezultat ovog pristupa dobija se novi model sa manjim brojem nezavisnih varijabli koji je isto toliko dobar koliko i model u kojem se nalaze sve nezavisne varijable.

U finalnom modelu (model 5) za predikciju razvoja kolorektalnog adenokarcinoma najveći, udruženi, značaj imaju varijable: E-cadherin, STMN1, udaljene metastaze, pT stadijum i proliferativni Ki67 antigen (tabela 32).

Tabela 32. Regresioni model - Stepwise (korak po korak – od 1 do 5)

Coefficients <sup>a</sup>					
Model	Nestandardizovani koeficijenti		Standardizovani koeficijenti	t	Sig.
	B*	St. greška	Beta*		
1(Constant)	4.032	.101		39.790	.000
E-cadh	-1.981	.131	-.875	-15.108	.000
2(Constant)	2.661	.286		9.298	.000
E-cadh	-1.139	.202	-.503	-5.643	.000
STMN1	.726	.144	.448	5.027	.000
3 (Constant)	2.582	.246		10.505	.000
E-cadh	-1.044	.174	-.461	-5.995	.000
STMN1	.667	.124	.412	5.366	.000
UM	.959	.188	.231	5.096	.000
4 (Constant)	1.641	.360		4.562	.000
E-cadh	-1.029	.162	-.454	-6.346	.000
STMN1	.509	.125	.314	4.074	.000
UM	.962	.175	.231	5.493	.000
pT.stad	.401	.118	.170	3.388	.001
5 (Constant)	.460	.461		.999	.321
E-cadh	-.762	.166	-.336	-4.599	.000
STMN1	.320	.126	.197	2.547	.013
UM	.865	.163	.208	5.307	.000
pT.stadijum	.517	.113	.219	4.565	.000
Ki67	.648	.176	.248	3.678	.000

Zavisna varijabla: Astler Coler stadijum  
t- testSig.- značajnost pojedinih varijabli

Nestandardizovani regresioni koeficijenti B\* mogu biti u jednačini za izračunavanje predikcije zavisne varijable. Negativna vrednost ukazuje na negativnu povezanost. Povećanje vrednosti nezavisne varijable rezultuje smanjenjem vrednosti zavisne varijable. U multiploj regresiji koeficijenti daju iznos promene zavisne varijable za jediničnu promenu nezavisne (eksplanatorne) varijable, uslovno kad su sve ostale varijable nepromenjene. Standardizovani koeficijent Beta\* koristi se za tumačenje relativnog značaja pojedinih varijabli.

Koeficijent determinacije finalnog regresionog modela iznosi (R Square= 0.912), što govori da je oko 91% varijabli tezan ishodne varijable Astler Coler stadijum objašnjeno varijabilitetom statistički značajnih regresora iz tabele: E-cadherin, STMN1, udaljene metastaze (UM), pT stadijum, proliferativni Ki67antigen.

Tabela 33. Karakteristike modela 1 do 5

Model	R	R Square
1	.875a	.765
2	.910b	.828
3	.936c	.876
4	.945d	.894
5	.955e	.912

a. Predictors: (Constant), E-cadh  
b. Predictors: (Constant), E-cadh, STHM1  
c. Predictors: (Constant), E-cadh, STHM1, UM  
d. Predictors: (Constant), E-cadh, STHM1, UM, pT. stad  
e. Predictors: (Constant), E-cadh, STHM1, UM, pT. stad, Ki67  
Dependent Variable: Astler Coller stadijum

## **6. DISKUSIJA**

### **6.1. Kliničko-patološke karakteristike kolorektalnog karcinoma**

Prema podacima Globocana u 2012. od karcinoma svih lokalizacija je obolelo 14 miliona ljudi. Od ukupnog broja obolelih kod 10% ili oko 1.360.000 ljudi je dijagnostikovao kolorektalni karcinom, što ga stavlja na treće mesto po učestalosti oboljevanja od svih karcinoma. Postoji porast incidencije kolorektalnog karcinoma u visokorazvijenim zemljama (koja se više nego udvostručila u odnosu na sredinu 70-ih godina prošlog veka) i sada je skoro 3x veća nego u srednje i slabo ekonomski razvijenim zemljama. Incidenca kolorektalnog karcinoma je 30/100.000 u Severnoj Americi, Australiji, Novom Zelandu i Japanu u odnosu na manje od 5/100.000 u Africi i delovima Azije. Kolorektalni karcinom je na trećem mestu po učestalosti u muškoj populaciji (10%) i na drugom mestu kod žena (9.2%)(39)

Prema Globocanu iz 2018. god., karcinom debelog creva je i dalje drugi vodeći uzrok smrti od raka posle raka pluća, sa ukupno 881.000 preminulih osoba. U pogledu globalne incidencije, ovaj tumor i posle 6 godina zadržava svoje treće mesto posle raka pluća i dojke, sa 1,8 miliona novih slučajeva prijavljenih u 2018. godini (2).

Prethodne studije su izvestile da je petogodišnja stopa preživljavanja od kolorektalnog karcinoma oko 64%, ali nedavni izveštaj Li i sar., 2020. god. ukazuje da petogodišnja stopa preživljavanja metastatskog kolorektalnog karcinoma iznosi samo 12% (345).

Maligni tumori u Srbiji predstavljaju drugi vodeći uzrok obolevanja i to odmah posle kardiovaskularnih bolesti. Karcinom kolorektuma je, na osnovu standardizovane stope incidence drugi vodeći uzrok obolevanja od karcinoma u Srbiji i to u ženskoj iza raka dojke a u muškoj populaciji iza raka pluća. U Srbiji standardizovana stopa incidencije za karcinom kolorektuma, prema izveštaju Nacionalnog vodiča dobre kliničke prakse za dijagnostikovanje i lečenje raka kolona i rektuma, iznosi 27/100.000 stanovnika (308).

Rizik za nastanak kolorektalnog karcinoma počinje da raste nakon četrdesetih godina života, sa značajnim porastom između 50-55 godine i sa svakom narednom dekadom života rizik se udvostručuje (46,48). Međutim čini se da postoji porast oboljevanja od ovog tumora među mladima i po američkim izvorima kolorektalni karcinom postaje uobičajeni tip novootkrivenih karcinoma kod muškaraca i žena u starosnoj grupi od 20. do 49.godina. Tako da, nasuprot smanjenju incidence karcinoma debelog creva u starijih osoba, dolazi do povećanja stope incidence kod ljudi ispod 55. godina života i to oko 2% godišnje u poslednjih deset godina (120)

Kolorektalni karcinom nastaje kao posledica složene interreakcije između nasledne predispozicije i uticaja faktora iz spoljašnje sredine (1,58,65,66,69,82,94).

Najveći broj kolorektalnih karcinoma pripada grupi sporadičnih karcinoma, a manji broj njih nastaje zbog poznatih genetskih sindroma. To ukazuje na snažnu ulogu životne sredine u razvoju ovog tumora. Međutim, treba imati na umu da genetski faktori mogu izmeniti efekte okoline u predispoziciji za ovu bolest (55,66,75).

Oko 25% pacijenata sa kolorektalnim karcinomom ima pozitivnu porodičnu anamnezu što govori u prilog značajne uloge i genskih faktora u patogenezi ovog tumora. Nasledni kolorektalni karcinomi se dele na familijarnu adenomatoznu polipozu (FAP), povezanu sa delecijom 5q21 hromozoma i nasledni nepolipozni karcinom kolona (HNPCC), koji je takođe autozomno-dominantna bolest (1,55,58).

Danas se zna da u patogenezi kolorektalnog karcinoma postoje tri patogenetski različita puta. Prvi i najčešći je APC $\beta$  kateninski put poznat kao sekvenca adenom-karcinom ili put hromozomske nestabilnosti-CIN, koji je registrovan u oko 85% kolorektalnih karcinoma (90,93,94). Adenomatozne polipe treba razlikovati od juvenilnih polipa i hamartoma. Adenomatozni polipi su obično vegetantne strukture iznad ravni sluzokože, a mogu da rastu na peteljci (pedunkularni) ili da širokom bazom naležu na sluzokožu (sesilni). U odnosu na histološki obrazac rasta adenomatozni polipi se dele na tubularne, vilozne i tubulo-vilozne, pri čemu vilozni histološki tip ima veću učestalost maligne alteracije od tubularnog tipa. Postoji zapažanje da, bez obzira na histološki tip, veliki polipi posebno veći od 10mm znatno češće podležu malignoj alteraciji, a takođe se smatra da učestalost maligne alteracije zavisi i od broja adenomatoznih polipa (1,3,32).

Adenom-karcinom sekvenca je povezana sa brojnim genskim alteracijama koje perzistiraju tokom dužeg vremenskog perioda, pri čemu dolazi do nagomilavanja višestrukih mutacija. Promene pre svega nastaju na APC genu i one su odgovorne za promene u atherenciji ćelija i poremećaje proliferacije i apoptoze (93,95). Zatim se javljaju mutacije KRAS gena koje stimulišu proliferaciju ćelija, i delecija DCC supresornog gena i mutacije supresornog p53 gena koje igraju ključnu ulogu u tranziciji adenoma u karcinom (94,95,97).

Oko 15% kolorektalnih adenokarcinoma nastaje mehanizmom mikrosatelitske nestabilnosti (MSI). Ovi tumori imaju bolju prognozu prilagođenu stadijumu u poređenju sa mikrosatelitski stabilnim (MSS) tumorima, ali se čini da su otporni na lečenje 5-fluorouracilom (101,384). Mikrosateliti su ponavljajuće sekvence DNK koje su sklone greškama tokom replikacije DNK ako je MMR (Mismatch repair) sistem neispravan. MSI se definiše kao promena u dužini mikrosatelitskih sekvenci. Tipično se procenjuje analizom dva mononukleotidna ponavljanja (BAT-25 i BAT-26) i tri dinukleotidna ponavljanja (D2S123, D5S346 i D17S250), poznatim kao Bethesda panel, poređenjem između DNK uzoraka ekstrahovanih iz normalnog i tumora tkiva istog pacijenta (104). Indirektna analiza MSI statusa može se dobiti imunohistohemijskim ispitivanjem ekspresije MMR proteina, koji su prisutni u normalnim ćelijama, ali pokazuju gubitak ekspresije u ćelijama MSI tumora (384).

Treći karcinogeni mehanizam je hipermetilacija genoma (CIMP) koja dovodi do inaktivacije transkripcije gena koji imaju ulogu u tumorskih supresora. U ranoj fazi nastanka CIMP tumora registrovane su BRAF mutacije. BRAF 600 mutacija je identifikovana u oko 19% sporadičnih kolorektalnih karcinoma. Hipermetilacija promotera u MLH1 sporadičnom kolorektalnom karcinomu nađena u 83%-100% tumora, ali i u oko 15% obolelih sa Linč sindromom, što znatno komplikuje diferencijalnu dijagnozu (95).

Zapaženo je da je preživljavanje obolelih od kolorektalnog karcinoma povezano sa molekularnim subtipovima tumora klasifikovanim na osnovu MSI, CIMP, BRAF-i KRAS mutacija. Tako je u grupi sa MSI-H tumorima nađena najviša stopa petogodišnjeg preživljavanja (oko 90%-93%), a iza njih sledi grupa sa MSI-L/MSS tumorima bez CIMP ili BRAF i KRAS mutacija sa petogodišnjim preživljavanjem od oko 72%. Pacijenti sa CIMP i BRAF mutacijama imali su stopu petogodišnjeg preživljavanja od oko 49% (385).

Od spoljašnjih faktora koji povećavaju rizik za nastanak kolorektalnog karcinoma najčešće se ističu hrana bogata mesom i mastima životinjskog porekla, pušenje, konzumacija alkohola, gojaznost i fizička neaktivnost. Studije o uticaju ishrane na predispoziciju kolorektalnog karcinoma su uglavnom kontradiktorne, ali je ipak u literaturi istaknuto da je najveći rizik od kolorektalnog karcinoma zabeležen u grupi sa velikom konzumacijom mesa (70,71,72,75,87,89,386).

Istraživanja veze između promenljivih faktora životne sredine, poput stila života i ishrane, i molekularnih puteva povezanih sa kolorektalnim karcinomom pokazala su da je gojaznost povezana sa visokim nivoom leptina i leptin receptora, da je rizik za karcinome rektuma koji sadrže mutacije p53 i KRAS manji kod osoba sa visokim nivoom fizičke aktivnosti. Takođe je uočeno da pušenje cigareta povećava rizik od MSI-, CIMP pozitivnog i BRAF mutiranog kolorektalnog karcinoma. Većina studija nije mogla da pronađe povezanost između specifičnih molekularnih podtipova kolorektalnog karcinoma i unosa alkohola (386).

Simptomi kolorektalnog karcinoma najčešće zavise od anatomske lokalizacije tumora u kolonu. Na primer ukoliko je tumor lokalizovan u ceko-ascendentnom kolonu, gde je lumen širi nego u ostalim delovima kolona, a stolica relativno tečna, čak ni veliki tumori ne moraju da izazivaju opstruktivne simptome. Sa druge strane tumori lokalizovani u poprečnom kolonu, u kome je stolica kompaktna, a lumen už, tumori obično rastu intramuralno i prstenasto zahvataju čitav zid kolona, pa se kao vodeći pojavljuje opstruktivni simptom sa bolovima nakon jela, meteorizmima i naizmeničnom smenom opstipacije i dijareje, a ne retko se može razviti ileus sa perforacijom creva. Tumori u ascendentnom kolonu koji najčešće imaju ulcerativni način rasta, dovode do hroničnog gubitka krvi, uglavnom se prezentuju anemijom, umorom, slabošću, angioznim bolovima, palpitacijama i dr. Tumori lokalizovani u rektosigmoidnom kolonu su povezani sa lažnim pozivima na stolicu, suženim promerom stolice i pojavom svetle krvi u stolici (32,119,251,296).

Nespecifični simptomi, u ranoj fazi bolesti, ponekad stvaraju teškoće u diferencijalnoj kliničkoj dijagnozi, sa drugim malignim tumorima lokalizovanim u jetri i žučnim putevima, želucu, pankreasu ili u genitalnim organima kod žena. U ovim slučajevima, medicinske dijagnostičke procedure imaju



glavnu ulogu u dijagnozi i lečenju. Ipak, kolonoskopija ostaje najvažnija metoda ispitivanja tumora debelog creva u ovom trenutku. Većina studija podržava ideju da kolonoskopija predstavlja zlatni standard za dijagnozu i praćenje kolorektalnog karcinoma (120). Kolonoskopija osim što omogućuje uzimanje biopsijskih uzoraka, omogućava pregled čitavog kolona, a pruža i mogućnost uklanjanja pridruženih adenoma (135,136).

Nakon gradiranja, stadiranja i uspostavljanja definitivne dijagnoze, terapija kolorektalnog karcinoma najčešće zavisi od stepena proširenosti bolesti, odnosno od stadijuma tumora, pri čemu je neophodno istaći da je savremeno stadiranje tumora znatno modifikovano uvođenjem novih, posebno molekularnih metoda dijagnostike (246). Prva terapijska metoda je najčešće hirurška, a izbor hirurške tehnike uglavnom zavisi od lokalizacije tumora, načina lokalnog širenja tumora, od anatomije krvnih sudova kolona i dr (298,299,300). Obično postoperativno sledi hemoterapija i/ili radioterapija (306,313,314,315).

Poslednju deceniju se u naučnoj javnosti i kliničkoj praksi u terapiji kolorektalnog karcinoma snažno podržava koncept personalizovanog lečenja koji podrazumeva optimalno lečenje pacijenata u skladu sa njihovim ličnim genetskim i molekularnim karakteristikama njihovih tumora (20,216,220). Novim terapijskim pristupom i primenom ciljane terapije, molekularno testiranje tumora nakon operacije dobija vrlo važnu ulogu. Lekovi za ciljanu terapiju napadaju kancerske ćelije i posebno ciljaju strateške tačke za preživljvanje ćelija, kao što su replikacija i migracija (19,213).

Ciljana terapija se deli u dve glavne kategorije: monoklonska antitela i male molekule. Monoklonska antitela su veštačke verzije proteina imunog sistema koji su dizajnirani za napad na određene ciljeve na ćelijskoj membrani - receptore. Receptori prenose signale iz ćelijske okoline u jedro ćelije (21). Ciljanjem određenih receptora se blokira prenos signala za preživljavanje tumorskih ćelija. Tipičan primer korišćenja monoklonskih antitela su Cetuksimab i Panitumumab (receptori anti-epitelnog faktora rasta-EGFR) koji su razvijeni za terapiju kolorektalnog karcinoma. Početno razočaranje zbog činjenice da ti lekovi nisu delovali kod određenih pacijenata je prevaziđeno saznanjem da oni ne deluju kod pacijenata sa kolorektalnim karcinomima u kojima su identifikovane KRAS genetske mutacije. Iz tog razloga je neophodno ispitati status KRAS mutacije pre nego što se uključi anti-EGFR terapija. (213,387).

## **6.2. Ekspresija korišćenih biomarkera u ispitivanim grupama**

### **6.2.1. Ekspresija Ki67/proliferativni indeks (proIDX)**

Jedan od najvažnijih bioloških događaja tokom karcinogeneze je nekontrolisana proliferacija malignih ćelija, koja definiše biološko ponašanje tumora na bazi lokalnog invazivno-destruktivnog rasta i sposobnosti migracije malignih ćelija. Iz proliferišućih ćelija je izolovan niklearni proliferativni antigen za koga je napravljeno monoklonsko antitelo Ki67 (341).

Smatra se da je Ki67 dobar pokazatelj proliferativnog indeksa malignih tumora, jer se nalazi

u ćelijama u čitavoj proliferativnoj fazi ciklusa, a njegova ekspresija je tokom ćelijskog ciklusa strogo regulisana ravnotežom između sinteze i razgradnje tako da je njegov poluživot kratak pa se vizualizuje i postaje detektibilan u jedrima ćelija tokom srednje-kasne  $G_1$  faze kada su nivoi niski, a zatim njegova ekspresija raste kroz S i  $G_2$  do M faze (342).

Ispitivanjem ekspresije Ki67 odnosno indeksa proliferacije (proIDX) u kolorektalnom karcinomu, u ovoj studiji, dobijene su apsolutne veličine broja Ki67-imunopozitivnih ćelija u  $\text{mm}^2$  tkiva, a iz apsolutnih vrednosti proliferativnog Ki67 antigena u odnosu na odstupanje od medijane dobijen je indeks proliferacije (proIDX). Apsolutni broj Ki67-imunopozitivnih ćelija u jedinici površine tkiva kolorektalnog karcinoma je signifikantno veći od apsolutnog broja Ki67 pozitivnih ćelija/(proIDX) u kontrolnij grupi, pri čemu je ekspresija Ki67 zapažena u 100% slučajeva kolorektalnog karcinoma, što je u saglasnosti sa drugim izveštajima iz literature (120,345,388)

Iako postoji ogromana količina informacija o strukturi, lokalizaciji i regulaciji Ki67, ipak su znanja o funkciji ovog proteina ograničena. Jedino sigurno je dokazano da je Ki67 od vitalnog značaja za ćelijsku proliferaciju jer se uklanjanjem proteina Ki67 pomoću antisense nukleotida sprečava ćelijska proliferacija (344). U nekoliko studija je istaknuto da je ekspresija Ki67/proIDX nezavistan prognostički faktor za stopu preživljavanja (389,390,391),

### 6.2.2. Ekspresija Stathmin 1 (STMN1)

Multifunkcionalni onkoprotein Stathmin1 osim važne uloge u montaži i demontaži deobnog vretena učestvuje i u kontroli progresije ćelijskog ciklusa, a ima važnu ulogu i u regulaciji polariteta ćelija, proliferacije, ćelijske migracije, apoptoze i dr.(325,326,327).

Iako još uvek nisu sasvim rasvetljeni molekularni mehanizmi pomoću kojih Stathmin1 učestvuje u ćelijskoj mitozu, ipak postoji usaglašen stav da je njegova aktivnost depolimerizacije mikrotubula („microtubule-depolymering activity“) neophodna za uredno napredovanje ćelijskog ciklusa. Tokom prve faze mitoze (profaza) hromatin se kondenzuje u hromosome i mikrotubule formiraju mitotsko vreteno. Tokom prelaska u metafazu vretenasti mikrotubuli se izdužuju i „hvataju“ hromosome i normalno deobno vreteno dobija karakterističan bipolarni oblik. Tokom anafaze i telofaze fluktuacije između polimerizacije i depolimerizacije mikrotubula dovode do demontaže deobnog vretena, nakon čega sledi izlazak iz mitoze, pa nakon reorganizacije mikrotubula ćelija ide u novi ćelijski ciklus. Sve ovo pokazuje da je Stathmin1 neophodan za formiranje mitotskog vretena prilikom ulaska ćelija u deobu, ali i da je neophodan za pravilan izlazak ćelije iz mitoze (325). Pokazano je da inhibicija ekspresije Stathmin1 dovodi do akumulacije ćelija u  $G_2/M$  fazijama i povezana je sa poremećajima u montaži i demontaži deobnog vretena. Isti autori su zapazili i da Stathmin1 utiče na regulaciju ćelijske migracije preko p27 (324).

U našoj studiji smo intracitoplazmatsku ekspresiju Stathmin1 verifikovali u 80,55% kolorektalnih adenokarcinoma. Zhang i sar. 2016. su ekspresiju ovog markera našli u 62,9% kolorektalnih adenokarcinoma, dok su Osone i sar. 2019. u kolorektalnom karcinomu sa ulceroznim

kolitisom ekspresiju Stathmin1 verifikovali u 95,7%, a u kolorektalnom karcinomu bez pratećeg ulceroznog kolitisa ekspresiju Stathmin1 su našli u 100% slučajeva (5,325). Kang i sar. 2012. su, ekspresiju Stathmin1 u želudačnom adenokarcinomu našli u 86,5% slučajeva (324).

Dalje smo zapazili da je ekspresija Stathmin1 izražena apsolutnim brojem STMN1-imunopozitivnih ćelija u mm<sup>2</sup> tkiva kolorektalnog karcinoma signifikantno veća u odnosu na apsolutne vrednosti ekspresije STMN1 u kontrolnoj grupi-ne tumorskom tkivu. Ovi naši nalazi su u skladu sa drugim izveštajima u literaturi (5,325,338).

Izveštaji iz literature ukazuju da STMN1-pozitivni tumori u poređenju sa STMN1-negativnim tumorima pokazuju PIK3CA mutaciju, p53 negativnost i ekspresiju p21. Mutacije PIK3CA aktiviraju PI3K i AKT signalizaciju čime se promoviše rast tumora, nezavistan od faktora rasta, i povećava invazija i metastaziranje. (338)

### 6.2.3. Ekspresija E-cadherina

Osim uloge u adheziji epitelnih ćelija, E-cadherin je uključen u prenos različitih signalnih puteva unutar ćelije (353), u ćelijsku kontrolu i regulaciju aktivnosti određenih gena. E - cadherin takođe deluje kao tumor supresorski protein, štiti ćelije od nekontroliranog rasta i deljenja, a obzirom na različite funkcije, mutiran E-cadherin vrlo lako može dovesti do narušavanja normalne arhitekture tkiva, što može dovesti do razvoja bolesti (348). Smanjenje ekspresije E-cadherina u epitelnim ćelijama dovodi do smanjenog polariteta ćelija i povećanih migratornih i invazivnih karakteristika, a gubitak E-cadherina stimuliše aktivne signale koji iniciraju epitelno mezenhimalnu tranziciju (EMT). (352)

Imunohistoemijskom analizom ekspresije E-cadherina je zapaženo da postoji značajna razlika u ekspresiji ovog markera između tkiva kolorektalnog karcinoma i susednog ne-tumorskog tkiva. Naime, u kolorektalnom karcinomu je u 52.77% slučajeva konstatovano odsustvo ekspresije E-cadherina, a takođe je zapaženo da je izražena ekspresije E-cadherina značajno više zastupljena u ne-tumorskom tkivu. Slične rezultate su publikovali Kim i sar. 2016. koji su na uzorku od 689 kolorektalnih karcinoma, gubitak ekspresije E-cadherina našli u 52% slučajeva (352). O značajnim razlikama u ekspresiji E-cadherina su izvestili i Palaghia i sar. 2016. koji su u značajnih 64,62% slučajeva kolorektalnih karcinoma zabeležili abnormalnu ekspresiju (gubitak ili ekspresiju u citoplazmi), dok su abnormalnu ekspresiju E-cadherina prijavili u 16,67% slučajeva normalne sluznice kolona (392).

Disregulacija E-cadherina uglavnom nastaje usled somatske inaktivacije CDH1 gena, koja je često rani događaj u kolorektalnoj karcinogenezi (393). Pronađeno je više od 120 naslednih mutacija gena CDH1, a osim u kolorektalnom karcinomu somatske mutacije CDH1 gena su identifikovane i kod sporadičnih difuznih karcinoma želuca, lobularnog karcinoma dojke, karcinoma jajnika i karcinoma prostate (394). Još krajem prošlog veka je zapaženo da osobe koje poseduju nasledne mutacije ovog gena imaju oko 80% veću verovatnoću za razvoj naslednog difuznog karcinoma želuca, dok žene uz karcinom želuca imaju i oko 50% veće šanse za razvoj lobularnog karcinoma dojke (395).

#### 6.2.4. Ekspresija Vascular endothelial growth factor (VEGF)

Jedan od najvažnijih i najsnažnijih proangiogenih citokina je VEGF, koji je odgovoran za diferencijaciju endotelnih ćelija, njihovu migraciju, proliferaciju i formiranje cevastih formacija. Povećana ekspresija VEGF može biti izazvana velikim brojem epigenetskih faktora kao što su hipoksija, nizak pH, inflamativni citokini poput interleukina-6, različiti faktori rasta poput FGF (engl. *Fibroblast growth factor*), polni hormoni, različiti hemokini idr. Ostali faktori obuhvataju genetske promene koje uključuju aktivaciju onkogeni i inaktivaciju tumor supresornih gena (VHL, p53, p16, RAS, RAF, HER2/erbB2(neu)) (362,363,368).

U našem istraživanju smo konstatovali značajnu razliku u ekspresiji VEGF u ispitivanim gupama, pri čemu je u tkivu kolorektalnog karcinoma ekspresija VEGF prisutna u značajnih 91.6% slučajeva (34.7% umerena i 56.9% visoka), dok je u kontrolnoj grupi ekspresija VEGF nađena u 27.8% slučajeva. Značajne razlike u ekspresiji VEGF između tkiva kolorektalnog karcinoma i ne-tumorskog tkiva su saopštene i od strane drugih autora (17,362,365,366), pri čemu su Bendardraf i sar. 2017. ekspresiju VEGF verifikovali u 100% ispitivanih kolorektalnih karcinoma, Nogues i sar. 2020. u 80%, a Hashim i sar. 2010. u 51.9% slučajeva kolorektalnih carcinoma (362,365,366). Heterogeni rezultati markiranja ekspresije VEGF najverovatnije su posledica korišćenja imunohistohemijskih metoda i monoklonskih antitela različite senzitivnosti.

