



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ

ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА

Бранислава Г. Ранковић

**ЗНАЧАЈ ЕПИТЕЛНО-МЕЗЕНХИМАЛНЕ ТРАНЗИЦИЈЕ У
КОЛОРЕКТАЛНОЈ КАРЦИНОГЕНЕЗИ**

докторска дисертација

Крагујевац, 2021.



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА

Бранислава Г. Ранковић

**ЗНАЧАЈ ЕПИТЕЛНО-МЕЗЕНХИМАЛНЕ ТРАНЗИЦИЈЕ У
КОЛОРЕКТАЛНОЈ КАРЦИНОГЕНЕЗИ**

докторска дисертација

Крагујевац, 2021.



UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC
FACULTY OF MEDICAL SCIENCES

Branislava G. Ranković

**SIGNIFICANCE OF EPITHELIAL-MESENCHYMAL
TRANSITION IN COLORECTAL CANCEROGENESIS**

Doctoral Dissertation

Kragujevac, 2021

| |
|---|
| I Аутор |
| Име и презиме: Бранислава Ранковић |
| Датум и место рођења: 13.6.1980. године, у Нишу |
| Садашње запошљење: Медицински факултет, Универзитет у Љубљани |
| II Докторска дисертација |
| Наслов: Значај епително-мезенхималне транзиције у колоректалној карциногези |
| Број страница: 77 |
| Број слика: 24 слика, 2 табеле |
| Број библиографских података: 108 |
| Установа и место где је рад израђен: Медицински факултет, Универзитет у Љубљани |
| Научна област (УДК): Патологија |
| Ментор: проф. др Нина Зидар, професор медицинског факултета, Универзитет у Љубљани |
| Коментор: др Ема Боштјанчич. |
| III Оцена и одбрана |
| Датум пријаве тезе: 10.11. 2017 године |
| Број одлуке и датум прихватања теме докторске/уметничке дисертације: 05-4605/2, 19. 04. 2018 године |
| Комисија за оцену научне заснованости теме и испуњености услова кандидата: |
| Проф. др Мирко Росић, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Физиологија |
| Проф. др Милан Кнежевић, редовни професор - у пензији Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Патолошка анатомија |

Проф. Др Миљан Крстић, ванредни професор Медицинског факултета Универзитета у Нишу за ужу научну област Патологија

Комисија за оцену и одбрану докторске/уметничке дисертације:

Проф. др Мирко Росић, редовни професор Факултета медицинских наука
Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Физиологија

Доц. др Александар Цветковић, доцент факултета медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу, за ужу научну област Хирургија

Проф. Др Миљан Крстић, ванредни професор Медицинског факултета Универзитета у Нишу за ужу научну област Патологија

Датум одбране дисертације:

Захваљујем се

Првенствено мом сину Алекси, мојим родитељима Јасмини и Горану, сестри Горани и мојим сестрићима Стефану и Филипу, јер њихова љубав и подршка су вечити ослонац у мом животу.

Велико хвала мојој менторици проф др Нини Зидар и коменторици др Еми Боштјанчич, на труду, знању и времену које су уложиле помажући ми током израде дисертације.

Мојим колегиницама Јери, Ники, Звезди које су биле велика морална подршка.

Хвала Маргарети. Хвала Матији и хвала свим дивним људима који су били уз мене.

Докторску дисертацију посвећујем свом сину!

Бранислава Ранковић, октобар 2021.

САЖЕТАК

Развој колоректалног карцинома (CRC) је подељен је у неколико фаза, од нормалне слузнице до аденома и инвазивног карцинома. У рутинском дијагностичком раду од изузетног је значаја тачна дијагноза колоректалног аденома, аденома са псеудоинвазијом и CRC, што омогућава избор оптималног третмана. Ендоскопско уклањање је избор лечења аденома и аденома са псеудоинвазијом, јер ове лезије не дају метастазе и није потребан додатни хируршки третман. Супротно томе, CRC, укључујући ране стадијуме (малигни аденоми), могу метастазирати, зато је од значаја поставити тачну дијагнозу и проценити ризик за прогрес болести и по потреби додатно лечити ове пацијенте- ресекција дебелог црева. Упркос прецизном микроскопском истраживању хистолошких препарата, није увек могуће разликовати различите лезије.

Епително-мезенхимална транзиција (EMT) се појавила као могући механизам у развоју CRC-а, али информације о EMT-у, нарочито у раним фазама развоја CRC-а, су оскудне. Претходне студије су показале да су неке микро RNK (нпр. miR-141, miR-200a / b / c и miR-429) добри маркери EMT-а.

Наша студија је обухватила узорке 62 пацијента (10 аденома и 30 случајева CRC са одговарајућом нормалном слузницом, 10 малигну аденома и 12 аденома са псеудоинвазијом). Експресија miR-141, miR-200a / b / c и miR-429 и њихових циљних гена (CDKN1B, ONECUT2, PTPN13, RND3, SOX2, TGFB2 и ZEB2) анализирана је помоћу квантитативне PCR у реалном времену. Експресија Е-кадхерина анализирана је применом имунохистохемије.

Све miRNK су снижени и њихови циљни гени су показали супротну експресију у CRC у поређењу са аденомом. Примећена је снижена регулација породице miR-200 на инвазивном фронту у поређењу са централним делом тумора, као и корелација експресије miR200b, CDKN1B, ONECUT2 и ZEB2 са нодалним метастазама. Изражавање породице miR-200 и SOX2 такође је у корелацији са резултатом имунохистохемијског бојења на Е-кадхерин. Поред тога, примећена је и снижена регулација породице miR-200 и PTPN13, као и повећана регулација CDKN1B у раном карциному у поређењу са аденомима и аденомима са псеудоинвазијом.