Za razliku od kolorektalnog karcinoma, u normalnoj sluzokoži debelog creva i adenomima VEGF se akumulira sa minimalnom ili odsutnom ekspresijom. Povećana ekspresija VEGF značajno korelira sa statusom limfnih čvorova i udaljenim metastazama. Preživljavanje pacijenata sa jakom ekspresijom VEGF je znatno lošije nego kod pacijenata sa slabom ili odsutnom ekspresijom. (362).

VEGF može doprineti angiogenezi stimulisanjem mitogeneze endotelnih ćelija i indukovanjem permeabilnosti mikrocirkulacije. Nekoliko izveštaja je pokazalo da maligne ćelije u kolorektalnom karcinomu proizvode brojne angiogene faktore rasta, uključujući VEGF, i da je ekspresija VEGF nezavisni prognostički faktor u predviđanju prognoze preživljavanja pacijenta (396).

#### 6.2.5. Ekspresija Endoglina (CD105)

Angiogeneza je značajna faza karcinogeneze, budući da je neophodna za rast, invaziju i metastaziranje tumora. Angiogeneza stimuliše rast tumora tako što novostvoreni krvni sudovi omogućuju razmenu hranljivih materija i kiseonika perfuzijom, međutim endotelne ćelije sekretuju i različite faktore rasta (Fibroblast Growth Factor – FGF, Insulin like Growth Factor-2-IGF2 i Platelet-derived Growth Factor-PDGF) koji parakrinim putem stimulišu rast tumorskih ćelija. Pored toga endotelne ćelije na vrhovima kapilara sekretuju enzime kolagenaze, urokinaze i aktivatore plazminogena koji degradiraju vezivno-tkivnu stromu i tako ubrzavaju migraciju ćelija (12).

U ovom istraživanju smo za ispitivanje mikrovaskularne gustine koristili Endoglin (CD105) jer se endoglinsko antitelo prevashodno vezuje za aktivirane endotelne ćelije koje učestvuju u tumorskoj

angiogenezi (378), a važna karakteristika aktivnih endotelih ćelija je prekomerna ekspresija CD105 (377,380). Registrovali smo da je mikrovaskularna gustina (mvdIDX/ CD105 ekspresija) izražena apsolutnim brojem CD105-imunorektivnih ćelija u mm<sup>2</sup> značajno veća u odnosu na mikrovaskularnu gustinu u susednom ne-tumorskom tkivu. Imunoekspresija CD105 je verifikovana u svim ispitivanim kolorektalnim karcinomima. Ovi naši rezultati su u potpunoj saglasnosti sa rezultatima drugih autora (365,378, 397).

Prognostički značaj angiogeneze je bio predmet dugogodišnjih debata u literaturi, a onda je Weidner 1995. uveo koncept "microvessel density" (MVD)- gustina malih krvnih sudova u samom tumoru i sugerisao ulogu MVD u razvoju metastaza u bolesnika sa karcinomom (398). Ubrzo nakon toga Giatromanolaki i sar. 2000. predlažu "EDVIN" kategorije (Invading edge vs.Inner), čime su dopunili stav o značaju neoangiogeneze, a istovremeno dali i korisnu informaciju o prognozi tumora. Po tim kategorijama EDVIN1 tumori (tumori sa niskim MVD na ivici i u centru) imaju bolju prognozu od EDVIN2 tumora (tumori sa visokom MVD na ivici i niskom u centru), kao i od EDVIN 3 tumora (tumori sa visokom MVD i u centru i na ivici) (399).

U našoj studiji, ekspresija Endoglina bila je prisutna u svim proučavanim slučajevima. Endoglin je markirao male sudove sa velikom osetljivošću u tumoru ili oko njega, ali krvni sudovi u ne-neoplastičnom tkivu nisu ili su samo slabo obojeni Endoglinom.

Povećana mikrovaskularna gustina (MVD) predstavlja indirektni marker intenzivne tumorske vaskularizacije koji je udružen kako sa evolucijom bolesti, tako i sa preživljavanjem. Izveštaji iz literature ukazuju da mikrovaskularna gustina može da ukaže na povećan rizik za razvoj lokoregionalne rekurentne bolesti (374), a takođe se ističe da je mikrovaskularna gustina nezavistan prognostički faktor preživljavanja za mnoge maligne tumore (18,32,378).

### **6.3. Ekspresija korišćenih biomarkera u odnosu na kliničko-patološke parametre kolorektalnog karcinoma**

#### **6.3.1. Ekspresija korišćenih markera u odnosu na pol i starosno doba ispitanika**

Ovom studijom je obuhvaćeno 72 ispitanika operisanih u Kliničkom centru Crne Gore i to 42 osobe muškog pola i 30 žena, pri čemu postoji veća zastupljenost ispitanika muškog pola sa preko 70. godina, i žena u intervalu od 61-70god. U Srbiji se kod oba pola registruje porast stope incidence kolorektalnog karcinoma sa godinama starosti, tako da je ovaj tumor najučestaliji kod muškaraca od 70–74 godine, a kod žena sa 75 i više godina, ali se uočava i porast broja obolelih osoba mlađih od 40 godina (308).

U odnosu na rodnu raspodelu, rumunski autori su izvestili da je odnos muškaraca i žena 2:1 za pacijente sa kolorektalnim karcinomom i 2.71:1 za pacijente sa premalignim lezijama, što je u

skladu sa podacima koji su već poznati širom sveta. Incidenca kolorektalnog karcinoma je uglavnom veća u muškaraca nego kod žena, na svim anatomskim segmentima debelog crevo, progresivno se povećavajući u debelom crevu, od cekuma do rektuma. Postoji spekulativno objašnjenje da je niža učestalost kolorektalnog karcinoma kod žena verovatno posledica efekata egzogenih i endogenih hormona, faktora rizika specifičnih za pol i bolja svest o važnosti skrininga kod žena (120).

Ispitivanjem ekspresije Ki67, odnosno proliferativnog indeksa (proIDX), ekspresije Statmin1, E-cadherina, VEGF i Cd105 smo zapazili da nijedan od navedenih markera nije povezan sa polom i starosnom dobi ispitanika.

Uočili smo da je visok proliferativni indeks nešto češći u ispitanika mlađih od 65. godine života, ali bez statističke značajnosti. U literaturi postoji zapažanje o signifikantnoj povezanosti ekspresije Ki67/proIDX sa starosnom dobi pacijenata i to tako da je nivo ekspresije Ki67 značajno viši u mlađih nego u starijih pacijenata (400), Međutim El Otmani i sar. 2020. su nedavno saopštili potpuno kontradiktorne rezultate i izvestili o značajnoj korelaciji između visokog proliferativnog indeksa sa starijom životnom dobi ispitanika sa kolorektalnim karcinomom (401). Osim u kolorektalnom karcinomu, povezanost indeksa proliferacije sa starijom životnom dobi je zapažena i u karcinomu želuca. Isti autori su u karcinomu želuca zapazili i signifikantnu povezanost visokog indeksa proliferacije sa muškim polom (402). U skladu sa našim rezultatima i u drugim brojnim studijama nije zapažena značajna povezanost proliferativnog indeksa sa polom i starosnom dobi ispitanika (120, 391, 403,404).

Broj studija koje su ispitivale klinički značaj ekspresije Stathmin1 u kolorektalnom adenokarcinomu je vrlo oskudan, ali se može slobodno reći da je većina od njih istakla da ekspresija Stathmin1 ne zavisi od pola i starosti ispitanika i to kako u kolorektalnom, tako i u karcinomu želuca (5,338). Sporadično je saopštena pozitivna korelacija ekspresije ovog markera sa starijim životnim dobom kod pacijenata sa difuznim karcinomom želuca (324).

Shodno očekivanju i podaci o ekspresiji E-cadherina u kolorektalnom karcinomu su heterogeni, a sporadična saopštenja o vezi između ekspresije E-cadherina i starosti ispitanika su sasvim kontradiktorna. Tako su Elzagheid i sar. 2012. (405) i Kim i sar. 2016. (352) prijavili povezanost odsustva/smanjene ekspresije E-cadherina sa starijim životnim dobom pacijenata, dok su Palaghia i sar. izvestili o povezanosti odsustva ekspresije ovog markera sa mlađim životnim dobom ispitanika (ispod 50.god) (392). Mi smo u našoj studiji konstatovali neznatnu prevalenciju odsusva E-cadherina u ispitanika mlađih od 65 god., ali bez statističke značajnosti.

Postoji zapažanje da gubitak ekspresije E-cadherina stimuliše Wnt, RhoGTP-aze i EGFR signalizaciju, za koje se zna da imaju aktivnu ulogu u procesu epitelno-mezenhimne tranzicije (EMT). Disregulacija E-cadherina, zbog toga, promoviše disfunkcije ovih signalnih puteva i utiče na polaritet, preživljavanje, invaziju i migraciju ćelija (353).

Signifikantnu povezanost ekspresije VEGF sa muškim polom, u kolorektalnom karcinomu, su pre deceniju i više saopštili Martins i sar. 2013. (406), Poput Saad i sar. 2004. (bilo), Gao i sar. 2016.,

Bendardafa i sar. 2017. (212), ni mi u našoj studiji nismo našli signifikantnu povezanost ekspresije markera neoangiogeneze (VEGF i CD 105) sa polom i starosnom dobi pacijenata, mada smo uočili neznatnu prevalenciju umerene i izražene ekspresije VEGF u grupi ispitanika mlađih od 65god.

### **6.3.2. Ekspresija korišćenih markera u odnosu na lokalizaciju i način tumorskog rasta**

U našoj ispitivanoj grupi kolorektalni karcinom je značajno češći u rektumu (66.7%) u odnosu na druge lokalizacije, što je u potpunoj saglasnosti sa drugim autorima (120,407). Sledeći po lokalizaciji primarnog tumora je ascendentni kolon (desni kolon), a zatim sledi sigmoidni kolon (levi kolon). Postoji zapažanje da su tumori desnog kolona češći kod starijih osoba, kod žena i kod crnaca (32,121). Metastatsko širenje se takođe razlikuje u zavisnosti od primarne lokacije kolorektalnog karcinoma. Desnostrani tumori češće metastaziraju u peritoneum, a veći broj levostranih metastazira u jetru i pluća (121). Pored toga, u jednoj studiji, je zapaženo da su ispitanici sa primarnim kolorektalnim karcinomom smeštenim u levom kolonu imali oko 20% smanjen rizik od smrti u odnosu na osobe sa primarnim tumorom u desnom kolonu (127).

Sprovedene su brojne studije za utvrđivanje da li postoji trend ka povećanju incidencije tumora lokalizovanih u desnom kolonu u poređenju sa distalnom lokacijom. Nekoliko autora zaključilo je da je distribucija proksimalnog kolorektalnog karcinoma u porastu, međutim, ovi podaci nisu podržani od većine drugih istraživača (120).

U ovoj studiji nije identifikovana ni jedna značajna veza između lokacije primarnog kolorektalnog karcinoma ni sa jednim kliničko-patološkim parametrom. Takođe nismo uočili značajnu povezanost lokalizacije tumora sa ekspresijom ni jednog od ispitivanih markera.

Odsustvo povezanosti ekspresije Ki67/proliferativnog indeksa sa lokalizacijom primarnog kolorektalnog karcinoma je saopšteno i od strane brojnih, drugih autora (120,391,400,403,404). U literaturi je pre deceniju i više saopštena veza proliferativnog indeksa sa primarnom lokalizacijom tumora u karcinomu želuca. Naime, u sporadičnom saopštenju Lazar i sar. 2010., su izvestili o statistički značajnoj povezanosti visokog proliferativnog indeksa sa gastričnim karcinomima lokalizovanim u kardiji (402).

Mi smo utvrdili da ekspresija Stathmin1 ne zavisi od lokalizacije tumora ali smo, bez statističke značajnosti, uočili prevalenciju (66.7%) niskog indeksa ekspresije Stathmin1 u kolorektalnim karcinomima lokalizovanim u sigmoidnom kolonu. Zhang i sar. 2016. su takođe potvrdili da ekspresija Stathmin1 ne zavisi od lokalizacije primarnog tumora (5).

U našem istraživanju ne postoji značajna povezanost ekspresije E-cadherina sa lokalizacijom primarnog kolorektalnog karcinoma, što je u saglasnosti sa drugim izveštajima (349, 352,392).

Poput ekspresije predhodnih markera i ekspresija VEGF i indeks mikrovaskularne gustine (mvdIDX), u ovoj studiji, ne zavise od lokalizacije primarnog kolorektalnog karcinoma. Ovi rezultati

su u skladu sa rezultatima drugih autora (396,408,409). Međutim, Bendardaf i sar. 2008. su izvestili o signifikantnoj povezanosti ekspresije VEGF sa lokalizacijom tumora u levom kolonu i rektumu (362).

Način rasta tumora u kolorektumu zavisi od faze u kojoj se tumor nalazi u trenutku postavljanja dijagnoze (119). Zapaženo je da tumori u levom kolonu obično imaju vegetantni način rasta. Ovi tumori su obično većih dimenzija, mekane su konzistencije i retko izazivaju opstrukcije (3). U levom kolonu se najčešće lokalizuju tumori sa anularnim načinom rasta odnosno rastu prožimajući čitavu cirkumferenciju zida, obično su manjih dimenzija i češće od desnostranih tumora izazivaju opstrukciju, a ne retko i perforaciju zida (32,119).

Najčešće zastupljen način tumorskog rasta, ali bez statističke značajnosti, u našoj ispitivanoj grupi je ulcero-infiltrativni (37.5%), pa slede infiltrativni, vegetantno-infiltrativni i vegetantni način tumorskog rasta.

U našoj studiji je ekspresija Stathmin1 statistički značajno povezana sa načinom tumorskog rasta. Najveći broj slučajeva (59.3%) sa visokom ekspresijom Stathmin1 je zapažen u tumora sa ulcero-infiltrativnim načinom rasta, a zatim slede tumori sa vegetantno-infiltrativnim i infiltrativnim načinom rasta. Značajno odsustvo ekspresije Stathmin1 je notirano u tumora sa vegetantnim u ulcero-vegetantnim načinom rasta.

Ekspresija VEGF je takođe statistički značano povezana sa načinom rasta kolorektalnog karcinoma. U značajnih 70.4% slučajeva visoka ekspresija VEGF je povezana sa ulcero-infiltrativnim i u 68.8% sa vegetantno-infiltrativnim tipom rasta. Umerena ekspresija VEGF je najčešća u tumora sa vegetantnim načinom rasta (66.7 %), u kojima je istovremeno verifikovan i najveći broj slučajeva bez ekspresije Stathmin1 (33.3%). Martins i sar. 2013., su takođe zapazili značajnu povezanost ekspresije ovog markera sa vegetantnim načinom rasta kolorektalnog karcinoma (406).

U ovoj studiji nije nađena značajna povezanosti proliferativnog indeksa (proIDX), indeksa mikrovaskularne gustine (mvdIDX) i ekspresije E-cadherina sa načinom tumorskog rasta. Za razliku od nas Kim i sar. 2016. su zapazili signifikantnu povezanost redukovane ekspresije E-cadherina sa infiltrativnim načinom rasta kolorektalnog karcinoma (352).

Saopštenja u literaturi koja se odnose na ispitivanje zavisnosti ekspresije markera korišćenih u ovoj studiji, u odnosu na lokalizaciju i način rasta kolorektalnog karcinoma su oskudna, tako da nismo u mogućnosti da adekvatno uporedimo naše rezultate.

### **6.3.3. Ekspresija korišćenih markera u odnosu na pT status tumora**

Patološki status tumora (pT) se određuje na bazi anatomske proširenosti tumora u okolne strukture (245). Predstavlja nezavistan prognostički faktor i značajan je faktor rizika za pojavu recidiva i metastaza. Na 35. konferenciji CAP svrstan je u prvu kategoriju prognostičkih faktora (246).

U našoj studiji je zapaženo da je u značajno visokom broju slučajeva (75.0%) kolorektalni



karcinom bio sa pT<sub>3</sub>, a zatim slede tumori sa pT<sub>2</sub>, pT<sub>4</sub> i pT<sub>1</sub> statusom. Sličnu distribuciju kolorektalnih karcinoma u odnosu na pT status su opisali rumunski autori koji su takođe najviše slučajeva tumora verifikovali sa pT<sub>3</sub>, a zatim sa pT<sub>2</sub> i pT<sub>1</sub> statusom (406). pT stadijum je umerenim visoko značajnim koeficijentima korelacije povezan sa Astler-Coler stadijumom (r=0.638), invazijom limfnih sudova (r=0.429) i metastazama u limfnim čvorovima (r=0.732).

Takođe smo zapazili da ekspresija svih ispitivanih markera u većoj ili manjoj meri signifikantno zavisi od pT statusa tumora,

U najzastupljenijem pT<sub>3</sub> stadijumu visok proliferativni indeks je zastupljen u visokom broju slučajeva (61.1%), dok je u pT<sub>2</sub> stadijumu u signifikantno visokom broju slučajeva (91,7%) uočen nizak proliferativni indeks (proIDX)/ekspresija Ki67. Korelaciona analiza je pokazala da između proliferativnog indeksa i pT statusa tumora postoji ne tako jaka, ali značajna uzajamna povezanost koja je definisana slabijim ali značajnim koeficijentom korelacije (r=0.352). Od strane drugih autora takođe je zapažena povezanost proIDX sa pT statusom kolorektalnog karcinoma (400,403). Međutim, u studiji Bădulescu i sar. 2016. nije nađena povezanost ekspresije Ki67 sa pT statusom uz komentar da kolorektalni karcinomi sa pozitivnom ekspresijom Ki67 u preko 35% imaju veći rizik od recidiva i zbog toga i lošiju prognozu (407).

Ekspresija Stathmin1 je značajno povezana sa pT stadijumom tumora i to tako da je visok nivo ekspresije Stathmin1 u signifikantno visokom broju slučajeva (63%) eksprimiran u pT<sub>3</sub> stadijumu. U pT<sub>2</sub> stadijumu je izostanak ekspresije Stathmin1 nađen u visokom procentu (75%), ali bez statističke značajnosti u odnosu na učestalost niske ekspresije ovog markera. Korelativnom analizom smo utvrdili da su Stathmin1 i pT status povezani visoko značajnom, umerenim, pozitivnim koeficijentom korelacije (r=0.607). Pozitivna povezanost Stathmin1 sa uznapredovanim pT stadijumom opisana je i od strane drugih autora (5,324), a osim toga ova veza je identifikovana i u difuznom karcinomu želuca (324,338).

Komparativnom analizom proteoma utvrđeno je da je Stathmin1 visoko značajan regulatorni protein u ćelijama kolorektalnog karcinoma i da su poremećaji u nivoima ekspresije Stathmin1 imali za posledicu značajne promene u ćelijskoj migraciji, invaziji, adheziji i formiranju kolonija (5). Postoji mišljenje da Stathmin1 utiče na pokretljivost ćelija preko p27(Kip1), pa je u vezi sa tim, *in vitro* pokazano da Stathmin1 stimuliše pokretljivost kroz ekstracelularni matriks. Takođe je, u *in vitro* uslovima pokazano i da funkcionalna inhibicija Stathmin1 smanjuje proliferaciju i invaziju ćelijskih linija SGC7901 karcinoma želuca (324).

Ekspresija E-cadherina je značajno povezana sa pT stadijumom tumora. Naime, u signifikantnom broju slučajeva (63%) je registrovan gubitak ekspresije ovog markera u pT<sub>3</sub>, u 100% slučajeva u pT<sub>4</sub> stadijumu, dok je u pT<sub>2</sub> i u pT<sub>1</sub> stadijumu značajna umerena ekspresija E-cadherina. Ekspresija E-cadherina je visoko značajnim, umerenim, ali sa negativnim predznakom, koeficijentom korelacije povezana sa pT statusom kolorektalnog karcinoma (r= -0.515). što je u saglasnosti sa drugim izveštajima (408,349), ali se razlikuje od rezultata Elzagheid i sar. 2012., i Palaghia i sar. 2016., koji nisu identifikovali vezu između ekspresije E-cadherina i pT statusa tumora (392,405).

Aberacije i smanjenje ekspresije E-cadherina izazivaju rupturu u kontaktu ćelija-ćelija, čime je omogućeno odvajanje i migraciju ćelija. Osim toga ove rupturu vode ka epitelno-mezenhimnoj tranziciji (EMT), koja ubrzava progresiju, invaziju i metastaziranje mnogih karcinoma (349).

Ekspresija VEGF je značajno povezana sa pT stadijumom tumora. Zapaža se da u pT<sub>3</sub> stadijumu postoji visoka ekspresija VEGF u značajnom broju slučajeva (66.7%) kao i u stadijumu pT<sub>4</sub> (100%). U ovom stadijumu visok indeks mikrovaskularne gustine (mvdIDX) /CD105 ekspresija je zastupljen takođe u velikom broju slučajeva, ali bez statističke značajnosti u odnosu na nizak mvdIDX. Nizak indeks mikrovaskularne gustine je u značajnom broju slučajeva (83.3%) zastupljen u pT<sub>2</sub> stadijumu. Korelativna analiza ukazuje da je ekspresiju VEGF visoko značajnim, umerenim koeficijentom korelacije ( $r=0.578$ ) povezana sa pT statusom, dok je indeks mikrovaskularne gustine sa pT statusom kolorektalnog karcinoma povezan nižim (0.328), ali značajnim koeficijentom korelacije. Rezultati Gao i sar. 2016., su takođe pokazali zavisnost ekspresije VEGF od pT statusa tumora, ali Li i sar. 2015. i Bandardaf i sar. 2017. (212,409) nisu identifikovali vezu ekspresije VEGF sa pT statusom kolorektalnog karcinoma. Za razliku od nas, od strane drugih autora nije potvrđena veza indeksa mikrovaskularne gustine sa pT statusom kolorektalnog karcinoma (396).

Obzirom na heterogenu metodologiju za analizu tumorske angiogeneze teško je uskladiti naše rezultate sa analizama drugih autora. Možda je na našu analizu vaskularne površine uticala veća prosečna analizirana površina preparata tumorskog tkiva ili možda drugačija raspodela visoko rizičnih ispitanika?

#### **6.3.4. Ekspresija korišćenih markera u odnosu na histološki gradus tumora**

Histološki gradus je od strane CAP svrstan u faktore rizika IIa kategorije, odnosno u faktore koji verovatno imaju prognostički značaj i bitno ih je uvrstiti u rutinski patohistološki izveštaj, bez obzira što je određivanje histološkog gradusa u velikoj meri subjektivna kategorija (246). Obzirom da je histološki gradus nezavistan od stadijuma tumora, AJCC (American Joint Committee on Cancer) je histološki gradus uvrstio u TNM klasifikaciju iz 2010. god. (245). Step en diferencijacije tumora se generalno smatra nezavisnim prognostičkim faktorom, što što ide u prilog činjenici da su niske stope preživljavanja povezane sa loše diferentovanim tumorima (120).

U našoj studiji su u najvećem broju slučajeva (87.5%) verifikovani srednje diferentovani (HG<sub>2</sub>) kolorektalni karcinomi, što je signifikantna učestalost koja je saglasna sa rezultatima Florescu-Țenea i sar. 2018. (120). Takođe smo zapazili da histološki gradus tumora u našoj studiji ne zavisi ni od jednog ispitivanog kliničko-patološkog parametra.

Iako se gradiranje tumora bazira na stepenu sličnosti tkiva tumora sa normalnim matičnim tkivom i na broju mitoza u tumorskom tkivu, ipak su rezultati studija o povezanosti proliferativnog indeksa odnosno ekspresije Ki67 sa histološkim gradusom kolorektalnog karcinoma kontradiktorni. Tako, dok jedna grupa autora (391) ističe da ne postoji veza ekspresije Ki67 i histološkog gradusa, Tong i sar. 2020. ukazuju na značajnu povezanost indeksa proliferacije sa histološkim gradusom u

kolorektalnom karcinomu (403). U našoj studiji nije zapažena značajna veza između histološkog gradusa i indeksa proliferacije, ali je visok proIDX zapažen u 49.2% srednje diferentovanih i u 80% loše diferentovanih kolorektalnih karcinoma bez signifikantne značajnosti. Poput nas, Melling i sar. 2016., takođe nisu identifikovali povezanost ekspresije Ki67 sa histološkim gradusom u ovom tumoru (391)

Pored proliferativnog indeksa, u našoj studiji nije uočena povezanost nijednog od ispitivanih markera (Ki67, Stathmin1, E-cadherin, VEGF i Cd105) sa histološkim gradusom kolorektalnog karcinoma. Osustvo statističke značajnosti između grupa najverovatnije proizilazi iz činjenice da je većina ispitivanih kolorektalnih karcinoma bila u grupi srednje diferentovanih (HG<sub>2</sub>), dok je u grupi loše diferentovanih (HG<sub>3</sub>) bilo svega 5 i u grupi dobro diferentovanih (HG<sub>1</sub>) samo 4 slučaja. Nakon raspodele na odsustvo, nizak i visok indeks ekspresije markera teško je dokazati da je 3 ili 4 slučaja značajno više od 1 ili dva slučaja.

U opsežnoj meta analizi koja je obuhvatila 1599 dobro- i srednje diverenovana i 775 loše diferentovanih solidnih tumora sa različitim lokacija (uključujući i kolorektalni karcinom), zapaženo je da postoji signifikantna povezanost ekspresije Stathmin1 sa loše diferentovanim karcinomima (328).

Izveštaji Palaghia i sar. 2016. i Christou. i sar. 2017. ukazuju na signifikantnu vezu između redukovane ekspresije E-cadherina i visokog histološkog gradusa kolorektalnog karcinoma (349, 392). U vezi sa ovim postoji zanimljivo zapažanje Dass i sar. 2015., o značajno smanjenoj ekspresiji E-cadherina na invazivnom frontu kolorektalnog karcinoma u poređenju sa ekspresijom ovog markera u tumorskom centru. Zbog toga se očekuje da bi tumorske ćelije na invazivnom frontu trebalo da poseduju one osobine koje propagiraju infiltraciju, odnosno gubitak athezije između ćelija i povećanje epitelno-netenhimne tranzicije, što olakšava invaziju (410).

U literaturi postoje brojni izveštaji u kojima je pokazano da ekspresija VEGF i indeks mikrovaskularne gustine ne zavise od histološkog gradusa kolorektalnog karcinoma (212,396,405), ali sporadično postoje i izveštaji o zavisnosti ekspresije VEGF od histološkog gradusa tumora (406).

### **6.3.5. Ekspresija korišćenih markera u odnosu na limfovaskularnu invaziju (LVI)**

Najvažnija faza u procesu metastaziranja tumora je limfovaskularna invazija, koja predstavlja ulazak tumorskih ćelija u limfne i/ili krvne sudove. O značaju limfovaskularne invazije za prognozu kolorektalnog karcinoma govori i činjenica da je CAP ovaj parametar uvrstio u I kategoriju prognostičkih faktora (246).

Zbog činjenice da invazija limfatika tumorskim ćelijama rezultuje metastazama u limfnim čvorovima, a invazija vena metastazama u visceralnim organima, postoji preporuka da se u patohistološkom izveštaju napravi razlika između invazije limfnih i invazije krvnih sudova (265,287). U našoj studiji je potvrđeno da je invazija limfnih sudova visoko signifikantnim koeficijentima korelacije povezana sa metastazama u limfnim čvorovima ( $r=0.698$ ) i sa Astler-Coller stadijumom ( $r=0.756$ ).

Umereni, ali značajni koeficijenti korelacije povezuju invaziju limfnih sudova sa pT statusom tumora ( $r=0.429$ ), invazijom krvnih sudova ( $r=0.391$ ), perineuralnom invazijom ( $r=0.359$ ), i sa udaljenim metastazama ( $r=0.325$ ). Za razliku od invazije limfatika, invazija krvnih sudova je u jačoj vezi sa udaljenim metastazama ( $r=0.710$ ) i sa perineuralnom invazijom ( $r=0.403$ ), ali je u slabijoj vezi sa Astler-Coller stadijumom ( $r=0.468$ ).

U našoj ispitivanoj grupi invazija limfatika je identifikovana u 54.2 % slučajeva, što se značajno ne razlikuje od broja slučajeva bez invazije (45.8%), dok je invazija krvnih sudova identifikovana u 15.3% što se razlikuje od značajnih 84.7% slučajeva bez invazije krvnih sudova. Izveštaji o zastupljenosti limfovaskularne invazije u kolorektalnom karcinomu su heterogeni, ali su Betge i sar. 2012., sumiranjem različitih izveštaja, saopštili da incidenca limfovaskularne invazije u kolorektalnom karcinomu iznosi između 10% i 89.5% (267).

Visoka ekspresija svih ispitivanih markera (Ki67, Stathmin1, VEGF i CD105) i odsustvo ekspresije E-cadherina su u statistički značajnoj vezi sa invazijom kako limfnih tako i krvnih sudova. Sve ove veze su definisane značajnim i visoko značajnim umerenim do visokim koeficijentima korelacije.

Nedavno su Jiang i sar. 2019., istakli da je limfovaskularna invazija nezavistan faktor rizika za preživljavanje ispitanika sa kolorektalnim karcinomom, i saopštili da je nepovoljan prognostički značaj limfovaskularne invazije podržan i u drugim studijama o različitim vrstama raka, kao što su rak dojke, rak želuca i rak prostate (411).

U literaturi postoji uverenje da ekstramuralna invazija vena, koja podrazumeva invaziju vena izvan *muscularis propriae*, predstavlja faktor rizika za pojavu metastaza (246). Zapaženo je da je limfovaskularna invazija češća kod tumora sa visokim histološkim gradusom i sa metastazama u limfnim čvorovima i u jetri (266). U našoj studiji nije identifikovana povezanost vaskularne invazije sa histološkim gradusom tumora, ali je identifikovana značajna povezanost vaskularne invazije sa udaljenim metastazama.

### **6.3.6. Ekspresija korišćenih markera u odnosu na perineuralnu invaziju (PNI)**

Perineuralna invazija predstavlja prisustvo tumorskih ćelija oko nervnih struktura ili unutar nervnih omotača. Shodno očekivanju izveštaji o incidence perineuralne invazije u kolorektalnom karcinomu su heterogeni, ali su Knijn i sar. 2016., konsolidacijom rezultata iz 25 studija sa 8483 ispitanika sa kolorektalnim karcinomom izvestili da je uleštalost perineuralne invazije bila 18,2% u ukupnoj kohorti, 20,6% u karcinomu rektuma i 14,1% u karcinomu kolona. Takođe su istakli da je učestalost PNI bila zavisna od stadijuma tumora, sa vrlo niskom učestalošću u stadijumu I (0,2 %, slučajeva). Tumori bez metastaza u limfnim čvorovima (I i II stadijum zajedno) pokazali su PNI u 9,5% slučajeva, tumori u III stadijumu (ukupno 1840 slučajeva) u 26,3 % i tumori sa udaljenim metastazama u 36,6 % (412). Hu i sar. 2020. su u grupi od 1412 ispitanika PNI našli u 21% slučajeva i zapazili da je PNI povezana sa nižim histološkim gradusom, vaskularnom invazijom, pT statusom

i višim stadijumima tumora (285), dok smo mi u našoj grupi ispitanika našli perineuralnu invaziju u 18.1% kolorektalnih karcinoma, pri čemu smo zapazili visoku signifikantnu povezanost PNI sa udaljenim metastazama ( $r=0.638$ ) i sa Astler-Coller stadijumom ( $r=0.437$ ). Nešto slabija, ali značajna povezanost postoji između PNI sa invazijom krvnih sudova ( $r=0.403$ ), invazijom limfnih sudova ( $r=0.359$ ) i sa metastazama u limfnim čvorovima ( $r=0.255$ ). Za razliku od Hu i sar. 2020. (285) mi nismo identifikovali vezu PNI sa histološkim gradusom tumora.

Dalje smo konstatovali da su visok proliferativni indeks (proIDX), visok nivo ekspresije Stathmin1, visok nivo ekspresije VEGF, visok indeks mikrovaskularne gustine (mviIDX) i odsustvo ekspresije E-cadherina signifikanto povezani sa perineuralnom invazijom značajnim i dobrim koeficijentima korelacije, pri čemu najjača veza postoji između perineuralne invazije i visokog proliferativnog indeksa.

Bez obzira što je u ovoj studiji u visoko značajnih 92.3% slučajeva registrovana povezanost indeksa proliferacije/Ki67 sa perineuralnom invazijom i ta veza definisana značajnim, dobrim koeficijentom korelacije ( $r=0.397$ ), od strane drugih autora ova veza nije identifikovana (413).

Rezultati Zhou i sar. 2015. ukazuju da status PNI značajno utiče na preživljavanje pacijenata u II i III stadijumu po TNM klasifikaciji (414). U skladu sa ovim, drugi autori su potvrdili da PNI ima snažan uticaj na preživljavanje i pojavu recidiva u pacijenata sa kolorektalnim karcinomom. Takođe se smatra da je prognostička vrednost PNI dobro potkrepljena poput dubine invazije, histološkog gradusa, metastaza u limfnim čvorovima, limfne i ekstramuralne vaskularne invazije (412). Međutim perineuralna invazija je od strane CAP, čini se nepravedno, svrstana u IIb kategoriju prognostičkih parametara, odnosno u kategoriju dobro proučenih, ali nedovoljno značajnih faktora (246).

### **6.3.7. Ekspresija korišćenih markera u odnosu na metastaze u limfnim čvorovima i udaljene metastaze**

Metastaze u limfnim čvorovima su zbog velikog prognostičkog značaja klasifikovane u I kategoriju prognostičkih parametara i sastavni su deo patohistološkog izveštaja (246). Postojeće smernice preporučuju identifikaciju najmanje 12 ili više limfnih čvorova u resekovanom kolonu (245).

U našoj ispitivanoj grupi najveći broj pacijenata nije imao metastaze u limfnim čvorovima. Limfonodalne metastaze su nađene u 18.1% slučajeva, pri tome su metastaza u 1- 3 limfna čvora signifikantno učestalije u odnosu na broj slučajeva sa depozitima u 4-6 ili 7 limfnih čvorova. Yim i sar. 2017. su limfonodalne metastaze identifikovali u 12.3% kolorektalnih karcinoma. U njihovoj studiji su dubina i širina submukozne invazije, limfna invazija, tumorsko pupljenje i prisustvo slabo diferenciranih klastera bili značajno povezani sa učestalošću limfonodalnih metastaza (415). U našoj studiji su metastaze u limfnim čvorovima visokim koeficijentima korelacije značajno povezane sa Astler-Coller stadijumom ( $r=0.726$ ), sa invazijom limfnih sudova ( $r=0.698$ ) i slabijim koeficijentima korelacije su takođe značajno povezane sa pT statusom tumora ( $r=0.372$ ), sa perineuralnom invazijom

( $r=0.279$ ), i invazijom krvnih sudova ( $r=0.255$ ).

Analizom ekspresije markera korišćenih u ovoj studiji smo zapazili da je visok proliferativni indeks značajno povezan sa metastazama u limfnim čvorovima visoko značajnim i visokim korelacionim koeficijentom ( $r=0.766$ ). Visoki nivoi ekspresije Stathmin1 su takođe visoko značajnim i visokim koeficijentom korelacije povezani sa depozitima u limfnim čvorovima ( $r=0.725$ ).

Visoko značajna veza definisana visokim koeficijentom korelacije ( $r=-0.729$ ) postoji i između odsustva ekspresije E-cadherina i metastaza u limfnim žlezdama. Visoka ekspresija VEGF i visok indeks mikrovaskularne gustine (mvdIDX) su visoko značajnim i dobrim koeficijentima korelacije povezani sa limfonodalnim metastazama ( $r=0.612$  i  $r=0.553$ ). Brojne od ovih veza su potvrđene i od strane drugih autora. Tako su Melling i sar. 2016. i još pre njih Lin i sar. 2008. uočili značajnu povezanost indeksa proliferacije sa depozitima u limfnim čvorovima (391,400). Zhang i sar. 2016. izvestili su o povezanosti Stathmin1 sa depozitima u limfnim čvorovima (5) i time izneli potpuno suprotan stav od Ogina i sar. 2009. koji su nekoliko godina pre saopštili da je ekspresija Stathmin1 nezavisna od limfonodalnih depozita i da kolorektalni karcinomi sa visokom ekspresijom Stathmin1 imaju dobru prognozu (7). Jaka korelativna veza ekspresije Stathmin1 sa depozitima u limfnim čvorovima je potvrđena i u difuznom karcinomu želuca (324).

Mi smo zapazili da se ekspresija E-cadherina u odnosu na pN kategoriju smanjuje sa povećanjem metastaza u regionalnim limfnim čvorovima tako da je umerena ekspresija E-cadherina u pN0 nađena u 85.7%, a izražena u 8.6% slučajeva. Sa povećanjem metastaza u broju regionalnih limfnih čvorova ekspresija E-cadherina se smanjuje. Kod prisutnih metastaza u 1-3 limfna čvora odsustvo ekspresije E-cadherina nađeno je u 94.7% slučajeva, kod prisutnih metastaza u 4-6 i 7 i više limfnih čvorova odsustvo ekspresije ovog markera konstatovano je u 100% slučajeva.

Najvažniji koraci u metastaziranju tumorskih ćelija su uništavanje ćelijsko-ćelijskih spojeva, degradiranje ćelijskog matriksa i aktiviranje puteva koji kontrolišu citoskeletnu dinamiku ćelija raka. E-cadherin je važan glikoprotein ekstracelularnog matriksa (ECM) koji igra ključnu ulogu u adheziji ćelija, migraciji, rastu i razvoju raka (210). U ovoj studiji je otkriveno da se E-cadherin smanjivao sa rastom broja metastatski zahvaćenih regionalnih limfnih čvorova (kategorija pN) u tkivima raka. Signifikantna povezanost redukovane i/ili odsutne ekspresije E-cadherina sa metastazama u regionalnim limfnim čvorovima je potvrđena od strane mnogih autora. (349,352,392,405)

U skladu sa našim rezultatima Saad i sar. 2014. i Gao i sar. 2016. su saopštili značajnu povezanost indeksa mikrovaskularne gustine i ekspresije VEGF sa depozitima u limfnim čvorovima (396, 405), ali Li i sar. 2015., u svojoj korelacionoj studiji sa nekoliko markera nisu verifikovali vezu između ekspresije VEGF i limfonodalnih depozita. (406)

U gastrointestinalnom traktu postoje brojni faktori rasta koji regulišu angiogenezu, uključujući proangiogene faktore kao što je VEGF i antiangiogene faktore kao što je thrombosponcin. Sumirani rezultati prekliničkih i kliničkih studija sugerišu da je VEGF predominantni angiogeni faktor u kolorektalnom karcinomu. U procesu tumorske invazije i metastaziranja ključni događaj je

neoangiogeneza, a dobro je utvrđeno da je VEGF jedan od najvažnijih molekula koji promovira migraciju, proliferaciju i diferencijaciju endotelnih ćelija. VEGF utiče na progresiju kolorektalnog karcinoma i stimuliše rast metastaza (212,362). U prilog ovoga govore i naši rezultati u kojima je visoka ekspresija VEGF nađena u 84.2% slučajeva ukoliko postoje depoziti u 1-3 limfna čvora. Međutim sa progresijom kolorektalnog karcinoma i ukoliko je metastazama zahvaćeno 4-6 i više od 7 limfnih čvorova izražena ekspresija VEGF se povećala na 100% slučajeva.

Unutarćelijska uloga VEGF kao faktora preživljavanja ćelija je pokazana u eksperimentu u ćelijskim linijama kolorektalnog karcinoma kod kojih je gen VEGF izbrisan. Takođe u ćelijama raka debelog creva kod ljudi, iscrpljivanje VEGF posredovano RNA smanjilo je preživljavanje ćelija i povećalo osetljivost na hemoterapiju. Naknadni eksperimenti validacije pokazali su da je oslabljeno preživljavanje ćelija posledica poremećene signalizacije AKT i ERK1/2 (MAPK3/1) signalnog puta. (416)

Pod udaljenim metastazama podrazumeva se širenje tumora izvan debelog creva i regionalnih limfnih čvorova, odnosno podrazumevaju se tumorski depoziti u bilo koji neregionalni limfni čvor ili bilo koji organ, zatim širenje tumora u peritoneum i pozitivan citološki nalaz u peritonealnoj tečnosti (32,247). Procenjeno je da oko 20% pacijenata sa karcinomom kolona ima prisutne metastaze u vreme dijagnoze (247). U našoj ispitivanoj seriji smo udaljene metastaze identifikovali u 11.1% ispitanika.

Korelativna analiza, u našoj studiji, je pokazala da su udaljene metastaze visoko signifikantno, sa visokim i dobrim koeficijentima korelacije povezane sa invazijom krvnih sudova, perineuralnom invazijom i Astler-Coller stadijumom tumora ( $r=0.710; 0.638$  i  $0.503$ ), a zatim sledi nešto slabija ali značajna povezanost udaljenih metastaza sa invazijom limfnih sudova ( $r=0.325$ ).

U našoj studiji su visok proliferativni indeks/Ki67, visok nivo ekspresije Stathmin1, visok nivo ekspresije VEGF, visok indeks mikrovaskularne gustine i odsustvo ekspresije E-cadherina povezani u po 100% slučajeva sa udaljenim metastazama. Ove veze su definisane značajnim relativno dobrim koeficijentima korelacije ( $r=0.354, 0.310, 0.282; 0.384$  i  $-0.315$ ).

Povezanost indeksa proliferacije sa udaljenim metastazama je saopštena i od strane drugih autora (400). O vezi između ekspresije Stathmin1 sa udaljenim metastazama u kolorektalnom karcinomu gotovo da nema podataka u literaturi, ali je u sporadičnoj studiji Zhang i sar. 2016. identifikovana značajna povezanost Stathmin1 sa udaljenim metastazama (5).

Za razliku od naših rezultata i rezultata Dass i sar. 2015. o povezanosti aberantne ekspresije E-cadherina sa udaljenim metastazama (408), Kim i sar. 2016. u svojoj studiji nisu identifikovali vezu između ova dva parametra (352).

Naši rezultati koji se tiču povezanosti ekspresije VEGF i indeksa mikrovaskularne gustine sa udaljenim metastazama u saglasnosti su sa drugim autorima (212,406,417-418). Mi smo značajno visoku ekspresiju VEGF identifikovali u 100% slučajeva metastatskih kolorektalnih karcinoma, što ide u prilog shvatanja da se udeo ekspresije VEGF povećava sa progresijom kolorektalne karcinogeneze u zavisnosti od dubine invazije, prisustva metastaza u limfnim čvorovima i udaljenih metastaza (418).

### 6.3.6. Ekspresija ispitivanih markera u odnosu na Astler-Coller stadijum tumora

Određivanje stadijuma bolesti predstavlja kombinaciju dva ili više faktora, pre svega dubinu infiltracije tumora (pTstatus) i broj zahvaćenih limfnih čvorova (pN status), a zatim određivanje udaljenih metastaza (pMstatus) (280). Novije TNM klasifikacije određuju i limfovaskularnu invaziju a u najnovijem 8. izdanju TNM klasifikacije se uključuju biološki i molekularni markeri, pri čemu je istaknut značaj prognostičkih informacija i personalizovan pristup koji omogućuje određivanje terapije na individualnom nivou. (214,247,280)

Po Astler-Coller sistemu klasifikacije (250), koji se rutinski koristi u KCCG, u našoj ispitivanoj grupi kolorektalni karcinom se najčešće dijagnostikuje u C<sub>2</sub> stadijumu bolesti (40.7% slučajeva) u kome su klasifikovani slučajevi kod kojih je primarni tumor probio mišićni sloj zida creva i postoje metastatski depoziti u više od 4 limfna čvora. Zatim po učestalosti slede slučajevi u B<sub>2</sub> stadijumu (29.2%). Za razliku od nas, u studiji Sulzyc-Bielicka i sar. 2018., kolorektalni karcinom se najčešće dijagnostikuje u B<sub>2</sub> stadijumu (419). Astler Coller stadijum bolesti je visoko značajnim koeficijentima korelacije povezan sa invazijom limfnih sudova ( $r=0.756$ ), metastazama u limfnim čvorovima ( $r=0.726$ ), pT statusom ( $r=0.638$ ), udaljenim metastazama ( $r=0.503$ ), invazijom krvnih sudova ( $r=0.468$ ) i perineuralnom invazijom ( $r=0.437$ ).

Naši rezultati ukazuju da ekspresija svih ispitivanih markera (proIDX/Ki67, Stathmin1, E-cadherin, VEGF i mvdIDX/CD105) značajno zavise od Astler-Coller stadijuma tumora.

Zapazili smo da je nizak proliferativni indeks/Ki67 u značajno visokom broju slučajeva (90.9% i 100%) prisutan u kolorektalnih karcinoma u B<sub>1</sub> i u B<sub>2</sub> stadijumu, dok je visok proIDX/Ki67 u značajno visokom broju slučajeva (90.0% i 100%) zabeležen kod tumora u C<sub>2</sub> i D stadijumu. Korelaciona analiza je pokazala da su proIDX/Ki67 ekspresija i Astler-Coller stadijum kolorektalnog karcinoma povezani visoko značajnim i visokim pozitivnim koeficijentom korelacije ( $r=0.818$ ).

U saglasnosti sa našim rezultatima Lou i sar. 2019. su u opsežnoj meta analizi takođe zapazili značajnu povezanost ekspresije Ki67/proIDX sa stadijumom tumora i istakli da visoka ekspresija Ki67 značajno predviđa loše opšte preživljavanje i preživljavanje bez bolesti, uz sugestiju da visoka ekspresija Ki-67 može poslužiti kao vredan prediktivni biomarker za lošu prognozu kod pacijenata sa kolorektalnim karcinomom (347). Lin i sar. 2008. i Bădulescu i sar. 2016. su takođe pokazali značajnu povezanost ekspresije Ki67 sa stopom preživljavanja pacijenata sa kolorektalnim karcinomom. (400,407) Potpuno suprotna zapažanja nalazimo u studiji Melling i sar. 2016. koji su saopštili povezanost visoke ekspresije Ki67 sa niskim stadijumima kolorektalnog carcinoma (391).

Obzirom da je, osim u kolorektalnom karcinomu, povezanost visoke ekspresije Ki67 sa lošim ishodom bolesti pokazana i u karcinomu endometrijuma, dojke, želuca i u drugim karcinomima (32,346,402), postoji mišljenje da gen koji kodira protein Ki67 ima sličnu funkciju u svim tumorima (403)

U našoj studiji visoka ekspresija Stathmin1 je u značajno visokom broju slučajeva (90.0%



i 100%) povezana sa C<sub>2</sub> i D stadijumom kolorektalnog karcinoma. Ova veza je definisana visoko značajnim pozitivnim i jednim od najviših koeficijenata korelacije u ovoj studiji (r=0.865), što govori u prilog jačine ove veze. U skladu sa našim rezultatima Zhang i sar. 2016. su takođe verifikovali povezanost ekspresije Stathmin1 sa stadijumom tumorske bolesti. Pored toga isti autori su ispitujući petogodišnje preživljavanje pacijenata sa karcinomom kolona zapazili da srednje vreme preživljavanja kod Stathmin1 pozitivnih pacijenata iznosi 37.5 meseci, dok je srednje vreme preživljavanja Stathmin1 negativnih pacijenata signifikantno duže i iznosi 57.1 mesec. Autori su univarijantnom analizom pokazali da je Stathmin1 nezavistan prediktor preživljavanja za karcinom kolona (5).

Poređenje ekspresije Stathmin1 između rane i napredne faze solidnih karcinoma, u jednoj meta analizi koja je obuhvatila 18 studija, je pokazalo da je ekspresija Stathmin1 bila značajno veća u pacijenata sa uznapredovanim stadijumom (III i IV, po TMN klasifikaciji) nego u pacijena sa ranim stadijumima (I i II stadijum) (328)

Značajna povezanost ekspresije Stathmin1 sa stadijumom tumora je pokazana i u difuznom karcinomu želuca (338). Pokazano je da ekspresija Stathmin1 korelira sa lošom prognozom i kraćim preživljavanjem u mnogim tumorima poput difuznog karcinoma želuca, dojke, urotela, jajnika, grlića materice, melanoma I dr (6,324).

Mi smo takođe konstatovali i značajnu povezanost ekspresije E-cadherina sa Astler-Coller stadijumom tumora i to tako da je odsustvo ekspresije E-cadherina zabeleženo u po 100% slučajeva u C<sub>2</sub> i D stadijumu, dok je pri nižim stadijumima (B<sub>1</sub> i B<sub>2</sub>) u visokom broju slučajeva (81.8% i 90.5%) prisutna umerena ekspresije ovog markera. Korelativnom analizom smo pokazali da između ekspresije E-cadherina i Astler-Coller stadijuma postoji odlična povezanost definisana visoko značajnim i najvišim, u ovoj studiji, ali inverznim koeficijentom korelacije (r=-0.875). Nikami i sar. 2020. su takođe, u skladu sa našim rezultatima, saopštili inverznu povezanost ekspresije E-cadherina sa stadijumom kolorektalnog karcinoma (210). Dobro je poznato da je bitan moment koji predhodi nastanku metastatskog fenotipa smanjenje adhezivnosti između malignih ćelija čime je omogućeno njihovo odvajanje od malignih tumora (3,11,352,357).

Christou i sar. 2017., su zapazili da je ekspresija E-cadherina u korelaciji sa ukupnim vremenom preživljavanja pacijenata sa kolorektalnim karcinomom. Interesantno je i njihovo zapažanje da je ekspresija E-cadherina povećana kod pacijenata koji dobijaju kalcijum i vitamin D, pa sugerišu mogućnost korišćenja kalcijuma i vitamina D kao hemopreventivnih agenasa protiv kolorektalnog karcinoma (349).

U našoj ispitivanoj grupi su umerena ekspresija VEGF u B<sub>2</sub> i visok nivo ekspresije u C<sub>2</sub> i D stadijumu signifikantno povezani sa Astler-Coller stadijumom tumora. Koeficijent korelacije koji povezuje ekspresiju VEGF sa navedenim stadijumima je visoko značajan i visok (r=0.782). Poput nas i Gao i sar. 2016. su uočili povezanost ekspresije VEGF sa stadijumom tumorske bolesti (408). Međutim od strane drugih autora nije identifikovana veza ekspresije VEGF sa UICC TNM stadijumom kolorektalnog carcinoma (420). Zanimljivo da Bendardraf i sar. u studiji iz 2017 god. nisu evidentirali povezanost ekspresije VEGF ni sa TNM statusom ni sa stadijumom tumorske bolesti

po Dukes klasifikaciji (212). Međutim isti autori su u svojoj predhodnoj studiji iz 2008. god. izvestili o povezanosti ekspresije ovog markera sa uznapredovanim stadijumom kolorektalnog karcinoma i o signifikantno inverznoj korelaciji između VEGF ekspresije i desetogodišnjeg preživljavanja pacijenata sa ovim tumorom (362).

Indeks mikrovaskularne gustine (mvdIDX/CD105), u našoj studiji, takođe je u značajnoj vezi sa stadijumom tumora po Astler-Coller klasifikaciji. U signifikantno visokom broju slučajeva registrovan je nizak mvdIDX/CD105 ekspresija u stadijumima B<sub>1</sub> i B<sub>2</sub>, dok je visok mvdIDX/CD105 u značajno visokom broju slučajeva registrovan u stadijumima C<sub>2</sub> i D (70% i 100%). Ova veza je visoko značajna (p=0.000) i definisana pozitivnim, dobrim koeficijentom korelacije (r=0.630). Mikrovaskularna gustina je takođe povezana i sa ekspresijom VEGF visoko značajnim pozitivnim koeficijentom korelacije (r=0.646). Saad i sar. su multivarijantnom analizom pokazali da mikrovaskularna gustina, ali ne i VEGF ekspresija, ima prognostičku vrednost kod kolorektalnog karcinoma. Takođe su pokazali da VEGF ekspresija nije bila nezavisni prognostički faktor (396).

Naši rezultati idu u prilog shvatanju da normalne ćelije koje su transformisane u neoplastične obično nisu angiogene na početku karcinogeneze. Eksperimentalne studije su pokazale da je angiogeni prekidač diskretan događaj koji nastaje tokom progresivnih faza karcinogeneze kod miševa. Tumori kod ljudi se pojavljuju bez angiogene aktivnosti, dugo opstaju u "in situ" fazi (meseima i/ili godinama) pa se prebacuju na angogeni fenotip i zato se angiogeni fenotip kod mnogih tumora javlja tek posle malignog fenotipa. Ovaj angiogeni prekidač zavisi od ravnoteže između pozitivnih i negativnih angiogenih faktora u tumoru. Pozitivni regulatori angiogeneze su VEGF, FGF, angiotenzin1, interleukin 8 i dr. Najpoznatiji negativni regulatori angiogeneze su angiostatin, endostatin, interferon alfa, genistein idr. VEGF sekretuje veliki broj ćelija uključujući i tumorske ćelije. Osim što je mitogen za endotelne ćelije on indukuje i fenestraciju krvnih sudova i time povećava njihovu permeabilnost (421).

Kod nekih agresivnih tumora tumorske ćelije formiraju mikrocirkulatorne kanale, koji su izgrađeni od ekstracelularnog matriksa i samih tumorskih ćelija. Ovo formiranje kanala nije vaskularni događaj i nosi naziv "vaskularna mimikrija". Vaskularna mimikrija takođe može odigrati ključnu ulogu kao alternativni put za snabdevanje krvlju kada je angiogeneza inhibirana. Fenomen vaskularne mimikrije se javlja u brojnim vrstama agresivnih tumora (melanoma, karcinoma dojke, jajnika i dr.), uključujući i kolorektalni karcinom, a takođe je uključen u i u sticanje svojstava CSC (*cancer stem cells*) indukovanjem epitelne u mezenhimalnu tranziciju (EMT) (422).

Ispitivanja vaskularne mimikrije u ćelijskim linijama (SW480) humanog karcinoma kolona ukazuju da su hipoksija, VEGF, matriks metaloproteinaza (MMP), CSC (*cancer stem cells*) i epitelno-mezenhimna tranzicija (EMT) važni medijatori koji regulišu formiranje vaskularne mimikrije u kolorektalnom karcinomu (423,424).

U kontekstu ciljane terapije tumora neophodno je imati na umu da u tumorskom tkivu krvni sudovi postoje u dva oblika: jedan je vaskularna struktura okružena endotelnim ćelijama, a drugi je struktura lumena okružena tumorskim ćelijama (vaskularna mimikrija). Prijavljeno je da anti-

angiogeni lek Bevacizumab nema inhibitorni efekat na vaskularnu mimikriju, što dovodi do promocije tumorskih metastaza (424).

#### **6.4. Uzajamni odnosi ispitivanih varijabli**

Analizom ekspresije biomarkera Ki67, Stathmin1, E-cadherin, VEGF, CD105, kliničkih i patoloških parametara u kolorektalnom karcinomu zapazili smo značajne međusobne veze u pojedinim uzajamnim odnosima. Da bi odredili meru njihove povezanosti uradili smo korelacionu analizu u kojoj se značajnost veze utvrđuje značajnošću koeficijenta korelacije, a jačina veze njegovom veličinom.

ROC (receiver operating characteristics) analiza je korišćena za upoređivanje sposobnosti različitih biomarkera da identifikuju rizik za progresiju kolorektalnog karcinoma, a višestrukom regresijom su identifikovani prediktori tranzicije kolorektalnog karcinoma iz nižih u više stadijume bolesti.

##### **6.4.1. Međusobna povezanost korišćenih biomarkera i kliničko-patoloških parametara**

Korelaciona analiza je pokazala da najjača korelativna veza u ovoj studiji postoji između ekspresije E-cadherina i Astler Coller stadijuma tumora. Ona je definisana visoko značajnim visokim i negativnim koeficijentom korelacije ( $r=-0.875$ ). Negativan predznak korelacije označava da višim Astler Coller stadijumima odgovaraju niže ekspresije E-cadherina. Značajna korelativna veza između niskog nivoa i/ili odsustva ekspresije E-cadherina sa uznapredovanim, višim stadijumima kolorektalnog karcinoma je zapažena i od strane drugih autora (210,405).

Po jačini zatim sledi povezanost ekspresije Stathmin1 sa Astler Coller stadijumom. I ova veza je definisana visoko značajnim, nešto nižim, ali pozitivnim koeficijentom korelacije ( $r=0.865$ ). Značajna korelativna veza Stathmin1 sa uznapredovanim stadijumima tumora je osim u kolorektalnom karcinomu (5), saopštena i u difuznom karcinomu želuca (338), u duktalnom karcinomu pankreasa, u ezofagealnom karcinomu (328) i u karcinomu mokraćne bešike (340).

Odlična korelativna, visoko značajna pozitivna veza postoji i između proliferativnog indeksa/Ki67ekspresije i Astler Coller stadijuma ( $r=0.818$ ) i nešto slabija ali visoko značajna povezanost je zapažena i između ekspresije VEGF i Astler Coller stadijuma ( $r=0.782$ ). Ove korelativne veze ukazuju da višim Astler Coler stadijumima odgovaraju visoki nivoi proIDX/Ki67-ekspresije, ekspresije Stathmin1 i VEGF. Korelativna veza proliferativnog indeksa/Ki67ekspresije i VEGF ekspresije sa stadijumom tumorske bolesti su zapažene i u drugim tumorima poput karcinoma dojke, želuca, endometrijuma i dr. (13,14,32,346,402).

Visoko značajna veza sa dobrim pozitivnim koeficijentom korelacije postoji između proliferativnog indeksa/Ki67-ekspresije i metastaza u limfnim čvorovima ( $r=0.766$ ), zatim između

ekspresije Stathmin1 i metastaza u limfnim čvorovima ( $r=0.725$ ) Visoko značajna, ali slabija po jačini je veza između ekspresije VEGF i limfonodalnih metastaza ( $r=0.612$ ). Odlična i takođe visoko značajna povezanost, definisana dobrim ali negativnim koeficijentom korelacije postoji između ekspresije E-cadherina i metastaza u limfnim čvorovima ( $r=-0.729$ ). Ekspresija E-cadherina i Stathmin1 su takođe u vezi i sa invazijom limfnih sudova. Ove veze su definisane visoko značajnim i dobrim koeficijentima korelacije ( $r= -0.726$  i  $r=0.713$ )

U literaturi postoji mnoštvo studija i meta-analiza u kojima je identifikovana veza između ekspresije Ki67, E-cadherina i VEGF sa kliničkim i patološkim parametrima progresije malignih tumora uključujući i kolorektalni karcinom (249,391,392,396,400,405), dok su studije koje se odnose na ekspresiju Stathmin1 i njegove veze sa parametrima progresije tumora vrlo oskudne, a uz to i kontradiktorne (5,338). Druge značajne veze ispitivanih biomarkera sa kliničko-partološkim karakteristikama kolorektalnog karcinoma su već razmatrane u prethodnom poglavlju.

U međusobnoj korelaciji biomarkera korišćenih u ovoj studiji dominira negativna, visoko signifikantna korelacija između E-cadherina i Stathmin1 ( $r=-0.829$ ). Po jačini povezanosti sledi visoko značajna korelacija između E-cadherina i proliferativnog indeksa/Ki67ekspresije ( $r= -0.794$ ) i povezanost E-cadherina sa VEGF ( $r= -0.768$ ). Umerena, ali značajna veza postoji između ekspresije E-caherina i mikrovaskularne gustine/ekspresije CD105 ( $r= -0.578$ ).

Tian i sar. 2015. su u žena tokom trudnoće, zapazili povezanost ekspresije Stathmin1 sa ekspresijom E-cadherina. Naime, Western blot analizom su pokazali da smanjeni nivoi Stathmin1 povećavaju ekspresiju E-cadherina u ćelijama trofoblasta, pa sugerišu da STMN1 reguliše migraciju i invaziju trofoblasta u endometrijum putem E-kadherin/ $\beta$ catenina (327). Ke i sar. 2019. su identifikovali negativnu korelaciju između Stathmin1 i E-cadherina, kroz EMT (epitelno-mezenhimnu tranziciju) u karcinomu želuca (7).

U studiji Hu i sar. 2017. je Spersmanovom korelacionom analizom utvrđena visoko značajna negativna korelacija ( $r= -0.741$ ) indeksa proliferacije i ekspresije E-cadherina u karcinomu želuca. U ovoj studiji je indeks proliferacije određen na osnovu ekspresije PCNA, a senzitivnost i specifičnost negativne ekspresije E-cadherina, u predviđanju trogodišnje stope preživljavanja su procenjeni sa 93.33% i 38.9% (354).

Gao i sar. 2016. su u metastatskom kolorektalnom karcinomu i u ćelijskim linijama karcinoma kolona konstatovali negativnu povezanost ekspresije VEGF sa ekspresijom E-cadherina (408). Negativna i značajna povezanost sa dobrim koeficijentom korelacije ( $r=-0.684$ ) između ekspresije E-cadherina i ekspresije VEGF je saopštena i u oralnom skvamocelularnom karcinomu. Autori su zaključili da E-cadherin i VEGF u kombinaciji mogu biti dobri prediktori rizika od maligne transformacije oralnih lezija (425).

Proliferativni indeks (proIDX/Ki67) je osim sa ekspresijom E-cadherina, visoko značajnim, dobrim i pozitivnim koeficijentima korelacije povezan sa ekspresijom Stathmin1( $r=0.794$ ) i sa ekspresijom VEGF ( $r=0.667$ ), dok je proIDX/Ki67 u umerenoj korelaciji sa mvdIDX/CD105 ( $r=0.585$ ).

Značajna povezanost proliferativnog indeksa sa Stathmin1 je zapažena, osim u kolorektalnom karcinomu, i u drugim solidnim karcinomima poput karcinoma mokraćne bežike, želuca, ezofagusa, pluća, prostate i dr. (324,338,340,426). U nedavno publikovanoj studiji Zhang i sar. 2021. su izvestili o signifikantnoj povezanosti indeksa proliferacije sa ekspresijom VEGF u rekurentnom hepatocelularnom karcinomu kod pacijenata koji su bili podvrgnuti ortotopijskoj transplantaciji jetre (OLT). Autori su istakli da je samo ekspresija VEGF nezavistan prediktor koji predviđa recidiv hepatocelularnog karcinoma nakon OLT (427).

Ekspresija Stathmin1 je povezana sa ekspresijom VEGF i ta veza je definisana visoko signifikantnim, dobrim koeficijentom korelacije ( $r=0.768$ ). Nižim, ali takođe značajnim koeficijentom korelacije ( $r=0.566$ ) je ekspresija Stathmin1 povezana sa mvdIDX/CD105-ekspresijom. Ekspresija VEGF je povezana sa mikrovaskularnom gustinom umerenim, ali visoko značajnim koeficijentom korelacije ( $r=0.646$ ).

U “basal-like” karcinomu dojke su Askeland i sar. 2020., identifikovali pozitivnu korelaciju ekspresije Statmin1 sa ekspresijom VEGF i mikrovaskularnom gustinom (MVD). Autori smatraju da bi Stathmin1 mogao biti uključen u regulaciju tumorske angiogeneze i to preko HIF-1 $\alpha$  i VEGF. Naime, utvrđeno je da prekomerna akumulacija Stathmin1 preko PI3K/Akt/mTOR signalnog puta povećava ekspresiju HIF-1 $\alpha$ , koji reguliše sekreciju VEGF (326).

#### **6.4.2. ROC analiza (dijagnostička validnost ekspresije Stathmin1, Ki67 i CD105)**

Sa značajnim porastom indeksa ekspresije Stathmin1, proliferativnog indeksa (proIDX/Ki67) i indeksa mikrovaskularne gustine (mvdIDX/CD105) tokom rasta, diferencijacije i progresije kolorektalnog karcinoma, stvoreni su uslovi za određivanje graničnih vrednosti Stathmin1, Ki67 i CD105 preko kojih se, sa visokom pouzdanošću može konstatovati da je određeni onkoprotein pouzdan marker progresije kolorektalnog karcinoma.

Dijagnostička validnost svakog od posmatranih markera određivana je pomoću ROC (receiver operating characteristics) analize. Granične, “cut off” vrednosti su dobijene analizom vrednosti ekspresije ovih proteina u tkivu kolorektalnog karcinoma i u susednom ne tumorskom tkivu. “Cut off” vrednost za Stathmin1 iznosi 1891.50, za proliferativni Ki67 antigen iznosi 2902.68, a za CD105 565.97.

Vrednost površine ispod ROC krive za Stathmin1 je bila 0,982 (0.951-1.013) sa visokom značajnošću ( $p<0.0001$ ), za proliferativni antigen Ki67 0,956 (0.951-1.011), takođe sa visokom značajnošću ( $p<0.0001$ ) i za CD105 iznosi 0.860 (0.775-0.944), isto sa visokom značajnošću ( $p<0.0001$ ). Senzitivnost za Stathmin1 i za proliferativni nuklearni antigen Ki67 je iznosila 97.4%, a specifičnost je takođe bila identična i za jedan i za drugi marker (91.4%). CD105 pokazuje nešto

slabiju senzitivnost (73.7%) i specifičnost (74.3%) u odnosu na prethodna dva markera.

Podaci o senzitivnosti i specifičnosti Stathmin1 u kolorektalnom karcinomu su veoma oskudni. U meta-analizi u kojoj je ispitivana senzitivnost i specifičnost Stathmin1 u solidnim tumorima dojke, pankreasa, pluća, želuca, urotela, uključujući i kolorektalni karcinom, Biaoux i sar. 2016. su, registrovali senzitivnost Stathmin1 za solidne tumore od 73% (70-76%), a specifičnost od 77% (73-81%) (328). Luo i sar. 2019. su u karcinomu jednjaka za Statmin1 zabeležili senzitivnost od 76.14% a specifičnost od 92% (426), dok je u leiomiosarkomu prijavljena senzitivnost za Stathmin1 100%, a specifičnost svega 55% (428)

Li i sar. 2016., su u kolorektalnom karcinomu, za proliferativni Ki67 antigen registrovali senzitivnost od 86.5%, i specifičnost od 82.9% (429). Analizirajući dijagnostičke performance različitih markera za otkrivanje CIN2+ lezije u grliću materice Onyango i sar. 2020., su u ogromnoj studiji preseka za Ki67 prijavili senzitivnost u rangu od 50-100%, a specifičnost u rangu od 39-90.4%. (430).

Primena ROC analize, u ovoj studiji, za određivanje graničnih vrednosti Stathmin1, Ki67 i CD105 je imala za cilj da odredimo standardni test čija bi tačnost bila prihvatljiva u proceni progresije kolorektalne karcinogeneze. Granična vrednost ("cut off") je vrednost testa-(upotreba markera) od kojih počinje otkriće pozitivnih slučajeva, odnosno u slučaju kolorektalnog karcinoma, od kojih bolest ulazi u uznapredovani stadijum praćen metastazama. Dijagnostičke karakteristike testa se ogledaju u sposobnosti testa da identifikuje bolesnike koji se stvarno nalaze u uznapredovanoj fazi bolesti (senzitivnost testa), kao i sposobnosti testa da isključi postojanje progresije karcinoma sa metastazama gde ih stvarno nema (specifičnost testa). U određivanju optimalne "cut off" vrednosti teži se ka tome da se smanji broj lažno pozitivnih i lažno negativnih rezultata (optimalna senzitivnost i specifičnost). Površina ispod ROC krive (AUC) može poslužiti kao sveukupna mera dijagnostičke tačnosti testa. Takođe veličina AUC može poslužiti za poređenje dva različita testa (markera) (431).

Visoko signifikantne vrednosti ispod AUC krive, u ovoj studiji, ukazuju da su dobijene "cut off" vrednosti, uz visoku senzitivnost i specifičnost pouzdani dijagnostički markeri progresije kolorektalnog karcinoma. Upoređenjem AUC za naše ispitivane markere može se zaključiti da Stathmin1 kao marker za identifikaciju progresije kolorektalnog karcinoma ima bolje performance (AUC=0.982 prema 0.956 i 0.869) od proliferativnog antigena Ki67 i od CD105, ali treba naglasiti da su sva tri indeksa kao markeri progresije bolesti visoko signifikantni i pouzdani uz visoku senzitivnost i specifičnost. Međutim po performansama najveći predikcioni potencijal u progresiji karcinogeneze kolorektalnog karcinoma ima Stathmin1, zatim proliferativni antigen Ki67 i na kraju CD105.

#### **6.4.3. Regresiona multivarijantna stepwise analiza**

Regresionu analizu smo u ovoj studiji, koristili sa ciljem da utvrdimo model koji će predstavljati vezu zavisne promenljive (Astler-Coller stadijum) i svih nezavisnih promenljivih varijabli, razmatranih u ovoj studiji. Da bismo prevazišli problem multikolinearnosti i nezavisne

varijable sa malim značajem, obzirom na veliki broj varijabli, koristili smo stepwise regresioni model koji je omogućio eliminaciju varijabli koje se preklapaju sa drugim i zbog toga malo ili uopšte ne doprinose tačnosti u predviđanju modela. Na taj način smo dobili model sa manjim brojem nezavisnih varijabli, ali koji je isto dobar koliko i model u kome se nalaze sve nezavisne varijable. (432)

U finalnom modelu (korak br. 5) su se kao varijable sa najvećim, udruženim uticajem na razvoj kolorektalnog karcinoma izdvojili: E-cadherin, Stathmin1, udaljene metastaze, pT status i Ki67proliferativni antigen.

Indeks determinacije pokazuje koliki je procenat varijabiliteta zavisne promenljive (Astler-Coller stadijum u našem slučaju) objašnjen varijabilitetom nezavisnih promenljivih, odnosno koliki je kvalitet regresije (poželjna je veličina 70% i više) (432). Visok R Square = 0.912, u našoj studiji, ukazuje da je koeficijent determinacije oko 91% varijabilitezan. To znači da se sa tačnošću od 91% može tvrditi da ovih pet varijabli imaju veći uticaj na razvoj bolesti od svih ostalih varijabli, pa zbog toga mogu biti podobne za predviđanje tranzicije bolesti iz nižeg u viši Astler-Coller stadijum.

U saglasnosti sa našim rezultatima, prediktivni značaj redukovane i/ili odsustva ekspresije E-cadherina u progresiji kolorektalnog karcinoma su nedavno ustanovili i Niknami i sar. 2020 god. (210). Ziaram i sar. 2020., su izvestili o prediktivnom značaju ekspresije E-cadherina i ekspresije Ki67 u pT<sub>a</sub> i pT<sub>1</sub> karcinomu mokraćne bešike (356). O prediktivnom značaju E-cadherina i proliferativnog indeksa/Ki67 ekspresije u progresiji tumora različite geneze i lokalizacije postoje brojna saopštenja u literaturi (346,347,361,389-391,400-403,405). Nasuprot ovome, prediktivni značaj Stathmin1 je nešto manje istraživano, ali je sporadično ipak identifikovan kao nezavistan prediktor preživljavanja pacijenata sa kolorektalnim karcinomom (5) i sa difuznim karcinomom želuca (338). Stathmin1 je identifikovan kao prediktor preživljavanja, nakon operacije i u skvamocelularnom karcinomu jednjaka (6), a Allem i sar. 2015. su pokazali prediktorni značaj Stathmin1 za dijagnozu leiomiosarkoma materice (428).

Za sada se još uvek, na molekularnom nivou, relativno malo zna o načinu na koji Stathmin1 reguliše proliferaciju, migraciju i pojavu metastaza, ali se smatra da je abnormalna ekspresija Stathmin1 pružila jasnu mogućnost za razvoj molekularne dijagnoze i ciljane terapije koja zavisi od Stathmin1 (338).

\*

\* \*

U vremenu kada je molekularna medicina imperativ za iznalaženje pouzdanih modela predviđanja, progresije i ishoda kolorektalnog karcinoma i kada je stvaranje modela zasnovanih na demografskim karakteristikama pacijenata, kliničkim uslovima, molekularnim karakteristikama tumora, specifičnosti i senzitivnosti biomarkera, ključno za prevenciju, ranu dijagnozu i ciljanu terapiju, mi smo, u skladu sa postavljenim ciljevima, u ovoj studiji, ispitivali značaj ekspresije Stathmin1, E-cadherina, Ki67, VEGF i CD105 u različitim stadijumima razvoja kolorektalnog adenokarcinoma.

Naši rezultati ukazuju da najbolje dijagnostičke performance ima Stathmin1 i da tri identifikovana biomarkera (E-cadherin, Stathmin1 i Ki67) u kombinaciji sa pT statusom tumora i udaljenim metastazama mogu biti praktični pokazatelji za predviđanje agresivnog kliničkog ponašanja kolorektalnog karcinoma.

Sagledavanje genetskih i proteinskih markera proliferacije, neovaskularizacije, atezije, oksidativnog stresa i apoptoze u resekovanom tumorskom tkivu doprinosi pronalaženju biomarkera koji bi omogućili bržu i lakšu procenu težine bolesti, a nedavni napredak u imunoterapiji tumora nameće potrebu za iznalaženjem biomarkera koji bi predvideli odgovor na imunološke kontrolne tačke i selektovali nove antigene za personalizovan pristup terapiji kolorektalnog karcinoma.

Obzirom da izveštaji o abnormalnoj akumulaciji različitih proteina u tumoru svakim danom postaju sve brojniji, to je identifikacija tumorskih markera prihvaćena kao korisna strategija koja će pomoći u boljem sagledavanju karcinogeneze.

Na kraju, prevashodni zadatak naše i drugih srodnih studija je bio da pomognu u identifikaciji pacijenta sa tumorima koji imaju potencijalno lošiju prognozu i da identifikuju kliničke modalitete u kojima ciljanu terapiju treba kombinovati sa tradicionalnim agensima, a sve sa ciljem izlječenja većeg broja pacijenata sa kolorektalnim karcinomom.



## 7. ZAKLJUČAK

Na osnovu dobijenih rezultata mogu se izvesti sledeći zaključci:

**1. a)** Kolorektalni karcinom se češće javlja u muškoj populaciji. Najučestalija lokalizacija ovog tumora je rektum, a najčešće se prezentuje kao ulcero-infiltrativna promena.

**b)** Najveći broj kolorektalnih adenokarcinoma se dijagnostikuje kao umereno diferentovan tip, u pT<sub>3</sub> stadijumu. U više od polovine pacijenata su nađene metastaze u limfnim čvorovima koje su visoko značajno povezane sa invazijom limfnih sudova. Udaljene metastaze su nađene kod svakog desetog ispitanika i visoko značajno su povezane sa invazijom krvnih sudova. U najvećem broju slučajeva kolorektalni adenokarcinom je dijagnostikovao u C<sub>2</sub> Astler- Coller stadijumu.

**2.** Ni jedan od ispitivanih biomarkera (Ki67, Stathmin1, E-cadherin, VEGF i Cd105) ne zavisi od pola, starosne dobi pacijenata i ne utiče značajno na lokalizaciju tumora u kolonu, način rasta i na stepen diferencijacije tumora.

**3. a)** Nizak nivo ekspresije Ki67 je u značajnoj korelaciji sa pT<sub>1</sub> i pT<sub>2</sub> statusom, sa odsustvom metastaza u limfnim čvorovima i sa B<sub>1</sub> i B<sub>2</sub> Astler-Coller stadijumom.

**b)** Povišena ekspresija Ki67 značajno utiče na limfo-vaskularnu i perineuralnu invaziju, na prisustvo metastaza u limfnim čvorovima, na prisustvo udaljenih metastaza i na C<sub>2</sub> i D Astler-Coller stadijum.

**c)** U slučaju povišene ekspresije Ki67 postoji i linearno povećanje imunoekspresije Stathmin1, VEGF i CD105, ali i sniženje i/ili odsustvo imunoekspresije E-cadherina.

**4. a)** Nizak nivo ekspresije Stathmin1 je u značajnoj vezi sa pT<sub>1</sub> statusom i sa B<sub>1</sub> Astler-Coller stadijumom tumora.

**b)** Visok nivo ekspresije Stathmin1 značajno utiče na limfo-vaskularni i perineuralnu invaziju, na prisustvo metastaza u limfnim čvorovima, na prisustvo udaljenih metastaza i na C<sub>2</sub> i D Astler-Coller stadijum.

**c)** Visok nivo imunoekspresije Stathmin1 je u značajnoj pozitivnoj korelaciji sa imunoekspresijom Ki67, VEGF i CD105 i u inverznoj korelaciji sa E-cadherinom.

**5. a)** Izostanak ekspresije E-cadherina značajno utiče na pT<sub>3</sub> i pT<sub>4</sub> status tumora, na limfo-vaskularnu i perineuralnu invaziju, na metastaze u limfnim čvorovima, udaljene metastaze i C<sub>2</sub> i D Astler-Coller stadijum.

**b)** Umerena ekspresija E-cadherina značajno utiče na pT<sub>2</sub> status tumora i na B<sub>1</sub> i B<sub>2</sub> Astler-Coller stadijum kolorektalnog karcinoma.

**c)** Sa povećanjem ekspresije E-cadherin-a opada nivo ekspresije Sthathmin1, Ki67, VEGF, CD105

**6. a)** Umerena ekspresija VEGF značajno utiče na pT<sub>2</sub> status i B<sub>2</sub> Astler-Coller stadijum kolorektalnog karcinoma

**b)** Visok nivo ekspresije VEGF značajno utiče na pT<sub>3</sub> i pT<sub>4</sub> status tumora, na limfo-vaskularnu i perineuralnu invaziju, na metastaze u limfnim čvorovima, udaljene metastaze i C<sub>2</sub> i D Astler-Coller stadijum

**c)** Sa povećanjem nivoa ekspresije VEGF značajno se povećava imunoekspresija Stathmin1, Ki67 i CD105, a opada imunoekspresija E-cadherina.

**7. a)** Nizak indeks ekspresije CD105 je u značajnoj vezi sa pT<sub>1</sub> i pT<sub>2</sub> statusom i sa B<sub>1</sub> i B<sub>2</sub> Astler-Coller stadijumom kolorektalnog karcinoma.

**b)** Visok nivo ekspresije CD105 značajno utiče na pT<sub>3</sub> i pT<sub>4</sub> status tumora, na limfo-vaskularnu i perineuralnu invaziju, na metastaze u limfnim čvorovima, udaljene metastaze i C<sub>2</sub> i D Astler-Coller stadijum

**c)** Mikrovaskularna gustina odnosno ekspresija CD105 u značajnoj je pozitivnoj korelaciji sa ekspresijom Stathmin1, Ki67, VEGF i negativnoj sa ekspresijom E-cadherina.

**8.** Multivarijantnom regresionom stepwise analizom je potvrđeno da su E-cadherin, Stathmin1, Ki67, pT status i udaljene metastaze prediktivni faktori za progresiju kolorektalnog adenokarcinoma.

**9.** ROC analizom je utvrđeno da najveću dijagnostičku validnost u progresiji kolorektalnog adenokarcinoma ima imunoekspresija Stathmin1, zatim Ki67 i na kraju imunoekspresija CD105.

## 8. OPŠTI ZAKLJUČAK

- U ovoj studiji je utvrđeno da su, E-cadherin, Stathmin1 i Ki67 u kombinaciji sa pT statusom i udaljenim metastazama, prediktori progresije kolorektalnog adenokarcinoma.
- Najbolje dijagnostičke performanse sa visokom senzitivnošću i specifičnošću ima Stathmin1.
- Danas, kada u kliničkoj praksi i naučnoj javnosti postoji snažna podrška personalizovanom lečenju kolorektalnog karcinoma Stathmin1, sa svojim značajnim uticajem na proliferaciju, neoangiogenezu i metastaziranje predstavlja ozbiljnog kandidata za atraktivnu terapijsku metu.

## 9. LITERATURA

1. Hamilton SR, Bosman FT, Lyas M, Morreau H, Nakamura SJ, Riboli E, Sobin LH: Carcinoma of the colon and rectum. In: Bosman FT, Carniero F, Hruban RH, Theise D (eds): WHO Classification of Tumours Of the Digestive System (4th Edn), IARC, Lyon 2010, pp 132-146
2. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A: Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2018;68(6):394-424.
3. Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Aster JC. Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease. 8th ed. Philadelphia (PA): Elsevier Saunders; 2010. pp. 826-827.
4. Kaneko K, Kurahashi T, Makino R, Konishi K, Ito H, Katagiri A, Kumekawa Y, Hirayama Y, Yoneyama K, Kushima M, Kusano M, Tajiri H, Rembacken BJ, Mitamura K, Imawari M. Pathological features and genetic alterations in colorectal carcinomas with characteristics of nonpolypoid growth. *Br.J.Cancer.* 2004; 19;91(2):312-8.
5. Zhang HQ, Guo X, Guo SQ, Wang Q, Chen XQ, Li XN, Guo LS. STMN1 in colon cancer: expression and prognosis in Chinese patients. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2016; 20(10):2038-44.
6. Akhtar J, Wang Z, Zhang ZP, Bi MM. Lentiviral-mediated RNA interference targeting stathmin1 gene in human gastric cancer cells inhibits proliferation in vitro and tumor growth in vivo. *J Transl Med.* 2013;16;11:212
7. Ke B, Guo X, Li N, Wu LL, Bin Li B, Zhang R, Liang H: Clinical significance of Stathmin1 expression and epithelial-mesenchymal transition in curatively resected gastric cancer. *Mol Clin Oncol* 2019 Feb; 10(2):214-222.
8. Habberstad AH, Gulati S, Torp SH. Evaluation of the proliferation markers Ki-67/MIB-1, mitotin, survivin, pHH3, and DNA topoisomerase II $\alpha$  in human anaplastic astrocytomas—an immunohistochemical study. *Diagn Pathol.* 2011; 24;6:43-8
9. Iseki Y, Shibutani M, Maeda K, Nagahara H, Ikeya T, Hirakawa K. Significance of E-cadherin and CD44 expression in patients with unresectable metastatic colorectal cancer. *Oncol Lett.* 2017;14(1):1025-1034

10. Chen X, Wang Y, Xia H, et al: Loss of E-cadherin promotes the growth, invasion and drug resistance of colorectal cancer cells and is associated with liver metastasis. *Mol Biol Rep* 2012;39: 6707-6714
11. Yan HB, Wang XF, Zhang Q, Tang ZQ, Jiang YH, Fan HZ, Sun YH, Yang PY, Liu F. Reduced expression of the chromatin remodeling gene ARID1A enhances gastric cancer cell migration and invasion via downregulation of E-cadherin transcription. *Carcinogenesis*. 2014;35(4):867-76.
12. Folkman J: Tumor angiogenesis: therapeutic implications, *N Engl J Med*, 1971, 285(21):1182–1186
13. Guşet G, Costi S, Lazăr E, Dema A, Cornianu M, Vernic C, Păiuşan L.:Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and assessment of microvascular density with CD34 as prognostic markers for endometrial carcinoma. *Rom J Morphol Embryol*. 2010; 51:677-82
14. Yang WH, Chen JC, Hsu KH, Lin CY, Wang SW, Wang SJ, Chang YS, Tang CH. Leptin increases VEGF expression and enhances angiogenesis in human chondrosarcoma cells. *Biochim Biophys Acta*. 2014; 1840(12):3483-93
15. Minhajat R, Mori D, Yamasaki F, Sugita Y, Satoh T, Tokunaga O. Endoglin (CD105) expression in angiogenesis of colon cancer: analysis using tissue microarrays and comparison with other endothelial markers. *Virchows Arch*. 2006; 448(2):127-34
16. Czekierdowski A, Czekierdowska S, Czuba B, Cnota W, Sadowski K, Kotarski J, Zwirska-Korcza K. Microvessel density assessment in benign and malignant endometrial changes. *J Physiol Pharmacol*. 2008;59 Suppl 4:45-51.
17. Mohamed SY, Mohammed HL, Ibrahim HM, Mohamed EM, Salah M. Role of VEGF, CD105, and CD31 in the Prognosis of Colorectal Cancer Cases. *J Gastrointest Cancer*. 2019; 50(1):23-34
18. Erdem O, Taskiran C, Onan MA, Erdem M, Guner H, Ataoglu O. CD105 expression is an independent predictor of survival in patients with endometrial cancer. *Gynecol Oncol*. 2006; 103(3):1007-11.
19. Papa A, Zaccarelli E, Caruso D, Vici P, Benedetti Panici P, Tomao F. Targeting angiogenesis in endometrial cancer - new agents for tailored treatments. *Expert Opin Investig Drugs*. 2016; 25(1):31-49.
20. Smirnov IV, Gryazeva IV, Samoilovich MP, Klimovich VB. Endoglin (CD105) a target for visualization and anti-angiogenic therapy for malignant tumors. *Vopr Onkol*. 2015; 61(6):898-907.
21. Ollauri-Ibáñez C, López-Novoa JM, Pericacho M. Endoglin-based biological therapy in the treatment of angiogenesis-dependent pathologies. *Expert Opin Biol Ther*. 2017; 17(9):1053-1063.
22. Krmpotić-Nemanić J., Marušić A: Anatomija čovjeka, Medicinska naklada, Zagreb, 2007

23. Čukuranović RE. Anatomija čoveka-abdomen. Punta, Niš, 2002
24. Irving MH, Catchpole B. ABC of colorectal diseases: Anatomy and physiology of the colon, rectum, and anus. *BMJ* 1992;304(6834):1106-8.
25. Nivatvongs S GP. Surgical Anatomy. In: Santhat Nivatvongs PG, editor. Principles and practice of surgery for the colon, rectum, and anus. 3rd ed. New York: Informa Healthcare USA, 2007
26. Bošković M: Anatomija čoveka, deskriptivna i funkcionalna. XX izdanje. Medicinska knjiga, Beograd, 1993
27. Sakorafas GH, Zouros E, Peros G. Applied vascular anatomy of the colon and rectum: clinical implications for the surgical oncologist. *Surg Oncol.* 2006; 15(4):243-55.
28. Anson BJ and McVay CB. Surgical Anatomy. W.B. Sanders Company, London, 1984
29. Draganić VP, Mijač M, Radonjić V. Anatomija čoveka- abdomen i karlica. Savremena administracija, Beograd, 2002
30. Mahmoud N, Rombeau J, Ross HM, Fry RD. Colon and Rectum. In: Townsend CM, Beauchamp RD, Evers BM, Mattox KL, editors. Sabiston Textbook of Surgery. 17<sup>th</sup> ed. International edition: Elsevier; 2004.
31. Mahadevan V. Anatomy of the rectum and anal canal. *Surgery (United Kingdom)*. 2017;35(3):121-5.
32. Rosai J: Colon. In: Rosai and Ackerman's Surgical Pathology, 10<sup>th</sup> edition, Elsevier. 2011, pp:752-771
33. Junqueira LC, Carneiro J: Osnovi histologije. 11<sup>th</sup> prevedeno izdanje. Data status, Beograd, 2005.
34. Somer LJ i Anđelković Z: Digestivni trakt. U: Anđelković Z, Somer LJ, Perović M, Avramović V, Milenkova LJ, Kostovska N, Petrović A (Eds) : **Histološka građa organa**. Bonafides 2001, pp 27-53.
35. Dahl J and Greenson JK: Colon In Mills SE (ed): Histology for Pathologists. (3rd Edn), Lippincott Williams & Wilkins, 2007, pp 627-648
36. Ponz de Leon M, Di Gregorio C. Pathology of colorectal cancer. *Dig Liver Dis.* 2001; 33(4):372-88
37. Mujović V: Funkcije debelog creva. U: Mujović M (ed): Medicinska fiziologija. Fondacija Solidarnost Srbije, Beograd, 2012.
38. Šegović R: Regulacija gastrointestinalne funkcije, U: Ganong WF. Pregled medicinske fiziologije. 13-to prevedeno izdanje. Savremena administracija, Beograd, 1991, str.457-486.
39. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and

- mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*. 2015;136 (5):359-386.
40. Arnold M, Sierra MS, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, and Bray F: Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality. *Gut* 2017, 683–691
  41. Institut za zaštitu zdravlja Srbije „dr Milan Jovanović Batut“: Incidencija i mortalitet od raka u Centralnoj Srbiji. Registar za rak u Centralnoj Srbiji Beograd, 2017
  42. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C and Parkin DM: Cancer Incidence and Mortality Worldwide. IARC Cancer Base, Globocan 2008, No 10, pp 1027-1056, IARC Lyon.
  43. O’Connell JB. Rates of colon and rectal cancers are increasing in young adults. *Am Surg*. 2003;69(10):866–72.
  44. Amini AQ, Samo KA, Memon AS. Colorectal cancer in younger population: our experience. *J Pak Med Assoc*. 2013;63(10):1275-7
  45. Vlajinac H., Šipetić–Grujičić S, Janković S, et al. Burden of cancer in Serbia. *CMJ* 2006; 47:134–141.
  46. Murphy G, Devesa SS, Cross AJ, Inskip PD, McGlynn KA, Cook MB. Sex disparities in colorectal cancer incidence by anatomic subsite, race and age. *Int J Cancer*. 2011;128: 1668-75.
  47. Kim SE, Paik HY, Yoon H, Lee JE, Kim N, Sung MK. Sex- and gender-specific disparities in colorectal cancer risk. *World J Gastroenterol*. 2015;21(17):5167-75.
  48. Steele SR, Park GE, Johnson EK, Martin MJ, Stojadinovic A, Maykel JA, Causey MW. The impact of age on colorectal cancer incidence, treatment, and outcomes in an equal-access health care system. *Dis Colon Rectum*. 2014; 57(3):303-10.
  49. Ciarrocchi A, Amicucci G. Sporadic carcinoma of the colon-rectum in young patients: a distinct disease? A critical review. *J Gastrointest Cancer*. 2013; 44(3):264-9.
  50. Siegel RL, Jemal A, Ward EM. Increase in incidence of colorectal cancer among young men and women in the United States. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2009; 18:1695-8.
  51. Weinberg BA, Marshall JL, Salem ME. The Growing Challenge of Young Adults With Colorectal Cancer Oncology (Williston Park). 2017; 31(5):381-9.
  52. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Colorectal Cancer Mortality Rates in Adults Aged 20 to 54 Years in the United States, 1970-2014. *JAMA*. 2017;318(6):572-574.
  53. Curtis RE, Freedman DM, Ron E, et al. New malignancies among cancer survivors: SEER cancer registries 1973–2000 (NIH publication no 05-3302), National Cancer Institute, Bethesda; 2006.
  54. Binefa G, Rodriguez-Moranta F, Teule A, Medina-Hayas M. Colorectal cancer: from prevention

to personalized medicine. *World J Gastroenterol* 2014;20(22):6786-808

55. Gala M, Chung DC. Hereditary colon cancer syndromes. *Semin Oncol*, 2011;38(4):490-9
56. Panjwani S, Bagewadi A, Keluskar V, Arora S. Gardner's Syndrome. *J Clin Imaging Sci*. 2011; 1:65.
57. Skomorowski M, Taxier M, Wise W Jr. Turcot syndrome type 2: medulloblastoma with multiple colorectal adenomas. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2012;10(10): A24.
58. Lagerstedt R K, Liu T, Vandrovcova J, Halvarsson B, Clendenning M, Frebourg T, Papadopoulos N, Kinzler KW, Vogelstein B, Peltomäki P, Kolodner RD, Nilbert M, Lindblom A. Lynch syndrome (hereditary nonpolyposis colorectal cancer) diagnostics. *J Natl Cancer Inst*. 2007;21;99(4):291-9.
59. Dugandžija T. Colorectal cancer- risk factors. *Arch Oncol*. 2010;18(1):11.
60. Stanojević G: Hirurgija kolona, rektuma i anusa. U Višnjić M : Hirurgija, Prosveta Niš, 2005
61. Lutgens MW, van Oijen MG, van der Heijden GJ, Vleggaar FP, Siersema PD, Oldenburg B. Declining risk of colorectal cancer in inflammatory bowel disease: an updated meta-analysis of population-based cohort studies. *Inflamm Bowel Dis*. 2013; 19(4):789-99.
62. Alavi K, Sturrock PR, Sweeney WB, Maykel JA, Cervera-Servin JA, Tseng J, Cook EF. A simple risk score for predicting surgical site infections in inflammatory bowel disease. *Dis Colon Rectum*. 2010; 53:1480-1486.
63. Feuerstein JD · Cheifetz AS: Crohn Disease: Epidemiology, Diagnosis, and Management *Mayo Clin Proc*. 2017; 92(7):1088-1103.
64. Peyrin-Biroulet L, Loftus EJ, Colombel J et al. Long-term complications, extraintestinal manifestations, and mortality in adult Crohn's disease in population-based cohorts. *Infl Ann Bowel Dis*. 2011;17: 471–478.
65. Miller PE, Lesko SM, Muscat JE, Lazarus P, Hartman TJ. Dietary patterns and colorectal adenoma and cancer risk: a review of the epidemiological evidence. *Nutr Cancer*. May 2010; 62(4):413-424.
66. Huxley RR, Ansary-Moghaddam A, Clifton P, Czernichow S, Parr CL, Woodward M. The impact of dietary and lifestyle risk factors on risk of colorectal cancer: a quantitative overview of the epidemiological evidence. *Int J Cancer*. 2009; 125(1):171-180
67. Zheng W and Lee S: Well-done Meat Intake, Heterocyclic Amine Exposure, and Cancer Risk *Nutr Cancer*. 2009; 61(4): 437–446.
68. Jeyakumar A, Dissabandara L, Gopalan V.J: A critical overview on the biological and molecular features of red and processed meat in colorectal carcinogenesis. *Gastroenterol*. 2017; 52(4):407-418.



69. Chan DS, Lau R, Aune D, et al. Red and Processed Meat and Colorectal Cancer Incidence: Meta-Analysis of Prospective Studies. Tomé D, ed. PLoS ONE. 2011; 6(6):e20456.
70. Williams CD, Satia JA, Adair LS, et al. Associations of Red Meat, Fat, and Protein Intake With Distal Colorectal Cancer Risk. *Nutr Cancer*. 2010;62(6):701-9.
71. Santarelli RL, Pierre F, Corpet DE. Processed meat and colorectal cancer: a review of epidemiologic and experimental evidence. *Nutr Cancer*. 2008;60(2):131-44
72. Doerner SK, Reis ES, Leung ES, Ko JS, Heaney JD, Berger NA, Lambris JD, Nadeau JH. High-Fat Diet-Induced Complement Activation Mediates Intestinal Inflammation and Neoplasia, Independent of Obesity. *Mol Cancer Res*. 2016; 14(10):953-65.
73. Orlich MJ, Singh PN, Sabaté J, Fan J, Sveen L, Bennett H, Knutsen SF, Beeson WL, Jaceldo-Siegl K, Butler TL, Herring RP, Fraser GE. Vegetarian dietary patterns and the risk of colorectal cancers. *JAMA Intern Med*. 2015 ;175(5):767-76.
74. Partula V, Deschasaux M, Druésne-Pecollo N, Latino-Martel P, Desmetz E, Chazelas E, Kesse-Guyot E, Julia C, Fezeu LK et al: Associations between consumption of dietary fibers and the risk of cardiovascular diseases, cancers, type2diabetes, and mortality in the prospective NutriNet-Sante cohort. *Am J Clin Nutr*. 2020; 112(1):195-207
75. James WP. Obesity-a modern pandemic: the burden of disease. *Endocrinol Nutr* 2013; 60 Suppl 1:3-6.
76. Liu Z, Zhang TT, Zhao JJ, Qi SF, Du P, Liu DW, Tian QB. The association between overweight, obesity and ovarian cancer: a meta-analysis. *Jpn J Clin Oncol*. 2015; 45(12):1107-15.
77. Avgerinos KI, Spyrou N, Mantzoros CS, Dalamaga M. Obesity and cancer risk: Emerging biological mechanisms and perspectives. *Metabolism*. 2019; 92:121-135
78. Durko L, Malecka-Panas E. Lifestyle modifications and colorectal cancer. *Curr Colorectal CancerRep*. 2014;10(1):45-54.
79. Wolin KY, Tuchman H. Physical Activity and Gastrointestinal Cancer Prevention. *Recent Results Cancer Res*. 2010; 186:73-100.
80. Xie F, You Y, Huang J, Guan C, Chen Z, Fang M, Yao F, Han J. Association between physical activity and digestive-system cancer: An updated systematic review and meta-analysis *J Sport Health Sci*. 2021; 10(1):4-13.
81. Kirkegaard H, Johnsen NF, Christensen J, Frederiksen K, Overvad K, Tjønneland A. Association of adherence to lifestyle recommendations and risk of colorectal cancer: a prospective Danish cohort study. *BMJ* 2010; 341:c5504.
82. World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research (WCRF/AICR). Continuous

Update Project Report: Diet, Nutrition, Physical Activity and Colorectal Cancer 2016. Revised 2018. London: World Cancer Research Fund International; 2018. ;21: 33.

83. Department of Health and Human Services. The Health Consequences of Smoking: A Report of the Surgeon General. Atlanta, GA: U.S. Dept of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention, Office on Smoking and Health; 2014.
84. Nishihara R, Morikawa T, Kuchiba A, Lochhead P, Yamauchi M, Liao X, et al. A Prospective Study of Duration of Smoking Cessation and Colorectal Cancer Risk by Epigenetics-related Tumor Classification *Am J Epidemiol*. 2013; 178(1): 84–100
85. Wei, P. L., Lin, S. Y., & Chang, Y. J. Cigarette smoking and colorectal cancer: From epidemiology to bench. *Journal of Experimental and Clinical Medicine (Taiwan)*, 2011; 3(6), 257-61
86. Zisman AL, Nickolov A, Brand RE, Gorchow A, Roy HK. Associations between the age at diagnosis and location of colorectal cancer and the use of alcohol and tobacco: implications for screening. *Arch Intern Med* 2006; 166(6): 629–634
87. Parajuli R, Bjerkaas E, Tverdal A, Le Marchand L, Weiderpass E, Gram IT. Cigarette smoking and colorectal cancer mortality among 602,242 Norwegian males and females. 2014; 2014 (6): 137-145.
88. Wang Y, Duan H, Yang H, Lin J. A pooled analysis of alcohol intake and colorectal cancer. *Int J Clin Exp Med*. 2015;8(5):6878-6889.
89. Na HK, Lee JY. Molecular Basis of Alcohol-Related Gastric and Colon Cancer. *Int J Mol Sci*. 2017;18(6):1116.
90. Nguyen LH, Goel A, Chung DC. Pathways of Colorectal Carcinogenesis. *Gastroenterology*. 2020 ;158(2):291-302.
91. Grady WM, Carethers JM. Genomic and epigenetic instability in colorectal cancer pathogenesis. *Gastroenterology*. 2008; 135:1079–99.
92. Cysik AL, Nugent Z, Wightman RH, Singh H, McManus KJ. Characterizing Microsatellite Instability and Chromosome Instability in Interval Colorectal Cancers. *Neoplasia*. 2018;20(9):943–50.
93. Müller MF, Ibrahim AE, Arends MJ. Molecular pathological classification of colorectal cancer. *Virchows Arch*. 2016; 469(2):125-34.
94. Armaghany T, Wilson JD, Chu Q, Mills G. Genetic Alterations in Colorectal Cancer. *Gastrointest Cancer Res*. 2012; 5(1):19-27
95. Tariq K, Ghias K. Colorectal cancer carcinogenesis: a review of mechanisms. *Cancer Biol Med*. 2016; 13(1):120-35.

96. Liu X, Jakubowski M, Hunt JL: KRAS gene mutation in colorectal cancer is correlated with increased proliferation and spontaneous apoptosis. *Am J Clin Pathol.* 2011; 135(2):245-52.
97. Li XL, Zhou J, Chen ZR, Chng WJ. P53 mutations in colorectal cancer - molecular pathogenesis and pharmacological reactivation. *World J Gastroenterol.* 2015 Jan 7; 21(1):84-93
98. Yan WF, Wu G, Sun PC, Qiu D. P53 mutations occur more commonly than KRAS mutations in colorectal adenoma. *Int J Clin Exp Med.* 2015;8(1):1370–5.
99. Boussouar A, Tortereau A, Manceau A, Paradisi A, Gadot N, Vial J, Neves D, Larue L, Battistella M, Leboeuf C, Lebbé C, Janin A, Mehlen P. Netrin-1 and Its Receptor DCC Are Causally Implicated in Melanoma Progression. *Cancer Res.* 2020 ;80(4):747-756.
100. Fleming NI, Jorissen RN, Mouradov D, Christie M, Sakhianandeswaren A, Palmieri M, Day F, Li S, Tsui C, Lipton L, Desai J, et al. SMAD2, SMAD3 and SMAD4 mutations in colorectal cancer. *Cancer Res.* 2013; 73(2):725-35.
101. Fujiyoshi K, Yamamoto G, Takenoya T, Takahashi A, Arai Y, Yamada M, et al. Metastases Pattern of Stage IV Colorectal Cancer with High-Frequency Microsatellite Instability as a Prognostic Factor. *Anticancer Res.* 2017;31(1):239-247.
102. Dudley JC, Lin MT, Le DT, Eshleman JR. Microsatellite Instability as a Biomarker for PD-1 Blockade. *Clin Cancer Res.* 2016 Feb 15;22(4):813-20
103. Nojadeh JN, Sharif SB, Sakhinia E. Microsatellite Instability in Colo-rectal Cancer. *EXCLI J.* 2018; 17:159–68.
104. De' Angelis GL, Bottarelli L, Azzoni C, De' Angelis N, Leandro G, Di Mario F, Gaiani F, Negri F. Microsatellite instability in colorectal cancer. *Acta Biomed.* 2018; 89(9-S): 97-101.
105. Chen W, BJ S, Frankel W. Molecular genetics of microsatellite-unstable colorectal cancer for pathologists. *Diagn Pathol.* 2017; 4(12):24.
106. Haradhvala NJ, Polak P, Stojanov P, et al. Mutational strand asymmetries in cancer genomes reveal mechanisms of DNA damage and repair. *Cell.* 2016; 164(3):538-49.
107. Latham A, Srinivasan P, Kemel Y, Shia J, Bandlamudi C, Mandelker D, Middha S, Hechtman J, Zehir A, Dubard-Gault M, Tran C, Stewart C et al. Microsatellite Instability Is Associated With the Presence of Lynch Syndrome Pan-Cancer. *J Clin Oncol.* 2019; 37(4):286-295.
108. Haraldsdottir S, Hampel H, Tomsic J, Frankel WL, Pearlman R, De La Chapelle A, et al. Colon and endometrial cancers with mismatch repair deficiency can arise from somatic, rather than germline, mutations. *Gastroenterology.* 2014; 147(6):1308–16.
109. De Palma FDE, D'Argenio V, Pol J, Kroemer G, Maiuri MC, Salvatore F. The Molecular Hallmarks of the Serrated Pathway in Colorectal Cancer. *Cancers (Basel).* 2019 ;11(7):1017-42.

110. Heilmann RM, Cranford SM, Ambrus A, Grützner N, Schellenberg S, Ruaux CG, et al. Validation of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the measurement of canine S100A12. *Vet Clin Pathol.* 2016; 45: 135-47
111. Wu MH, Hong TM, Cheng HW, Pan SH, Liang YR, Hong HC, et al. Galectin-1-mediated tumor invasion and metastasis, up-regulated matrix metalloproteinase expression, and reorganized actin cytoskeletons. *Mol Cancer Res.* 2009; 7: 311-318
112. Poynter JN, Siegmund KD, Weisenberger DJ, Long TI, Thibodeau SN, Lindor N, et al. Molecular characterization of MSI-H colorectal cancer by MLHI promoter methylation, immunohistochemistry, and mismatch repair germline mutation screening. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2008; 17: 3208–15.
113. Simons CC, Hughes LA, Smits KM, Khalid-De Bakker CA, De Bruïne AP, Carvalho B, et al. A novel classification of colorectal tumors based on microsatellite instability, the CpG island methylator phenotype and chromosomal instability: implications for prognosis. *Ann Oncol.* 2013; 24: 2048–56
114. Wang W, Kandimalla R, Huang H, Zhu L, Li Y, Gao F, Goel A, Wang X. Molecular subtyping of colorectal cancer: Recent progress, new challenges and emerging opportunities. *Semin Cancer Biol.* 2019; 55:37-52.
115. Feldman M, Friedman L.S, Brandt L.J : Sleisenger and Fordtran’s gastrointestinal and liver disease: pathophysiology, diagnosis, management.(9<sup>th</sup> Edition), 2006, Saunders Elsevier 2006, pp.2786-7.
116. Thompson MR, O’Leary DP, Flashman K, Asiimwe A, Ellis BG, Senapati A. Clinical assessment to determine the risk of bowel cancer using Symptoms, Age, Mass and Iron deficiency anaemia (SAMI). *Br J Surg.* 2017; 104(10):1393-404.
117. Astin M, Griffin T, Neal RD, Rose P, Hamilton W. The diagnostic value of symptoms for colorectal cancer in primary care: a systematic review. *Br.J. Gen. Pract.* 2011; 61(586):e231-43.
118. Williams TGS, Cubiella J, Griffin SJ, Walter FM, Usher-Smith JA. Risk prediction models for colorectal cancer in people with symptoms: a systematic review. *BMC Gastroenterol.* 2016;16(1):63.
119. Walsh SV, Carey FA. Malignant epithelial neoplasms of the large bowel. In: Shepherd NA, Warren BF, Williams GT, Greenson JK, Lauwers GY, Novelli MR, editors. *Morson and Dawson’s gastrointestinal pathology.* 5th ed. Oxford: Wiley-Blackwell; 2013. p. 685-732.
120. Florescu-Țenea RM, Kamal AM, Mitruț P, Mitruț R, Ilie DS, Nicolaescu AC, Marinescu SA. Colon cancer: clinical, macroscopic and microscopic aspects. *Rom J Morphol Embryol.* 2018; 59(4):1179-1188. PMID: 30845299 Free article.
121. Stintzing S, Tejpar S, Gibbs P, Thiebach L, Lenz HJ. Understanding the role of primary tumour localisation in colorectal cancer treatment and outcomes. *Eur J Cancer.* 2017; 84:69-80

122. Hsu YL, Lin CC, Jiang JK, Lin HH, Lan YT, Wang HS, Yang SH, Chen WS, Lin TC, Lin JK, Lin PC, Chang SC. Clinicopathological and molecular differences in colorectal cancer according to location. *Int J Biol Markers*. 2019;34(1):47-53.
123. Shen H, Yang J, Huang Q, Jiang MJ, Tan YN, Fu JF, et al. Different treatment strategies and molecular features between right-sided and left-sided colon cancers. *World J Gastroenterol* 2015;21(21):6470–8.
124. Lan YT, Jen-Kou L, Lin CH, Yang SH, Lin CC, Wang HS, et al. Mutations in the RAS and PI3K pathways are associated with metastatic location in colorectal cancers. *J Surg Oncol* 2015; 111(7):905–10.
125. Lee MS, McGuffey EJ, Morris JS, Manyam G, Baladandayuthapani V, Wei W, et al. Association of CpG island methylator phenotype and EREG/AREG methylation and expression in colorectal cancer. *Br J Cancer* 2016; 114(12): 1352–61
126. Mayer B, Zoller M, Singer T, Magosch S, Joka M, Werner J. Targeted therapy using trastuzumab will overcome chemotherapeutic failure in liver metastasis of colorectal cancer. *Eur Surg Res* 2015.
127. Petrelli F, Tomasello G, Borgonovo K, Ghidini M, Turati L, Dallera P, et al. Prognostic survival associated with left-sided vs right-sided colon cancer: a systematic review and meta-analysis. *JAMA Oncol*;2017 ;3(2):211-219.
128. Webber C, Gospodarowicz M, Sobin LH, et al. Improving the TNM classification: findings from a 10-year continuous literature review. *Int J Cancer*. 2014;135(2):371-8.
129. Samadder NJ, Curtin K, Tuohy TM, et al. Increased risk of colorectal neoplasia among family members of patients with colorectal cancer: a population-based study in Utah. *Gastroenterology*. 2014; 147(4): 814-21
130. Lohsiriwat V. Anorectal emergencies. *World J Gastroenterol*. 2016 Jul 14; 22(26):5867-78.
131. Katsoula A, Paschos P, Haidich AB, et al. Diagnostic Accuracy of Fecal Immunochemical Test in Patients at Increased Risk for Colorectal Cancer: A Meta-analysis. *JAMA Intern Med*. 2017;177(8):1110-8.
132. Ramdzan AR, Abd Rahim MA, Mohamad Zaki A, Zaidun Z, Mohammed Nawi A. Diagnostic Accuracy of FOBT and Colorectal Cancer Genetic Testing: A Systematic Review & Meta-Analysis. *Ann Glob Health*. 2019;85(1):70.
133. Imperiale TF, Gruber RN, Stump TE, et al. Performance characteristics of fecal immunochemical tests for colorectal cancer and advanced adenomatous polyps: A systematic review and meta-analysis. *Ann Intern Med* 2019; 170:319–29.
134. Gao Y, Wang J, Zhou Y, Sheng S, Qian SY, Huo X. Evaluation of Serum CEA, CA19-9, CA72-4, CA125 and Ferritin as Diagnostic Markers and Factors of Clinical Parameters for Colorectal

Cancer. Sci Rep. 2018; 8(1):2732

135. Simon K. Colorectal cancer development and advances in screening. Clin Interv Aging. 2016; 11:967-76.

136. Wallace MB: New Strategies to Improve Polypectomy During Colonoscopy. Gastroenterol Hepatol (N Y). 2017; 13(10 Suppl 3):1-12.

137. Bouri S, Martin: Investigation of iron deficiency anaemia J. Clin Med (Lond). 2018;18(3):242-244.

138. Spiceland CM, Lodhia N. Endoscopy in inflammatory bowel disease: Role in diagnosis, management, and treatment. World J Gastroenterol. 2018;24(35):4014-4020.

139. Baker FA, Mari A, Hosadurg D, Suki M, Ovadia B, Gal O, Kopelamn Y. The impact of colonoscopy indication on polyp detection rate. Ann Gastroenterol. 2019;32(3):278-282.

140. Rizk MK, Sawhney MS, Cohen J, Pike IM, Adler DG et al. Quality indicators for G endoscopic procedures on behalf of American Society for Gastrointestinal Endoscopy and American College of Gastroenterology. Gastrointestinal endoscopy 2015; 81(1): 3-16

141. Al-Najami I, Rancinger CP, Larsen MK, Spolén E, Baatrup G. The Diagnostic Yield of Colonoscopy Stratified by Indications. Gastroenterol Res Pract, 2017:4910143.

142. Jigar Bhagatwala, Arpit Singhal, Summer Aldrugh, Muhammed Sherid, Humberto Sifuentes, Subbaramiah Sridhar Colonoscopy-Indications and Contraindications in Screening for Colorectal Cancer with Colonoscopy. Intech 2015;35-59

143. Krivokapić Z, Karcinom debelog creva. Zavod za udžbenike i Srpska akademija nauka i umetnosti, Beograd 2018

144. Kwang Tay Y, Yin Tay J, Naqash N, Cashin P. Infective endocarditis and infected aneurysm of splenic artery post colonoscopy. Ann Gastroenterol. 2013;26(2):170-172.

145. Gunderman R: Osnovi radiologije: Klinička slika, patofiziologija, imidžing, 3. izdanje, Data Status, Beograd 2016

146. 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.

147. Nerad E, Lahaye MJ, Maas M, Nelemans P, Bakers FC, Beets GL, et al. Diagnostic Accuracy of CT for Local Staging of Colon Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. AJR Am J Roentgenol. 2016;207(5):984-95.

148. Nakajima I, Aoki J, Sakurai S, Naitoh H, Taketomi-Takahashi A, Tsushima Y. Local massive venous invasion in colorectal cancer: CT-pathological correlation and its clinical implication. Br J

Radiol. 2015; 88(1045):20140319.

149. Guniganti P, Lewis S, Rosen A, Connolly S, Raptis C, Mellnick V. Imaging of acute anorectal conditions with CT and MRI. *Abdom Radiol (NY)*.2017;42(2):403-22.

150. Jaffe T, Thompson WM. Large-Bowel Obstruction in the Adult: Classic Radiographic and CT Findings, Etiology, and Mimics. *Radiology*. 2015;275(3):651-63.

151. Khalili K, Lawlor RL, Pourafkari M, Lu H, Tyrrell P, Kim TK, Jang HJ, Johnson SA, Martel AL. Convolutional neural networks versus radiologists in characterization of small hypoattenuating hepatic nodules on CT: a critical diagnostic challenge in staging of colorectal carcinoma. *Sci Rep*. 2020; 10(1):15248.

152. L. Rivera Domínguez A, de Araujo Martins-Romeo D, Ruiz García T, García de la Oliva A, Cueto Álvarez L. Urgent Multidetector Computed Tomography in Colon Cancer: Postsurgical Changes and Early Complications. *Radiologia*. 2019; 61(4):286-296.

153. Dighe S, Purkayastha S, Swift I, Tekkis PP, Darzi A, A'Hern R. Diagnostic precision of CT in local staging of colon cancers: a meta-analysis. *Clin Radiol*. 2010. 65(9):708-19.

154. Kijima S, Sasaki T, Nagata K, Utano K, Lefor AT, Sugimoto H. Preoperative evaluation of colorectal cancer using CT colonography, MRI, and PET/CT. *World J Gastroenterol*. 2014; 20(45):16964-75.

155. Yee J, Weinstein S, Morgan T, Alore P, Aslam R. Advances in CT Colonography for Colorectal Cancer Screening and Diagnosis. *J Cancer*. 2013; 4:200–209.

156. Sosna J, Kruskal JB, Bar-Ziv J, Copel L, Sella T. Extracolonic findings at CT colonography. *Abdom Imaging*. 2005; 30:709–713.

157. Nowicki A, Kula Z, Dobrzyń P. Clinical value of colonoscopy and positron emission tomography with computed tomography for colorectal cancer diagnosis. *Pol Przegl Chir*. 2019 ;91(1):6-9.

158. Pickhardt PJ, Choi JR, Hwang I, Butler JA, Puckett ML, Hildebrandt HA, Wong RK, Nugent PA, Mysliwiec PA, Schindler WR. Computed tomographic virtual colonoscopy to screen for colorectal neoplasia in asymptomatic adults. *N Engl J Med*. 2003; 349:2191–2200.

159. Reginelli A, Clemente A, Sangiovanni A, Nardone V, Selvaggi F, Sciaudone G, Ciardiello F, Martinelli E, Grassi R, Cappabianca S.: Endorectal Ultrasound and Magnetic Resonance Imaging for Rectal Cancer Staging: A Modern Multimodality Approach. *J Clin Med*. 2021; 10(4):641.

160. Taylor FG, Quirke P, Heald RJ, Moran BJ, Blomqvist L, Swift IR, Sebag-Montefiore D, Tekkis P, Brown G. Preoperative magnetic resonance imaging assessment of circumferential resection margin predicts disease-free survival and local recurrence: 5-year follow-up results of the MERCURY study. *J Clin Oncol*. 2014; 32:34–43

161. Zhang G., Cai Y.Z., Xu G.H. Diagnostic Accuracy of MRI for Assessment of T Category and Circumferential Resection Margin Involvement in Patients With Rectal Cancer: A Meta-Analysis. *Dis. Colon Rectum*.2016;59:789–799.
162. Yu L., Wang L., Tan Y., Hu H., Shen L., Zheng S., Ding K., Zhang S., Yuan Y. Accuracy of Magnetic Resonance Imaging in Staging Rectal Cancer with Multidisciplinary Team: A Single-Center Experience. *J. Cancer*. 2019; 10:6594–6598.
163. Oien K., Forsmo H.M., Rösler C., Nylund K., Waage J.E., Pfeffer F. Endorectal ultrasound and magnetic resonance imaging for staging of early rectal cancers: How well does it work in practice? *Acta Oncol*. 2019; 58(Suppl. 1): S49–S54
164. Scheele J., Schmidt S.A., Tenzer S., Henne-Bruns D., Kornmann M. Overstaging: A Challenge in Rectal Cancer Treatment. *Visc. Med*. 2018; 34:301–306.
165. Reginelli A., Clemente A., Cardone C., Urraro F., Izzo A., Martinelli E., Troiani T., Ciardiello F., Brunese L., Cappabianca S. Computed tomography densitometric study of anti-angiogenic effect of regorafenib in colorectal cancer liver metastasis. *Future Oncol*. 2018; 14:2905–2913.
166. Xia Q, Liu J, Wu C, Song S, Tong L, Huang G, Feng Y, Jiang Y, Liu Y, Yin T, Ni Y. Prognostic significance of (18) FDG PET/CT in colorectal cancer patients with liver metastases: a meta-analysis. *Cancer Imaging*. 2015; 15:19-26
167. Graham MM. Quantitation of PET data in clinical practice. In: *Clinical PET-CT in Radiology*. Shreve P, Townsend DW (eds). Springer Science-Business Media, LLC. NY, USA; 2011.
168. Surasi DS, O'Malley JP, Bhambhani P. 18F-FDG PET/CT Findings in Portal Vein Thrombosis and Liver Metastases. *J Nucl Med Technol*. 2015 Sep; 43(3):229-30.
169. Lin EC, Alavi A. Oncologic PET by anatomical region. In: *PET and PET/CT: A clinical guide*, 2nd ed. Lin EC, Alavi A (eds). Thieme Medical Publishers, Inc. New York, USA, 2009.
170. 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(46):8502-14.
171. Idos GE, Kwok J, Bonthala N, Kysh L, Gruber SB, Qu C. The Prognostic Implications of Tumor Infiltrating Lymphocytes in Colorectal Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Sci Rep*. 2020 Feb 25;10(1):3360.
172. Hashmi AA, Hashmi SK, Ali N, Thara K, Ali R, Edhi MM, Faridi N, Khan A. Clinicopathologic features of colorectal carcinoma: features predicting higher T-stage and nodal metastasis. *BMC Res Notes*. 2018; 11(1):52
173. Tong GJ, Zhang GY, Liu J, et al. Comparison of the eighth version of the American Joint Committee on Cancer manual to the seventh version for colorectal cancer: A retrospective review of



ourdata. *World J Clin Oncol*. 2018;9(7):148-161

174. Koelzer V, Lugli A. The tumor border configuration of colorectal cancer as a histomorphological prognostic indicator gastrointestinal cancers. *Front Oncol*. 2014; 4:29

175. Rose C., Wu H. Morphologic Criteria of Invasive Colonic Adenocarcinoma on Biopsy Specimens. *The Internet Journal of Pathology*. 2010;12 (1).

176. Luo C, Cen S, Ding G, Wu W. Mucinous colorectal adenocarcinoma: clinical pathology and treatment options. *Cancer Commun (Lond)*. 2019 Mar 29;39(1):13.

177. Hugén N., van de Velde C.J., de Wilt J.H., Nagtegaal I.D. Metastatic pattern in colorectal cancer is strongly influenced by histological subtype. *Ann. Oncol*. 2014; 25:651–657

178. Knox RD, Luey N, Sioson L et al. Medullary colorectal carcinoma revisited: a clinical and pathological study of 102 cases. *Ann Surg Oncol* 2015; 22:2988-9614.

179. Zenger S, Gurbuz B, Can U, Balik E, Bugra D. Clinicopathologic features and prognosis of histologic subtypes in the right-sided colon cancer. *J BUON*. 2020; 25(5):2154-2159.

180. Lee L.H., Yantiss R.K., Sadot E., Ren B., Calvacanti M.S., Hechtman J.F., Ivelja S., Huynh B., Xue Y., Shitilbans T., et al. Diagnosing colorectal medullary carcinoma: Interobserver variability and clinicopathological implications. *Hum. Pathol*. 2017; 62:74–82.

181. Lino-Silva L.S., Salcedo-Hernandez R.A., Herrera-Gomez A., Padilla-Rosciano A., Ramirez-Jaramillo M., Herrera-Goepfert R.E., et al: Colonic cribriform carcinoma, a morphologic pattern associated with low survival. *Int. J. Surg. Pathol*;2015, 23: 13-9.

182. Díaz Del Arco C, Domínguez Serrano I, Fernández Aceñero MJ. Colorectal cribriform comedo-type adenocarcinoma: a distinct subtype with poor prognosis? *Acta Gastroenterol Belg*. 2019; 82(2):329-332.

183. Branca G., Ieni A., Barresi V., Tuccari G., Caruso R.A. An updated review of cribriform carcinomas with emphasis on histopathological diagnosis and prognostic significance. *Oncol. Rev*. 2017; 11:317.

184. Bacorn C, Lin LK. Rare Signet Ring Cell Adenocarcinoma of the Colon Metastasis to the Orbit. *Case Rep Ophthalmol Med*. 2020 Feb 25; 2020:2940579

185. Verdú M, Román R, Calvo M, Rodón N, García B, González M, Vidal A, Puig X. Clinicopathological and molecular characterization of colorectal micropapillary carcinoma. *Mod Pathol*. 2011; 24:729–738.

186. Guzińska-Ustymowicz K, Niewiarowska K, Poczynicz A. Invasive micropapillary carcinoma: a distinct type of adenocarcinomas in the gastrointestinal tract. *World J Gastroenterol*. 2014 Apr 28;20(16):4597-606.

187. Lee HJ, Eom DW, Kang GH, Han SH, Cheon GJ, Oh HS, Han KH, Ahn HJ, Jang HJ, Han MS. Colorectal micropapillary carcinomas are associated with poor prognosis and enriched in markers of stem cells. *Mod Pathol*. 2013; 26:1123–1131.
188. Hirano D, Oka S, Tanaka S, Sumimoto K, Ninomiya Y, Tamaru Y, Shigita K, Hayashi N, Urabe Y, Kitadai Y, Shimamoto F, Arihiro K, Chayama K. Clinicopathologic and endoscopic features of early-stage colorectal serrated adenocarcinoma. *BMC Gastroenterol*. 2017 Dec 12;17(1):158.
189. Murakami T, Sakamoto N, Nagahara A. Clinicopathological features, diagnosis, and treatment of sessile serrated adenoma/polyp with dysplasia/carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol*. 2019 Oct; 34(10):1685-1695.
190. Murakami T, Mitomi H, Yao T et al. Distinct histopathological characteristics in colorectal submucosal invasive carcinoma arising in sessile serrated adenoma/polyp and conventional tubular adenoma. *Virchows Arch*. 2018; 472: 383– 393.
191. Wang R., Wang M.-J., Ping J. Clinicopathological features and survival outcomes of colorectal cancer in young versus elderly: a population-based cohort study of SEER 9 registries data (1988–2011) *Medicine*. 2015;94(35, article e1402)
- 192.** Khan M, Korphaisarn K, Saif A, Foo WC, Kopetz S. Early-Onset Signet-Ring Cell Adenocarcinoma of the Colon: A Case Report and Review of the Literature. *Case Rep Oncol Med*. 2017; 2017:2832180
193. Ryu JW, Lee MC, Jang WC. Detecting p53 gene mutation of breast cancer and defining differences between silver staining PCR-SSCP and immunohistochemical staining. *J Korean Med Sci*. 2000 Feb; 15(1):73-7.
194. Carraway KL, Ramsauer VP, Haq B, Carothers Carraway CA. Cell signaling through membrane mucins. *Bioessays*, 2003; 25(1):66–71.
195. Milosevic V, Vukmirovic F, Zindovic M, Krstic M, Milenkovic S, Jancic S. Interplay between expression of leptin receptors and mucin histochemical aberrations in colorectal adenocarcinoma. *Rom J Morphol Embryol*. 2015; 56(2 Suppl):709-16.
196. Uchida K, Kado S, Ando M, Nagata Y, Takagi A, Onoue M. A mucinous histochemical study of malignancy of aberrant crypt foci (ACF) in rat colon. *J Vet Med Sci*, 2001, 63(2): 145–149.
197. Jass JR, Walsh MD. Altered mucin expression in the gastrointestinal tract: a review. *J Cell Mol Med*, 2001, 5(3): 327–351.
198. Terada T. An immunohistochemical study of primary signet-ring cell carcinoma of the stomach and colorectum: II. Expression of MUC1, MUC2, MUC5AC, and MUC6 in normal mucosa and in 42 cases. *Int J Clin Exp Pathol*. 2013; 6(4):613-21.
199. Bu XD, Li N, Tian XG, Li L, Wang JS, Yu XJ, Huang PL. Altered expression of MUC2 and

MUC5AC in progression of colorectal carcinoma. *World J Gastroenterol.* 2010; 16:4089–4094

200. Kasprzak A, Siodła E, Andrzejewska M, Szmeja J, Seraszek-Jaros A, Cofta S, Szaflarski W. Differential expression of mucin 1 and mucin 2 in colorectal cancer. *World J Gastroenterol.* 2018 Sep 28;24(36):4164-4177

201. Jang KT, Chae SW, Sohn JH, Park HR, Shin HS.: Coexpression of MUC1 with p53 or MUC2 correlates with lymph node metastasis in colorectal carcinomas. *J Korean Med Sci.* 2002;17(1):29-33

202. Jalali-Nadooshan M, Siadati S, Davati A, Torabi Parizi G, Ghasemi S. Caspian Cytokeratin7 expression in gastric and colorectal adenocarcinoma: Correlation with prognostic factors. *J Intern Med.* 2015 Fall; 6(4):229-32.

203. Bayrak R, Yenidunya S, Haltes H. Cytokeratin 7 and Cytokeratin 20 expression in colorectal adenocarcinoma. *Pathol Res Pract.* 2011; 207:156–60.

204. Gurzu S, Jung I. Aberrant pattern of the cytokeratin 7/cytokeratin 20 immunophenotype in colorectal adenocarcinomas with BRAF mutation. *Pathol Res Pract.* 2012; 208:163–6

205. Zhao L, Liu SY, Li YM, Xiong ZT. Villin is a biomarker for reverse polarity in colorectal micropapillary carcinoma. *Oncol Lett.* 2021;21(1):72.

206. Kuroda N, Yorita K. Colon cancer with micropapillary carcinoma component: A clinicopathologic study of 9 cases. *Pol J Pathol.* 2017; 68:102–108

207. Stanczak A, Stec R, Bodnar L, Olszewski W, Cichowicz M, Kozłowski W, Szczylik C, Pietrucha T, Wieczorek M, Lamparska-Przybysz M. Prognostic significance of Wnt-1, beta-catenin and E-cadherin expression in advanced colorectal carcinoma. *Pathol Oncol Res.* 2011; 17(4):955-63.

208. Mendonsa AM, Na TY, Gumbiner BM. E-cadherin in contact inhibition and cancer. *Oncogene.* 2018 37(35):4769-4780.

209. Na TY, Schecterson L, Mendonsa AM, Gumbiner BM. The functional activity of E-cadherin controls tumor cell metastasis at multiple steps. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2020 Mar 17; 117(11):5931-5937.

210. Niknami Z, Muhammadnejad A, Ebrahimi A, Harsani Z, Shirkoohi R. Significance of E-cadherin and Vimentin as epithelial-mesenchymal transition markers in colorectal carcinoma prognosis. *EXCLI J;* Jun 26; 19:917-926.

211. Melincovici CS, Boşca AB, Şuşman S, Mărginean M, Mişu C, Istrate M, Moldovan IM, Roman AL, Mişu CM. Vascularendothelial growth factor (VEGF) - key factor in normal and pathological angiogenesis. *Rom J Morphol Embryol.* 2018;59(2):455-467.

212. Bendardaf R, El-Serafi A, Syrjänen K, Collan Y, Pyrhönen S. The effect of vascularendothelial growth factor-1 expression on survival of advanced colorectal cancer patients. *Libyan J Med.*

2017;12(1):1290741

213. Piawah S, Venook AP. Target therapy for colorectal cancer metastases: A review of current methods of molecularly target therapy and the use of tumor biomarkers in the treatment of metastatic colorectal cancer. *Cancer*. 2019;125(23):4139-4147
214. Amin MB, Greene FL, Edge SB, Compton CC, Gershenwald JE, Brookland RK, Meyer L, Gress DM, Byrd DR, Winchester DP: The Eighth Edition AJCC Cancer Staging Manual: Continuing to build a bridge from a population-based to a more “personalized” approach to cancer staging. *CA Cancer J Clin*. 2017;67(2):93-99.
215. Mouzakiti A, Nastos C, Vlachodimitropoulos D, Gennatas C, Kondi-Pafiti A, Voros D. Prognostic significance of EGFR and COX-2 expression in colorectal cancer and their association. A study in Greek population. *J BUON*. 2018 Jan-Feb;23(1):23-28.
216. Koulis C., Yap R., Engel R., Jardé T., Wilkins S., Solon G., Shapiro J.D., Abud H., McMurrick P. Personalized Medicine Current and Emerging Predictive and Prognostic Biomarkers in Colorectal Cancer. [(accessed on 30 June 2020)]; *Cancers*. 2020 12:812.
217. Lau TP, Roslani AC, Lian LH, Lee PC, Hilmi I, Goh KL, Chua KH. Association between EGF and VEGF functional polymorphisms and expression in colon cancer patients undergoing curative surgery. *Ann Surg Oncol*. 2006; 13(6):823–35. and sporadic colorectal cancer in the Malaysian population. *Genet Mol Res*. 2014 ;13(3):5555-61
218. Khan MA, Maken RN, Nisar H, Fatima I, Khan IU, Masood M, Shahid AB. THE Role of Preoperative carcinoembryonic antigen in recurrence of resectable colorectal carcinoma. *Acta Clin Croat*. 2020; 59(2):216-222.
219. Polat E, Duman U, Duman M, Atici AE, Reyhan E, Dalgic T, et al. Diagnostic value of preoperative serum carcinoembryonic antigen and carbohydrate antigen 19-9 in colorectal cancer. *Curr. Oncol*, 2014 ;21(1):e1-7.
220. Patel J.N., Fong M.K., Jagosky M. Colorectal cancer biomarkers in the era of personalized medicine. *J. Pers. Med*. 2019; 9:3.
221. Pellat A, Netter J, Perkins G, Cohen R, Coulet F, Parc Y, Svrcek M, Duval A, André T: Lynch syndrome: What is new? *Bull Cancer*. 2019 J;106(7-8):647-655
222. Umar A, Boland CR, Terdiman JP, Syngal S, Chapelle AD, Ruschoff J et al. Revised Bethesda guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability. *J Natl Cancer Inst*. 2004; 96:261–8
223. Geiersbach KB, Samowitz WS. Microsatellite instability and colorectal cancer. *Arch. Pathol Lab Med*. 2011;135:1269-77.
224. Ogunwobi OO, Mahmood F, Akingboye A. Biomarkers in Colorectal Cancer: Current

Research and Future Prospects. *Int J Mol Sci.* 2020;21(15):5311

225. Gong J., Cho M. and Fakhri M. (2016). RAS and BRAF in metastatic colorectal cancer management. *J. Gastrointest. Oncol.* 7, 687-704
226. Yao HW, Wu HW, Liu YH. From traditional population-based approach to individualized precision medicine: the interpretation of update on The AJCC Colorectal Cancer Staging System, Eighth Edition. *Zhonghua Wai Ke Za Zhi.* 2017; 55: 24-27
227. Kahn M. Can we safely target the WNT pathway. *Nat Rev Drug Discov* 2014; 13(7):513–532
228. Cerami E, Gao J, Dogrusoz U, et al. The cBio cancer genomics portal: an open platform for exploring multidimensional cancer genomics data. *Cancer Discov* 2012;2(5):401–404.
229. Zhang L, Shay JW. Multiple Roles of APC and its Therapeutic Implications in Colorectal Cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2017;109(8):332.
230. Borrás E, San Lucas FA, Chang K, et al. Genomic Landscape of Colorectal Mucosa and Adenomas. *Cancer Prev Res (Phila)* 2016;9(6):417–427.
231. Dow LE, O'Rourke KP, Simon J, et al. Apc Restoration Promotes Cellular Differentiation and Reestablishes Crypt Homeostasis in Colorectal Cancer. *Cell* 2015;161(7):1539–1552.
232. Anastas JN, Moon RT. WNT signalling pathways as therapeutic targets in cancer. *Nat Rev Cancer* 2013;13(1):11–26.
233. Tsuchida N., Murugan A.K., Grieco M. Kirsten Ras\* oncogene: Significance of its discovery in human cancer research. [(accessed on 30 June 2020)]; *Oncotarget.* 2016; 7:46717–46733.
234. Margonis G.A., Spolverato G., Kim Y., Karagkounis G., Choti M.A., Pawlik T.M. Effect of KRAS Mutation on Long-Term Outcomes of Patients Undergoing Hepatic Resection for Colorectal Liver Metastases. *Ann. Surg. Oncol.* 2015; 22:4158–4165.
235. Calistri D, Rengucci C, Seymour I, Leonardi E, Truini M, Malacarne D, Castagnola P, Giaretti W. KRAS, p53 and BRAF gene mutations and aneuploidy in sporadic colorectal cancer progression. *Cell Oncol.* 2006; 28(4):161-6.
236. Degirmenci U, Wang M, Hu J. Targeting Aberrant RAS/RAF/MEK/ERK Signaling for Cancer Therapy. *Cells.* 2020 Jan 13; 9(1):198.
237. Yuan ZX, Wang XY, Qin QY, Chen DF, Zhong QH, Wang L, et al. The prognostic role of BRAF mutation in metastatic colorectal cancer receiving anti-EGFR monoclonal antibodies: A meta-analysis. *PLoS One.* 2013; 8:e 65995.
238. Yokota T. Are KRAS/BRAF Mutations Potent Prognostic and/or Predictive Biomarkers in Colorectal Cancers? *Anticancer Agents Med. Chem.* 2012; 12:163–171

239. Li H, Zhang J, Tong JHM, Chan AWH, Yu J, Kang W, To KF. Targeting the Oncogenic p53 Mutants in Colorectal Cancer and Other Solid Tumors. *Int J Mol Sci.* 2019 Nov 28; 20(23):5999.
240. Stojnev S, Golubović N, Babović P. Mutacije TP53 gena- od čuvara genoma do onkogena. *Acta Medica Medianae.* 2010; 49 (1): 59-63
241. Wang H, Fu L, Wei D, Wang B, Zhang C, Zhu T, Ma Z, Li Z, Wu Y, Yu G. MiR-29c-3p Suppresses the Migration, Invasion and Cell Cycle in Esophageal Carcinoma via CCNA2/p53 Axis. *Front Bioeng Biotechnol.* 2020 Feb 20; 8:75.
242. Xue W., Zender L., Miething C., Dickins R.A., Hernando E., Krizhanovsky V., Cordon-Cardo C., Lowe S.W. Senescence and tumour clearance is triggered by p53 restoration in murine liver carcinomas. *Nature.* 2007; 445:656–660
243. Listrom M.B., Fenoglio-Preiser C.M. The colon: Normal ultrastructure and pathological patterns. In: Motta P.M., Fujita H., Correr S.(eds): *Ultrastructure of the Digestive Tract. Electron Microscopy in Biology and Medicine (Current Topics in Ultrastructural Research)*, vol 4. Springer, Boston, 1988.
244. Dienstmann R, Villacampa G, Sveen A, Mason MJ, Niedzwiecki D, Nesbakken A, Moreno V, Warren RS, Lothe RA, Guinney J. Relative contribution of clinicopathological variables, genomic markers, transcriptomic subtyping and microenvironment features for outcome prediction in stage II/III colorectal cancer. *Ann Oncol.* 2019; 30(10):1622-1629.
245. Obrocea FL, Sajin M, Marinescu EC, Stoica D. Colorectal cancer and the 7th revision of the TNM staging system: review of changes and suggestions for uniform pathologic reporting. *Rom J Morphol Embryol.* 2011;52(2):537-44.
246. Micev M. Patološka ispitivanja kolorektalnog karcinoma. U: Krivokapić Z (ed): *Karcinom rektuma.* Beograd: Zavod za udžbenike; 2012, str.361-374.
247. Tong GJ, Zhang GY, Liu J, et al. Comparison of the eighth version of the American Joint Committee on Cancer manual to the seventh version for colorectal cancer: A retrospective review of our data. *World J Clin Oncol.* 2018;9(7):148-161.
248. Dukes CE: The classification of cancer of the rectum. *J Pathol Bact* 1932; 35:323-332
249. Akkoca AN, Yanık S, Özdemir ZT, et al. TNM and Modified Dukes staging along with the demographic characteristics of patients with colorectal carcinoma. *Int J Clin Exp Med.* 2014; 7(9):2828-35.
250. Astler VB, Coller FA. The prognostic significance of direct extension of carcinoma of the colon and rectum. *Ann Surg* 1954; 139:846
251. Constantin GB, Firescu D, Voicu D, Ștefănescu B, Serban RMC, Berbec S, Panaitescu E, Bîrla R, Marica C, Constantinoiu S: Analysis of Prognostic Factors in Complicated Colorectal Cancer

- Operated in Emergency. *Chirurgia (Bucur)*. 2020; 115(1):23-38.
252. Wu JS. Rectal Cancer Staging. *Clinics in Colon and Rectal Surgery*. 2007; 20(3):148-157.
253. Kang H, O'Connell JB, Maggard MA, et al: A 10-year outcomes evaluation of mucinous and signet ring cell carcinoma of the colon and rectum. *Dis Colon Rectum* 2005;48:161
254. Filip S, Vymetalkova V, Petera J, Vodickova L, Kubecek O, John S, Cecka F, Krupova M, Manethova M, Cervena K, Vodicka P. Distant Metastasis in Colorectal Cancer Patients-Do We Have New Predicting Clinicopathological and Molecular Biomarkers? A Comprehensive Review. *Int J Mol Sci*. 2020; 21(15):5255
255. Pratap Singh A, Kumar A, Dhar A, Agarwal S, Bhimaniya S. Advanced colorectal carcinoma with testicular metastasis in an adolescent: a case report. *J Med Case Rep*. 2018; 12(1):304.
256. Yonemura Y, Canbay E, Ishibashi H. Prognostic factors of peritoneal metastases from colorectal cancer following cytoreductive surgery and perioperative chemotherapy. *ScientificWorldJournal*. 2013; 2013:978394.
257. Omranipour R, Mahmoodzadeh H, Safavi F. Prevalence of local recurrence of colorectal cancer at the Iranian Cancer Institute. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2014;15(20):8587-9.
258. Friel CM, Cromwell JW, Marra C, Madoff RD, Rothenberger DA, Garcia-Aguilar J. Salvage radical surgery after failed local excision for early rectal cancer. *Dis Colon Rectum*. 2002 Jul;45(7):875-9. doi: 10.1007/s10350-004-6320-z. PMID: 12130873
259. Andreoni B, Chiappa A, Bertani E, et al (2007). Surgical outcomes for colon and rectal cancer over a decade: results from a consecutive monocentric experience in 902 unselected patients. *World J Surg Oncol* 2007, 4: 73-7.
260. Li M, Li JY, Zhao AL, Gu J. Colorectal cancer or colon and rectal cancer ? Clinicopathological comparison between colonic and rectal carcinomas. *Oncology*, 2007, 73:52-7
261. Deng H, Shu XJ, Zhen HY, Deng L, Chen Y, Liu LJ. Prognostic significance of lymph node micrometastasis in colorectal cancer. *Ai Zheng*. 2003 ;22(7):762-6.
262. Iddings D, Ahmad A, David E, Bilchik A: The Prognostic Effect of Micrometastases in Previously Staged Lymph Node Negative (N0) Colorectal Carcinoma: A Meta-analysis *Annals of Surgical Oncology*, 2006; 13:1386–1392
263. Barresi V, Reggiani B, Vitarelli E, Di Gregorio C, Ponz de Leon M, Barresi G. Immunohistochemical Assessment of Lymphovascular Invasion in Stage I Colorectal Carcinoma. Prognostic Relevance and Correlation With Nodal Micrometastases. *The American Journal of Surgical Pathology*; 2012, 36 (1): 66-72
264. Sato T, Ueno H, Mochizuki H, et al. Objective criteria for the grading of venous invasion in

colorectal cancer. *Am J Surg Pathol.* 2010; 34: 454-462.

265. Liang P, Nakada I, Hong JW, et al. Prognostic significance of immunohistochemically detected blood and lymphatic vessel invasion in colorectal carcinoma: its impact on prognosis. *Ann Surg Oncol.* 2007; 14: 470-477.

266. Van Wyk, Hester C. The detection and role of lymphatic and blood vessel invasion in predicting survival in patients with node negative operable primary colorectal cancer. *Critical Reviews in Oncology / Hematology.* 2013; 90 (1):77 - 90

267. Betge J MJ, Lindtner RA, Kornprat P, Schlemmer A, Rehak P et al. Intramural and extramural vascular invasion in colorectal cancer, Pollheimer† Prognostic significance and quality of pathology reporting. *Cancer* 2012, 118(3):628-638

268. Shin YM, Pyo JS, Park MJ. The Impact of Extramural Venous Invasion in Colorectal Cancer: A Detailed Analysis Based on Tumor Location and Evaluation Methods. *Int J Surg Pathol.* 2020; 28(2):120-127.

269. Yamano T., Semba S., Noda M., et al. Prognostic significance of classified extramural tumor deposits and extracapsular lymph node invasion in T3-4 colorectal cancer: a retrospective single-center study. *BMC cancer.* 2015; 15(1):p. 859.

270. Zheng K, Zheng N, Xin C, Zhou L, Sun G, Wen R, Zhang H, Yu G, Bai C, Zhang W. The Prognostic Significance of Tumor Deposit Count for Colorectal Cancer Patients after Radical Surgery. *Gastroenterol Res Pract.* 2020 Mar 17; 2020:2052561.

271. Nagtegaal ID, Knijn N, Hugen N, Marshall HC, Sugihara K, Tot T, Ueno H, Quirke P. Tumor Deposits in Colorectal Cancer: Improving the Value of Modern Staging—A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Clin Oncol.* 2017;35(10):1119-1127.

272. Nagayoshi K, Ueki T, Nishioka Y et al., “Tumor deposit is a poor prognostic indicator for patients who have stage II and III colorectal cancer with fewer than 4 lymph node metastases but not for those with 4 or more,” *Diseases of the colon and rectum*, 2014, 57(4):467–474

273. Yabata E, Udagawa M, and Okamoto H, “Effect of tumor deposits on overall survival in colorectal cancer patients with regional lymph node metastases,” *Journal of rural medicine.* 2014, 9 (1):20–26

274. Ueno H, Mochizuki H, Shirouzu K, et al: Actual status of distribution and prognostic impact of extramural discontinuous cancer spread in colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2011,29:2550-2556

275. Shen F and Hong X, “Prognostic value of N1c in colorectal cancer: a large population-based study using propensity score matching,” *International journal of colorectal disease*, 2019, 34 (8) : 1375–1383

276. Bouquot M, Creavin B, Goasguen N et al., “Prognostic value and characteristics of N1c



colorectal cancer,” *Colorectal disease: the official journal of the Association of Coloproctology of Great Britain and Ireland*, 2018, 20 (9) : O248–248O255

277. Weiser MR , “AJCC 8th edition: colorectal cancer,” *Annals of surgical oncology*, 2018, 25 (6 ): 1454-1455

278. Rosty C, Williamson EJ, Clendenning M, Walters RJ, Win AK, Jenkins MA, Hopper JL, Winship IM, Southey MC, Giles GG, English DR, Buchanan DD. Should the grading of colorectal adenocarcinoma include microsatellite instability status? *Hum Pathol*. 2014; 45(10):2077-84.

279. Barresi V, Reggiani Bonetti L, Ieni A, Caruso RA, Tuccari G. Histological grading in colorectal cancer: new insights and perspectives. *Histol Histopathol*. 2015 Sep; 30(9):1059-67.

280. Micev M. Rana, preoperativna i intraoperativna histopatoloska dijagnostika kolorektalnog karcinoma. *Koncenzus konferencija – dijagnostika i lecenje karcinoma debelog creva*. Beograd, 2003: 56-66

281. Quirke P, Durdey P, Dixon MF, Williams NS: Local recurrence of rectal adenocarcinoma due to inadequate surgical resection: Histopathological study of lateral tumour spread and surgical excision. *Lancet* 1986; 2:996-999.,

282. Nagtegaal ID, Quirke P. What is the role for the circumferential margin in the modern treatment of rectal cancer? *J Clin Oncol*. 2008 ;26(2):303-12.

283. Liu Q, Luo D, Cai S, Li Q, Li X. Circumferential resection margin as a prognostic factor after rectal cancer surgery: A large population-based retrospective study. *Cancer Med*. 2018 Aug;7(8):3673-3681

284. Yun JA, Huh JW, Kim HC, Park YA, Cho YB, Yun SH, Lee WY, Chun HK. Local recurrence after curative resection for rectal carcinoma: The role of surgical resection. *Medicine (Baltimore)*. 2016; 95(27):e3942.

285. Hu G, Li L, Hu K. Clinical implications of perineural invasion in patients with colorectal cancer. *Medicine (Baltimore)*. 2020; 99(17):e19860.

286. Poeschl EM, Pollheimer MJ, Kornprat P, Lindtner RA, Schlemmer A, Rehak P, Vieth M, Langner C. Perineural invasion: correlation with aggressive phenotype and independent prognostic variable in both colon and rectum cancer. *J Clin Oncol*. 2010; 28:e358–e360; author reply e361-e362.

287. Rogers AC, Winter DC, Heeney A et al. Systematic review and meta-analysis of the impact of tumour budding in colorectal cancer. *Br J Cancer*. 2016; 115:831–840.

288. Lugli A, Kirsch R, Ajioka Y, Bosman F, Cathomas G, Dawson H et al.: Recommendations for reporting tumor budding in colorectal cancer based on the International Tumor Budding Consensus Conference (ITBCC) 2016. *Mod Pathol*. 2017 Sep;30(9):1299-1311.

289. Tomita S, Yamauchi M, Ichikawa K et al. The brand new trend of colorectal carcinoma pathology. *Nihon Rinsho* 2014; 72:63–70.
290. Kawachi H, Eishi Y, Ueno H et al. A three-tier classification system based on the depth of submucosal invasion and budding/sprouting can improve the treatment strategy for T1 colorectal cancer: a retrospective multicenter study. *Mod Pathol* 2015; 28:872–879.
291. Pai RK, Chen Y, Jakubowski MA *et al*, Colorectal carcinomas with submucosal invasion (pT1): analysis of histopathological and molecular factors predicting lymph node metastasis. *Mod Pathol* 2017; 30:113–122.
292. Choi JY, Jung SA, Shim KN et al. Meta-analysis of predictive clinicopathologic factors for lymph node metastasis in patients with early colorectal carcinoma. *J Korean Med Sci* 2015; 30:398–406.
293. Väyrynen JP, Sajanti SA, Klintrup K, Mäkelä J, Herzig KH, Karttunen TJ, Tuomisto A, Mäkinen MJ. Characteristics and significance of colorectal cancer associated lymphoid reaction. *Int J Cancer*. 2014; 134:2126–2135. doi: 10.1002/ijc.28533.
294. Jakubowska K, Kisielewski W, Kańczuga-Koda L, Koda M, Famulski W. Stromal and intraepithelial tumor-infiltrating lymphocytes in colorectal carcinoma. *Oncol Lett*. 2017 Dec; 14(6):6421-6432.
295. Ogino S, Nosho K, Irahara N, Meyerhardt JA, Baba Y, Shima K, Glickman JN, Ferrone CR, Mino-Kenudson M, Tanaka N, et al. Lymphocytic reaction to colorectal cancer is associated with longer survival, independent of lymph node count, microsatellite instability, and CpG island methylator phenotype. *Clin Cancer Res*. 2009; 15:6412–6420.
296. Niederhuber JE, Cole CE, Grochow L, Jacoby RF, Lee FT, Moony M, Ritter M: Colon Cancer. In: Armitage JO, Niederhuber JE, Kastan MB, McKenna WG (eds): *Clinical Oncology*<sup>3th</sup>, Elsevier, Churchill Livingstone, 2004, pp1871- 1877.
297. Stojanovic M, Radojkovic M, Jeremic LJ, Stanojevic G: Optimalno vreme za hirursko lecenje metastaza kolorektalnog karcinoma u jetri. U: Krivokapić Z (ed): *Karcinom rektuma*. Zavod za udžbenike, Beograd, 2012, pp409-418
298. Weiser MR, Garsia-Aguilar J, Yeo CJ: Basic Principles of the Operative Treatment of Colorectal Cancer. In: Yeo CJ (ed): *Shackelford's Surgery of the Alimentary Tract*, Elsevier, 8<sup>th</sup> edition, 2019, pp.1981-1991
299. São Julião GP, Habr-Gama A, Vailati BB, Araujo SEA, Fernandez LM, Perez RO. New Strategies in Rectal Cancer. *Surg Clin North Am*. 2017 Jun; 97(3):587-604.
300. Kwan MR, Steward DB and Dunn KB.: Colon, Rectum and Anus. In: Brunnicardi C (ed): *Schwartz's Principles of Surgery*, McGraw Hill Medical, 11<sup>th</sup> edition, 2019, pp 1259-1329.

301. Matsuda T, Yamashita K, Hasegawa H, Oshikiri T, Hosono M, Higashino N, Yamamoto M, Matsuda Y, Kanaji S, Nakamura T, Suzuki S, Sumi Y, Kakeji Y. Recent updates in the surgical treatment of colorectal cancer. *Ann Gastroenterol Surg.* 2018 Feb 15; 2(2):129-136.
302. Athanasiou CD, Markides GA, Kotb A, Jia X, Gonsalves S, Miskovic D. Open compared with laparoscopic complete mesocolic excision with central lymphadenectomy for colon cancer: a systematic review and meta-analysis. *Colorectal Dis.* 2016 ;18(7):O224-35.
303. Hiranyakas A, Ho YH. Surgical treatment for colorectal cancer. *Int Surg.* 2011 Apr-Jun;96(2):120-6.
304. Weiser MR, Jarnagin WR, Saltz LB. Colorectal cancer patients with oligometastatic liver disease: what is the optimal approach? *Oncology (Williston Park).* 2013;27(11):1074-8.
305. Chakedis J, Schmidt CR. Surgical Treatment of Metastatic Colorectal Cancer. *Surg Oncol Clin N Am.* 2018;27(2):377-399.
306. Huang YX, Lin YZ, Li JL, Zhang XQ, Tang LR, Zhuang QY, Lin FF, Lin XJ, Wu JX. Role of postoperative radiotherapy in pT3N0 rectal cancer: A risk-stratification system based on population analyses. *Cancer Med.* 2019 Mar; 8(3):1024-1033.
307. James A. Martenson Jr., Michael G. Haddock and Leonard L. Gunderson. Cancers of the Colon, Rectum, and Anus. In: Levitt SH, J. A. Purdy JA, Perez CA, Vijayakumar S (Eds.): *Technical Basis of Radiation Therapy (4<sup>th</sup> ed)*. Springer, 2006, pp545-561
308. Ministarstvo zdravlja Republike Srbije: Nacionalni vodič dobre kliničke prakse za dijagnostikovanje i lečenje raka kolona i rektuma, Beograd 2013
309. Krishnamurty DM, Hawkins AT, Wells KO, Mutch MG, Silveira ML, Glasgow SC, et al. Neoadjuvant Radiation Therapy in Locally Advanced Colon Cancer: a Cohort Analysis. *Journal of Gastrointestinal Surgery.* 2018; 22(5):906-12.
310. Weyhenmeyer B, Murphy AC, Prehn JH, Murphy BM. Targeting the anti-apoptotic Bcl-2 family members for the treatment of cancer. *Exp Oncol.* 2012; 34(3):192-9.
311. Schmoll HJ, Twelves C, Sun W, et al. Effect of adjuvant capecitabine or fluorouracil, with or without oxaliplatin, on survival outcomes in stage III colon cancer and the effect of oxaliplatin on post-relapse survival: a pooled analysis of individual patient data from four randomised controlled trials. *Lancet Oncol.* 2014; 15(13):1481-92.
312. Kountourakis P, Souglakos J, Gouvas N, et al. Adjuvant chemotherapy for colon cancer: a consensus statement of the Hellenic and Cypriot Colorectal Cancer Study Group by the HeSMO. *Ann Gastroenterol.* 2016; 29(1):18-23.
313. Nilsson PJ, Etten BV, Hospers GA, Pålman L, Velde CJVD, Beets-Tan RG. et al. Short-course radiotherapy followed by neo-adjuvant chemotherapy in locally advanced rectal cancer - the

RAPIDO trial. *Bmc Cancer*. 2013; 13:1–9

314. Vasić LJ: Značaj neoadjuvantnog pristupa u lečenju lokalno uznapredovalog carcinoma rektuma. *Biomedicinska Istraživanja*; 2018, 9(1):83-91

315. Glynne-Jones R, Wyrwicz L, Tiret E, Brow G, Rödel C, Cervantes A, et al. Rectal Cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2017; 28(suppl 4):iv22–iv40.

316. Li Y, Wang J, Ma X, Tan L, Yan Y, Xue C, Hui B, Liu R, Ma H, Ren J. A Review of Neoadjuvant Chemoradiotherapy for Locally Advanced Rectal Cancer. *Int J Biol Sci*. 2016 Jul 17; 12(8):1022-31

317. Fokas E, Liersch T, Fietkau R, et al. Tumor regression grading after preoperative chemoradiotherapy for locally advanced rectal carcinoma revisited: updated results of the CAO/ARO/AIO-94 trial. *J Clin Oncol*. 2014; 32:1554–62

318. Zheng J, Feng X, Hu W, Wang J, Li Y. Systematic review and meta-analysis of preoperative chemoradiotherapy with or without oxaliplatin in locally advanced rectal cancer. *Medicine (Baltimore)*. 2017; 96(13):e6487

319. Mao Q, Chen Z, Wang K, Xu R, Lu H, He X. Prognostic Role of High Stathmin1 Expression in Patients with Solid Tumors: Evidence from a Meta-Analysis. *Cell Physiol Biochem*. 2018; 50(1):66-78.

320. Belletti B, Baldassarre G: Stathmin: a protein with many tasks. New biomarker and potential target in cancer. *Expert Opin Ther Targets* 2011; 15: 1249-1266. Belletti B, Baldassarre G: Stathmin: a protein with many tasks. New biomarker and potential target in cancer. *Expert Opin Ther Targets* 2011; 15: 1249-1266.

321. Wang F, Xuan XY, Yang X, Cao L, Pang LN, Zhou R, Fan QX, Wang LX: Stathmin is a marker of progression and poor prognosis in esophageal carcinoma. *Asian Pac J Cancer Prev* 2014; 15: 3613-3618.

322. Zhang<sup>HQ</sup>, Guo X, Guo SQ, Wang O, Chen XQ, Li XN, Guo LS: STMN1 in colon cancer: expression and prognosis in Chinese patients. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2016 May; 20(10):2038-44.

323. Akhtar J, Wang Z, Yu C, Zhang ZP, Bi MM: STMN-1 gene: a predictor of survival in stage III esophageal squamous cell carcinoma after Ivor-Lewis esophagectomy? *Ann Surg Oncol* 2014; 21: 315-321.

324. Kang W, Tong JH, Chan AW, Lung RW, Chau SL, Wong QW, Wong N, Yu J, Cheng AS, To KF: Stathmin1 plays oncogenic role and is a target of microRNA-223 in gastric cancer. *PLoS One* 2012; 7:e33919.

325. Rubin CI, Atweh GF. The role of stathmin in the regulation of the cell cycle. *J. Cell Biochem*. 2004; 93:242–250.

326. Askeland C, Wik E, Finne K, Birkeland E, Arnes JB, Collett K, Knutsvik G, Krüger K, Davidsen B, Aas T, Eide GE, Stefansson IM, Foulkes WD, Akslen LA. Stathmin expression associates with vascular and immune responses in aggressive breast cancer subgroups. *Sci Rep.* 2020; 10(1):2914.
327. Tian FJ, Qin CM, Li XC, Wu F, Liu XR, Xu WM, et al. Decreased stathmin-1 expression inhibits trophoblast proliferation and invasion and is associated with recurrent miscarriage. *Am J Pathol.* 2015; 185(10):2709–21.
328. Biaoxue R, Hua L, Wenlong G, Shuanying Y. Overexpression of stathmin promotes metastasis and growth of malignant solid tumors: a systemic review and meta-analysis. *Oncotarget.* 2016 Nov 29; 7(48):78994-79007.
329. Kouzu Y, Uzawa K, Koike H, Saito K, Nakashima D, Higo M, Endo Y, Kasamatsu A, Shiiba M, Bukawa H. et al. Overexpression of stathmin in oral squamous-cell carcinoma: correlation with tumour progression and poor prognosis. *Br J Cancer.* 2006;94(5):717–723
330. Golouh R, Cufer T, Sadikov A, Nussdorfer P, Usher PA, Brünner N, Schmitt M, Lesche R, Maier S, Timmermans M. et al. The prognostic value of Stathmin-1, S100A2, and SYK proteins in ER-positive primary breast cancer patients treated with adjuvant tamoxifen monotherapy: an immunohistochemical study. *Breast Cancer Res Treat.* 2008; 110:317–326.
331. Lin W-C, Chen S-C, Hu F-C, Chueh S-C, Pu Y-S, Yu H-J, Huang K-H. Expression of stathmin in localized upper urinary tract urothelial carcinoma: correlations with prognosis. *Urology.* 2009; 74:1264–1269
332. Su D, Smith SM, Preti M, Schwartz P, Rutherford TJ, Menato G, Danese S, Ma S, Yu H, Katsaros D. Stathmin and tubulin expression and survival of ovarian cancer patients receiving platinum treatment with and without paclitaxel. *Cancer.* 2009;1(115):2453–2463
333. Chen J, Abi-Daoud M, Wang A, Yang X, Zhang X, Feilotter H, Tron V. Stathmin 1 is a potential novel oncogene in melanoma. *Oncogene.* 2012; 10:1038.
334. Reyes HD, Miecznikowski J, Gonzalez-Bosquet J, Devor EJ, Zhang Y, Thiel KW, Samuelson MI, McDonald M, Stephan JM, Hanjani P, Guntupalli S, Tewari KS, Backes F, Ramirez N, Fleming GF, Filiaci V, Birrer MJ, Leslie KK: High stathmin expression is a marker for poor clinical outcome in endometrial cancer: An NRG oncology group/gynecologic oncology group study. *Gynecol Oncol* 2017; 146: 247-253.
335. Osone K, Yokobori T, Katayama C, Takahashi R, Kato R, Tatsuski H, Takada T, Yajima R, Motegi Y, Ogawa H, Fujii T, Ojima H, Nakamura J, Yao T, Shirabe K, Kuwano H. STMN1 accumulation is associated with dysplastic and neoplastic lesions in patients with ulcerative colitis. *Oncol Lett.* 2019 Nov;18(5):4712-4718.
336. Friedrich B, Gronberg H, Landstrom M, Gullberg M, Bergh A. Differentiation-stage specific expression of oncoprotein 18 in human and rat prostatic adenocarcinoma. *Prostate.* 1995; 27:102–109.

337. Miceli C, Tejada A, Castaneda A, Mistry SJ. Cell cycle inhibition therapy that targets stathmin in *in vitro* and *in vivo* models of breast cancer. *Cancer gene Ther.* 2013; 20:298–307
338. Jeon TY, Han ME, Lee YW, Lee YS, Kim GH, et al. Overexpression of stathmin1 in the diffuse type of gastric cancer and its roles in proliferation and migration of gastric cancer cells. *Br J Cancer.* 2010; 102:710–718.
339. Machado-Neto JA, Rodrigues Alves APN, Fernandes JC, Coelho-Silva JL, Scopim-Ribeiro R, Fenerich BA, da Silva FB, Scheucher PS, Simões BP, Rego EM, Traina F. Paclitaxel induces Stathmin1 phosphorylation, microtubule stability and apoptosis in acute lymphoblastic leukemia cells. *Heliyon.* 2017 Sep 28; 3(9):e00405
340. Hemdan T, Linden M, Lind SB, Namuduri AV, Sjostedt E, de Stahl TD, Asplund A, Malmstrom PU, Segersten U: The prognostic value and therapeutic target role of stathmin-1 in urinary bladder cancer. *Br J Cancer* 2014; 111: 1180-1187.
341. Sun X, Kaufman PD. Ki-67: more than a proliferation marker. *Chromosoma.* 2018 Jun; 127(2):175-186
342. Mulyawan IM: Role of Ki67 protein in colorectal cancer. *Int J Res Med Sci.* 2019 Feb; 7(2):644-648
343. Jiang G, Li LT, Chen Q, Zheng JN. Ki67 is a promising molecular target in the diagnosis of cancer (Review). *Mol Med Rep.* 2015; 11:1566-72.
344. Kausch I, Lingnau A, Endl E, Sellmann K, Deinert I, Ratliff TL, Jocham D, Sczakiel G, Gerdes J, Böhle A. Antisense treatment against Ki-67 mRNA inhibits proliferation and tumor growth *in vitro* and *in vivo*. *Int J Cancer.* 2003 Jul 10; 105(5):710-6.
345. Li J, Liu ZY, Yu HB, Xue Q, He WJ, Yu HT. Clinicopathological significance of Ki67 expression in colorectal cancer: A protocol of systematic review and meta-analysis. *Medicine (Baltimore).* 2020 May; 99(20):e20136.
346. Wysocka J, Adamczyk A, Kruczak A, Niemiec J, Sas-Korczyńska B. High Ki-67 expression is a marker of poor survival in apocrine breast carcinoma. *Pol J Pathol.* 2020; 71(2):107-119.
347. Luo ZW, Zhu MG, Zhang ZQ, Ye FJ, Huang WH, Luo XZ. Increased expression of Ki-67 is a poor prognostic marker for colorectal cancer patients: a meta analysis. *BMC Cancer.* 2019 Feb 6; 19(1):123. doi: 10
348. Liu X, Chu KM. E-cadherin and gastric cancer: cause, consequence, and applications. *Biomed Res Int.* 2014; 637308.
349. Christou N, Perraud A, Blondy S, Jauberteau MO, Battu S, Mathonnet M. E-cadherin: A potential biomarker of colorectal cancer prognosis. *Oncol Lett.* 2017 Jun; 13(6):4571-4576

350. Green KJ, Getsios S, Troyanovsky S, Godsel LM. Intercellular junction assembly, dynamics, and homeostasis. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2010 Feb; 2(2):a000125.
351. Wang Y, Yago T, Zhang N, Abdisalaam S, Alexandrakis G, Rodgers W, McEver RP. Cytoskeletal Regulation of CD44 Membrane Organization and Interactions with E-selectin. *J Biol Chem.* 2014; 289(51):35159-71
352. Kim SA, Inamura K, Yamauchi M, Nishihara R, Mima K, Sukawa Y, Li T, Yasunari M, Morikawa T, Fitzgerald KC, Fuchs CS, Wu K, Chan AT, Zhang X, Ogino S, Qian ZR. Loss of CDH1 (E-cadherin) expression is associated with infiltrative tumour growth and lymph node metastasis. *Br J Cancer.* 2016 Jan 19; 114(2):199-206.
353. Loh CY, Chai JY, Tang TF, Wong WF, Sethi G, Shanmugam MK, Chong PP, Looi CY. The E-Cadherin and N-Cadherin Switch in Epithelial-to-Mesenchymal Transition: Signaling, Therapeutic Implications, and Challenges. *Cells.* 2019 Sep 20;8(10):1118
354. Hu L, Li HL, Li WF, Chen JM, Yang JT, Gu JJ, Xin L. Clinical significance of expression of proliferating cell nuclear antigen and E-cadherin in gastric carcinoma. *World J Gastroenterol.* 2017 May 28; 23(20):3721-3729.
355. Li Z, Yin S, Zhang L, Liu W, Chen B. Prognostic value of reduced E-cadherin expression in breast cancer: a meta-analysis. *Oncotarget.* 2017; 8:16445-16455
356. Ziaran S, Harsanyi S, Bevizova K, Varchulova Novakova Z, Trebaticky B, Bujdak P, Galbavy S, Danisovic L. Expression of E-cadherin, Ki-67, and p53 in urinary bladder cancer in relation to progression, survival, and recurrence. *Eur J Histochem.* 2020 Mar 26; 64(2):3098.
357. Abdallah RA, Abdou AG, Abdelwahed M, Ali H. Immunohistochemical Expression of E- and N-Cadherin in Nodular Prostatic Hyperplasia and Prostatic Carcinoma. *J Microsc Ultrastruct.* 2019; 7(1):19-27.
358. Gkogkou P, Peponi E, Ntaskagiannis D, Murray S, Demou A, Sainis I, Ioakeim E, Briasoulis E, Tsekeris P. E-Cadherin and Syndecan-1 Expression in Patients With Advanced Non-small Cell Lung Cancer Treated With Chemoradiotherapy. *In Vivo.* 2020 Jan-Feb; 34(1):453-459.
359. Zhang X, Zhang Z, Chen S, Jiang J, Qi R, Mi X, Zhang X, Xi Y, Zheng H, Hua B. Prognostic significance of E-cadherin expression in prostatic carcinoma: A protocol for systematic review and meta-analysis. *Medicine (Baltimore).* 2020 Apr; 99(15):e19707
360. Geißler AL, Geißler M, Kottmann D, Lutz L, Fichter CD, Fritsch R, Weddeling B, Makowiec F, Werner M, Lassmann S. ATM mutations and E-cadherin expression define sensitivity to EGFR-targeted therapy in colorectal cancer. *Oncotarget.* 2017 Mar 7; 8(10):17164-17190.
361. Tang MKS, Yue PYK, Ip PP, Huang RL, Lai HC, Cheung ANY, Tse KY, Ngan HYS, Wong AST. Soluble E-cadherin promotes tumor angiogenesis and localizes to exosome surface. *Nat*

Commun. 2018 Jun 11; 9(1):2270

362. Bendardaf R, El-Serafi A, Syrjänen K, Collan Y, Pyrhönen S. The effect of vascular endothelial growth factor-1 expression on survival of advanced colorectal cancer patients. *Libyan J Med*. 2017 Dec; 12(1):1290741.
363. Melegh Z, Oltean S. Targeting Angiogenesis in Prostate Cancer. *Int J Mol Sci*. 2019 May 31; 20(11):2676.
364. Canavese M, Ngo DT, Maddern GJ, Hardingham JE, Price TJ, Hauben E. Biology and therapeutic implications of VEGF-A splice isoforms and single-nucleotide polymorphisms in colorectal cancer. *Int J Cancer*. 2017 May 15; 140(10):2183-2191.
365. Nogués A, Gallardo-Vara E, Zafra MP, Mate P, Marijuan JL, Alonso A, Botella LM, Prieto MI. Endoglin (CD105) and VEGF as potential angiogenic and dissemination markers for colorectal cancer. *World J Surg Oncol*. 2020 May 20; 18(1):99.
366. Hashim AF, Al-Janabi AA, Mahdi LH, Al-Toriahi KM, Yasseen AA. Vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor expression correlates with histologic grade and stage of colorectal cancer. *Libyan J Med*. 2010 Apr 8; 5. doi: 10.340
367. Li X, Zhu X, Wang Y, Wang R, Wang L, Zhu ML, Zheng L. Prognostic value and association of Lauren classification with VEGF and VEGFR-2 expression in gastric cancer. *Oncol Lett*. 2019 Nov; 18(5):4891-4899.
368. Nandi J, Maiti M, Dr. Barman N, Dr. Paul M, Medda S, Prof. Sushil Ranjan Ghosal SR, Sarkar R. Correlation of VEGF expression with prognostic factors of breast carcinoma. *Bangladesh Journal of Medical Science* 2019, 18 (3): 513-518
369. Lu Y, Jiang S, Zhang J, Song H, Li L. Estradiol activates MAPK signaling pathway by estrogen induced VEGF and bFGF in endometrial cancer cells. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi*. 2014; 49(12):925-31.
370. Xie Q, Cheng Z, Chen X, Lobe CG, Liu J. The role of Notch signalling in ovarian angiogenesis. *J Ovarian Res*. 2017 Mar 11; 10(1):13.
371. Zhao Y, Adjei AA. Targeting Angiogenesis in Cancer Therapy: Moving Beyond Vascular Endothelial Growth Factor. *Oncologist*. 2015 Jun; 20(6):660-73.
372. Kristensen TB, Knutsson ML, Wehland M, et al. Anti-vascular endothelial growth factor therapy in breast cancer. *Int J Mol Sci*. 2014; 15:23024–23041
373. Nassiri F., Cusimano M.D., Scheithauer B.W., Rotondo F., Fazio A., Yousef G.M., Syro L.V., Kovacs K., Lloyd R.V. Endoglin (CD105): A review of its role in angiogenesis and tumor diagnosis, progression and therapy. *Anticancer Res*. 2011; 31:2283–2290.



374. Kasprzak A, Adamek A. Role of Endoglin (CD105) in the Progression of Hepatocellular Carcinoma and Anti-Angiogenic Therapy. *Int J Mol Sci.* 2018 Dec 5; 19(12):3887.
375. Gallardo-Vara E., Blanco F.J., Roqué M., Friedman S.L., Suzuki T., Botella L.M., Bernabeu C. Transcription factor KLF6 upregulates expression of metalloprotease MMP14 and subsequent release of soluble endoglin during vascular injury. *Angiogenesis.* 2016; 19:155–171
376. Kapur N.K., Morine K.J., Letarte M. Endoglin: A critical mediator of cardiovascular health. *Vasc. Health Risk Manag.* 2013; 9:195–206.
377. Des Guetz G, Uzzan B, Nicolas P, Cucherat M, Morere JF, Benamouzig R, Breau JL, Perret GY. Microvessel density and VEGF expression are prognostic factors in colorectal cancer. Meta-analysis of the literature. *Br J Cancer.* 2006 Jun 19; 94(12):1823-32
378. Deliu IC, Neagoe CD, Beznă M, Genunche-Dumitrescu AV, Toma SC, Ungureanu BS, Uscatu CD, Beznă MC, Lungulescu CV, Pădureanu V, Gheonea DI, Ciurea T, ForȚofoiu M. Correlations between endothelial cell markers CD31, CD34 and CD105 in colorectal carcinoma. *Rom J Morphol Embryol.* 2016; 57(3):1025-1030.
379. Rosen LS, Gordon MS, Robert F, Matei DE. Endoglin for targeted cancer treatment. *Curr Oncol Rep.* 2014; 16(2):365.
380. Saroufim A, Messai Y, Hasmim M, Rioux N, Iacovelli R, Verhoest G, Bensalah K, Patard JJ, Albiges L, Azzarone B, Escudier B, Chouaib S. Tumoral CD105 is a novel independent prognostic marker for prognosis in clear-cell renal cell carcinoma. *Br J Cancer.* 2014 Apr 2; 110(7):1778-84.
381. Matic SD, Rakocevic MS, Jovic TT, Todorovic MS, Vuckovic LM, Jancic SA, Knezevic MG. Clinical significance of microvessel density and proliferation in prostate cancer core biopsy. *J BUON.* 2017 May-Jun; 22(3):757-765.
382. Slomianka L. Basic quantitative morphological methods applied to the central nervous system. *J Comp Neurol.* 2021; 529(4):694-756
383. Kanczuga-Koda L, Wincewicz A, Fudala A, Abrycki T, Famulski W, Baltaziak M, Sulkowski S, Koda M. E-cadherin and  $\beta$ -catenin adhesion proteins correlate positively with connexins in colorectal cancer. *Oncol Lett.* 2014; 7(6):1863-1870).
384. Fleming M, Ravula S, Tatishchev SF, Wang HL. Colorectal carcinoma: Pathologic aspects. *J Gastrointest Oncol.* 2012 Sep; 3(3):153-73
385. Phipps AI, Limburg PJ, Baron JA, Burnett-Hartman AN, Weisenberger DJ, Laird PW, et al. Association between molecular subtypes of colorectal cancer and patient survival. *Gastroenterology.* 2015;148(1):77-87.
386. Bishehsari F, Mahdavinia M, Vacca M, Malekzadeh R, Mariani-Costantini R. Epidemiological transition of colorectal cancer in developing countries: environmental factors, molecular pathways,

and opportunities for prevention. *World J Gastroenterol.* 2014; 20(20):6055-72.

387. Ye P, Cai P, Xie J, Zhang J. Reliability of digital PCR in detecting KRAS mutation in colorectal cancer using plasma sample: A systematic review and meta-analysis. *Medicine (Baltimore).* 2020 Jul 10; 99(28):e21171

388. Milosevic VS, Vukmirovic FC, Krstic MS, Zindovic MM, Lj Stojanovic D, Jancic SA. Involvement of leptin receptors expression in proliferation and neoangiogenesis in colorectal carcinoma. *J BUON.* 2015 Jan-Feb;20(1):100-8. PMID: 25778303

389. Li LT, Jiang G, Chen Q and Zheng JN. Ki67 is a promising molecular target in the diagnosis of cancer (Review). *Molecular Medicine Reports,* 2015,11: 1566-1572

390. Foltyn W, Zajęcki W, Marek B, Kajdaniuk D, Siemińska L, Zemczak A, Kos-Kudła B. The value of the Ki-67 proliferation marker as a prognostic factor in gastroenteropancreatic neuroendocrine tumours. *Endokrynol Pol.* 2012; 63(5):362-6.

391. Melling N, Kowitz CM, Simon R, Bokemeyer C, Terracciano L, Sauter G, Izbicki JR, Marx AH. High Ki67 expression is an independent good prognostic marker in colorectal cancer. *J Clin Pathol.* 2016 Mar;69(3):209-14

392. Palaghia M, Mihai C, Lozneau L, Ciobanu D, Trofin AM, Rotariu A, Târcoveanu F, Cijevschi Prelipcean C. E-cadherin expression in primary colorectal cancer and metastatic lymph nodes. *Rom J Morphol Embryol.* 2016; 57(1):205-9.

393. Pittman AM, Twiss P, Broderick P, et al. The CDH1-160C>A polymorphism is a risk factor for colorectal cancer. *Int J Cancer.* 2009; 125(7):1622-1625.

394. Bustos-Carpinteyro AR, Oliveira C, Sousa A, et al. CDH1 somatic alterations in Mexican patients with diffuse and mixed sporadic gastric cancer. *BMC Cancer.* 2019 Jan;19(1):69.

395. Berx G, Clenton- Jansen AM, Nollet F, de Leeuw WJ, van de Vijver M, Cornelisse C, i sur. E-cadherin is a tumour/invasion suppressor gene mutated in human lobular breast cancers. *EMBO J.* 1995; 14(24): 5907–25.

396. Saad RS, Liu YL, Nathan G, Celebrezze J, Medich D, Silverman JF. Endoglin (CD105) and vascular endothelial growth factor as prognostic markers in colorectal cancer. *Mod Pathol.* 2004; 17(2):197-203.

397. Vuletic MS, Milosevic VS, Jancic SA, Zujovic JT, Krstic MS, Vukmirovic FC: Clinical significance of Leptin receptor (LEPR) and Endoglin (CD105) expressions in colorectal adenocarcinoma. *J BUON* 2019; 24(6):2448-2457

398. Weidner N. Intratumor Microvessel density as a Prognostic Factor in Cancer. *Am J Pathol,* 1995; 147 (1):9-17

399. Giatromanolaki A, Koukourakis MI, Sivridis E, O'Byrne K, Gatter KC, Harris AL. 'Invading edge vs. inner' (edvin) patterns of vascularization: an interplay between angiogenic and vascular survival factors defines the clinical behaviour of non-small cell lung cancer. *J Pathol.* 2000; 192(2):140-9
400. Lin MX, Wen ZF, Feng ZY, He D, Chin J: Expression and significance of Bmi-1 and Ki67 in colorectal carcinoma tissues. *Chinese Journal of Cancer*, 2008; 27:12, 568-573
401. El Otmani I, El Agy F, El Baradai S, Bouguenouch L, Lahmidani N et al. Analysis of Molecular Pretreated Tumor Profiles as Predictive Biomarkers of Therapeutic Response and Survival Outcomes after Neoadjuvant Therapy for Rectal Cancer in Moroccan Population. *Dis Markers.* 2020:8459303.
402. Lazăr D, Tăban S, Sporea I, Dema A, Cornianu M, Lazăr E, Goldiș A, Vernic C. Ki-67 expression in gastric cancer. Results from a prospective study with long-term follow-up. *Rom J Morphol Embryol.* 2010; 51(4):655-61.
403. Tong G, Zhang G, Liu J, et al. Cutoff of 25% for Ki67 expression is a good classification tool for prognosis in colorectal cancer in the AJCC8 stratification. *Oncol Rep.* 2020; 43(4):1187-1198.
404. Li P, Xiao ZT, Braciak TA, Ou QJ, Chen G, Oduncu FS. Association between Ki67 Index and Clinicopathological Features in Colorectal Cancer. *Oncol Res Treat.* 2016; 39(11):696-702
405. Elzagheid A, Buhmeida A, Laato M, El Fattori O, Syrjänen K, Collan Y, Pyrhönen S. Loss of E-cadherin expression predicts disease recurrence and shorter survival in colorectal carcinoma. *APMIS* 2012; 120: 539–48.
406. Martins SF, Garsia EA, Mendes-Luz MA, Pardal F, Rodrigues M and Adhemar Filho AL: Clinicopathological Correlation and Prognostic Significance of VEGF-A, VEGF-C, VEGFR-2 and VEGFR-3 Expression in Colorectal Cancer. *Cancer Genomics & Proteomics* March 2013, 10 (2) 55-67
407. Bădulescu F, Mihai GM, Bădulescu A, Prejbeanu I: Histoprognostic markers role in colorectal cancer. *Rom J Morphol Embryol.* 2016; 57(2):445-50.
408. Gao M, Zhang X, Li D, He P, Tian W, Zeng B. Expression analysis and clinical significance of eIF4E, VEGF-C, E-cadherin and MMP-2 in colorectal adenocarcinoma. *Oncotarget.* 2016 Dec 20; 7(51):85502-85514.
409. Li XF, Liu XF, Yang YY, Liu AY, Zhang MY, Bai XF, Gao H, Guo XG. Correlation study of Bcl-2, B7-H1, EGFR, VEGF and colorectal cancer. *Am J Cancer Res.* 2015 Jun 15; 5(7):2277-84.
410. Dass SD, Cheah PL, Ong DB, Teoh KH, Looi LM. Malays J: E-cadherin downregulation at the infiltrating tumour front is associated with histological grade and stage in colorectal carcinoma of Malaysians. *Pathol.* 2015 Apr; 37(1):19-24.
411. Jiang HH, Zhang ZY, Wang XY, Tang X, Liu HL, Wang AL, Li HG, Tang EJ, Lin MB.

Prognostic significance of lymphovascular invasion in colorectal cancer and its association with genomic alterations *World J Gastroenterol.* 2019 May 28; 25(20):2489-2502.

412. Knijn N, Mogk SC, Teerenstra S, Simmer F, Nagtegaal LD: Perineural invasion is a strong prognostic factor in colorectal cancer – a systematic review *American Journal of Surgical Pathology*, 2016; 40(1):103-1

413. Ghiță C, Vîlcea ID, Dumitrescu M, Vîlcea AM, Mirea CS, Așchie M, Vasilescu F. The prognostic value of the immunohistochemical aspects of tumor suppressor genes p53, bcl-2, PTEN and nuclear proliferative antigen Ki-67 in resected colorectal carcinoma. *Rom J Morphol Embryol.* 2012; 53(3):549-56.

414. Zhou Y, Wang H, Gong H, et al. Clinical significance of perineural invasion in stages II and III colorectal cancer. *Pathol Res Pract* 2015; 211:839–44

415. Yim K, Won DD, Lee IK, Oh ST, Jung ES, Lee SH. Novel predictors for lymph node metastasis in submucosal invasive colorectal carcinoma. *World J Gastroenterol.* 2017 Aug 28;23(32):5936-5944

416. Bhattacharya R, Ye XC, Wang R, Ling X, McManus M, Fan F, Boulbes D, Ellis LM. Intracrine VEGF Signaling Mediates the Activity of Prosurvival Pathways in Human Colorectal Cancer Cells. *Cancer Res.* 2016 May 15;76(10):3014-24.

417. Zhu B, Zhou L, Yu L, Wu S, Song W, Gong X, Wang D. Evaluation of the correlation of vasculogenic mimicry, ALDH1, KAI1 and microvessel density in the prediction of metastasis and prognosis in colorectal carcinoma. *BMC Surg.* 2017 Apr 21; 17(1):47.

418. Li Q, Wang D, Li J, Chen P. Clinicopathological and prognostic significance of HER-2/neu and VEGF expression in colon carcinomas. *BMC Cancer.* 2011 Jun 27; 11:277.

419. Sulzyc-Bielicka V, Kołodziejczyk L, Jaczewska S, Bielicki D, Safranow K, Bielicki P, Kładny J, Rogowski W. Colorectal cancer and *Cryptosporidium* spp. infection. *PLoS One.* 2018 Apr 19; 13(4):e0195834.

420. Zheng S, Han MY, Xiao ZX, Peng JP, Dong Q. Clinical significance of vascular endothelial growth factor expression and neovascularization in colorectal carcinoma. *World J. Gastroenterol.* 2003 Jun;9(6):1227-30.

421. Strieth S, Hartschuh W, Pilz L and Fusenig NE: Angiogenic switch occurs late in squamous cell carcinomas of human skin. *British Journal of Cancer* 2000, 82(3): 591-600.

422. Chen J, Chen S, Zhuo L, Zhu Y, Zheng H. Regulation of cancer stem cell properties, angiogenesis, and vasculogenic mimicry by miR-450a-5p/SOX2 axis in colorectal cancer. *Cell Death Dis.* 2020 Mar 6;11(3):173. doi: 10.1038/s41419-020-2361-z.

423. Kirschmann, DA, Seftor, EA, Hardy, KM. Molecular pathways: vasculogenic mimicry in tumor cells: diagnostic and therapeutic implications. *Clin Cancer Res* 2012; 18(10): 2726–2732.

424. Jinjun W, Zhaowei W, Qiang L, Zhijun X, Juanzi Z, Lin L, Guixi J. sFLT-1 inhibits proliferation, migration, and invasion of colorectal cancer SW480 cells through vascular mimicry formation suppression. *Tumour Biol.* 2017 May; 39(5):1010428317698339.
425. Sharada P, Swaminathan U, Nagamalini BR, Kumar KV, Ashwini BK, Lavanya V. Coalition of E-cadherin and vascular endothelial growth factor expression in predicting malignant transformation in common oral potentially malignant disorders. *J Oral Maxillofac Pathol.* 2018 Jan-Apr; 22(1):40-47.
426. Luo X, Dai Y, Cao Y: Expression of Stathmin and vascular endothelial growth factor C in esophageal cancer and their combined diagnostic value. *J. BUON*, 2019, 24(6):2523-2530
427. Zhang X, Wu Z, Peng Y, Li D, Jiang Y, Pan F, Li Y, Lai Y, Cui Z, Zhang K. Correlation between Ki67, VEGF, and p53 and Hepatocellular Carcinoma Recurrence in Liver Transplant Patients. *Biomed Res Int.* 2021:6651397.
428. Allen MM, Douds JJ, Liang SX, Desouki MM, Parkash V, Fadare O. An immunohistochemical analysis of stathmin1 expression in uterine smooth muscle tumors: differential expression in leiomyosarcomas and leiomyomas. *Int J Clin Exp Pathol.* 2015; 8(3):2795-801.
429. Li W, Zhang G, Wang HL, Wang L Analysis of expression of cyclin E, p27kip1 and Ki67 protein in colorectal cancer tissues and its value for diagnosis, treatment and prognosis of disease. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2016; 20(23):4874-4879.
430. Onyango CG, Ogonda L, Guyah B, Shiluli C, Ganda G, Orang'o OE, Patel K. Novel biomarkers with promising benefits for diagnosis of cervical neoplasia: a systematic review *Infect Agent Cancer.* 2020; 15(1):68.
431. Glaros A.G, Kline RB: Understanding the accuracy of tests with cutting scores: the sensitivity, specificity, and predictive value model. *Clinical Psychology* 1988,44:1013-1023
432. Zhang Z. Variable selection with stepwise and best subset approaches. *Ann Transl Med.* 2016; 4(7):136.

## Biografija autora

Janko T. Žujović je rođen 02.12.1979. godine u Bijelom Polju, gdje je završio osnovnu školu i Gimnaziju. Dobitnik je diplome Luča i za osnovnu i srednju školu.

Medicinski fakultet, Univerziteta u Beogradu je završio u junu 2007. godine.

Ljekarski staž je obavio na Vojno Medicinskoj Akademiji u Beogradu. Po završetku ljekarskog staža je volontirao na Klinici za hirurgiju Vojno Medicinske Akademije u Beogradu, do avgusta 2008. godine.

Doktorske akademske studije upisao je školske 2014/2015 godine na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Nišu.

Radni odnos je zasnovao 2008. godine u Zavodu za Hitnu medicinsku pomoć - Podgorica, a od 2009. godine, zapošljen je na Hirurškoj klinici – Centar za digestivnu hirurgiju Kliničkog Centra Crne Gore kao klinički ljekar. Od 2012. godine započeo je specijalistički staž iz Opšte hirurgije, koji je predviđenim programom o specijalizaciji završio polaganjem specijalističkog ispita sa odličnim uspjehom, te od 2017. godine radi kao specijalista opšte hirurgije.

Uspješno je učestvovao na brojnim stručnim seminarima, radionicama i kongresima.

Član je Ljekarske komore Crne Gore.

Služi se engleskim jezikom, posjeduje potrebno računarske vještine.

Oženjen je, otac dva djeteta.

## Изјава 1.

### ИЗЈАВА О АУТОРСТВУ

Изјављујем да је докторска дисертација, под насловом:

#### **Клинички значај експресије атхезионих молекула, Stathmina1 и неоваскуларизације у колоректалном аденокарциному**

која је одбрањена на Медицинском факултету Универзитета у Нишу:

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да ову дисертацију, ни у целини, нити у деловима, нисам пријављивао/ла на другим факултетима, нити универзитетима;
- да нисам повредио/ла ауторска права, нити злоупотребио/ла интелектуалну својину других лица.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци, који су у вези са ауторством и добијањем академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада, и то у каталогу Библиотеке, Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Нишу, као и у публикацијама Универзитета у Нишу.

У Нишу,

Потпис аутора дисертације:



Јанко Т. Жујовић

**Изјава 2.**

**ИЗЈАВА О ИСТОВЕТНОСТИ ЕЛЕКТРОНСКОГ И ШТАМПАНОГ ОБЛИКА ДОКТОРСKE  
ДИСЕРТАЦИЈЕ**

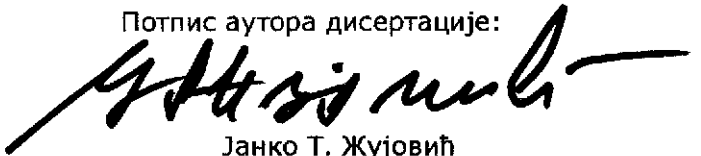
Наслов дисертације:

**Клинички значај експресије атхезионих молекула, *Stathmin1* и  
неоваскуларизације у колоректалном аденокарциному.**

Изјављујем да је електронски облик моје докторске дисертације, коју сам  
предао/ла за уношење у **Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу**, истоветан  
штампаном облику.

У Нишу,

Потпис аутора дисертације:



Јанко Т. Жујовић



### Изјава 3:

#### ИЗЈАВА О КОРИШЋЕЊУ

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Никола Тесла“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу унесе моју докторску дисертацију, под насловом:

#### **Клинички значај експресије атхезионих молекула, *Stathmina1* и неоваскуларизације у колоректалном аденокарциному.**

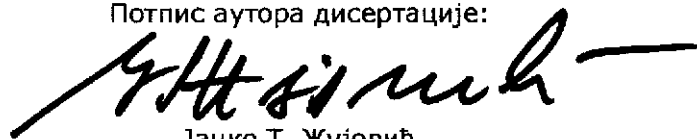
Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском облику, погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију, унету у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу, могу користити сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons), за коју сам се одлучио/ла.

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

У Нишу,

Потпис аутора дисертације:



Јанко Т. Жујовић

---

<sup>1</sup> Аутор дисертације обавезан је да изабере и означи (заокружи) само једну од шест понуђених лиценци; опис лиценци дат је у наставку текста.