Ови резултати сугеришу да породица miR-200 и њихови циљни гени доприносе прогресији аденома у CRC, инвазивним својствима и развоју метастаза. Наши резултати снажно подржавају претпостављене хипотезе о делимичном EMT и унутартуморској хетерогености током CRC канцерогенезе.

Кључне речи: колоректални аденом, колоректални карцином, аденом са псеудоинвазијом, метастазе, хетерогеност унутар тумора, епително-мезенхимна транзиција, породица miR-200, циљни гени.

ABSTRACT

The development of colorectal carcinoma (CRC) is divided in several stages, from normal mucosa to adenoma and invasive carcinoma. In routine diagnostic work, the correct diagnosis of colorectal adenoma, adenoma with epithelial misplacement and CRC is of utmost importance, enabling to choose the optimal treatment. Endoscopic removal is the treatment of choice for adenomas and adenomas with epithelial misplacement, since these lesions do not metastasize and additional surgical treatment is not necessary. In contrast, CRC including early stages (malignant adenomas) are capable to metastasize. It is important to make the correct diagnosis and to evaluate the risk for metastases and additionally treat these patients with surgical removal of the colon if needed. Despite meticulous microscopic investigation of histological slides, it is not always possible to distinguish between various lesions.

Epithelial-mesenchymal transition (EMT) has emerged as a possible mechanism in the development of CRC, but the information on EMT particularly in early stages of CRC development is missing. Previous studies have demonstrated some micro RNAs (*e.g.*, *miR-141*, *miR-200a/b/c* and *miR-429*) to be good markers of EMT.

Our study included formalin-fixed paraffin-embedded biopsy samples of 62 patients (10 adenomas and 30 cases of CRC with corresponding normal mucosa, 10 malignant adenomas, and 12 adenomas with pseudoinvasion). Expression of *miR-141*, *miR-200a/b/c* and *miR-429* and their target genes (*CDKN1B*, *ONECUT2*, *PTPN13*, *RND3*, *SOX2*, *TGFB2* and *ZEB2*) was analysed using quantitative real-time PCR. Expression of E-cadherin was analysed using immunohistochemistry.

All miRNAs were down-regulated and their target genes showed the opposite expression in CRC compared to adenoma. Down-regulation of the *miR-200* family at the invasive front in comparison to the central part of tumour was observed as well as a correlation of expression of the *miR200b*, *CDKN1B*, *ONECUT2* and *ZEB2* to nodal metastases. Expression of the *miR-200* family and *SOX2* also correlated with E-cadherin staining. In addition, down-regulation of the *miR-200* family and *PTPN13* and upregulation of *CDKN1B* in early carcinoma compared to adenomas and adenomas with epithelial misplacement was observed.

These results suggest that the *miR-200* family and their target genes contribute to progression of adenoma to CRC, invasive properties and development of metastases. Our results strongly support the postulated hypotheses of partial EMT and intra-tumour heterogeneity during CRC cancerogenesis.

Keywords: colorectal adenoma, colorectal carcinoma, adenoma with epithelial misplacement, metastases, intra-tumour heterogeneity, epithelial-mesenchymal transition, *miR-200* family, target genes 4

Садржај

| | | |
|-----|--|----|
| 1 | Колоректални аденокарцином | 12 |
| 1.1 | Канцерогенеза..... | 12 |
| 1.2 | Хистопатологија колоректалног карцинома..... | 13 |
| 1.3 | Аденом са псеудоинвазијом..... | 15 |
| 1.4 | Дијагностички и прогностички маркери..... | 16 |
| 1.5 | Серозна инвазија у колоректалном карциному..... | 18 |
| 1.6 | Епително-мезенхимална транзиција | 19 |
| 1.7 | Хетерогеност тумора | 20 |
| 2 | микро-RNK | 20 |
| 2.1 | Геномска организација | 20 |
| 2.2 | Биогенеза микро-RNK | 21 |
| 2.3 | Механизам микро-RNK..... | 21 |
| 2.4 | Резултати функције микро-RNK..... | 22 |
| 2.5 | Биолошка функција микро-RNK | 22 |
| 2.6 | Биолошка улога микро-RNK у карциному | 23 |
| 2.7 | Значај микро-RNK као потенцијалних биомаркера за рано откривање пренеопластичних лезија..... | 23 |
| 2.8 | Корисност miRNK као потенцијалних биомаркера | 24 |
| 2.9 | Двострука улога микро-RNK – гена за сузбијање тумора и онкогена | 24 |

| | | |
|------|--|----|
| 3 | Циљ истраживања | 26 |
| 4 | Хипотезе..... | 27 |
| 5 | Материјали и методе..... | 28 |
| 5.1 | Имунохистохемија | 29 |
| 5.2 | Изолација RNK из узорака ткива фиксираних формалином | 30 |
| 5.3 | Изолација RNK из узорака ткива фиксираних формалином | 30 |
| 5.4 | Анализа експресије чланова породице miR-200 и miR-205 | 30 |
| 5.5 | Реверзна транскрипција..... | 31 |
| 5.6 | Квантитативни PRC у реалном времену | 31 |
| 5.7 | Анализа експресије циљних гена породице miR-200 | 31 |
| 5.8 | Реверзна транскрипција..... | 32 |
| 5.9 | Предамплификација и квантитативни PRC у реалном времену | 32 |
| 5.10 | Статистичка анализа експерименталних података | 32 |
| 6 | Резултати..... | 33 |
| 6.1 | Пацијенти и узорци ткива | 33 |
| 6.2 | Имунохистохемијска експресија бојења E-кадхерином..... | 33 |
| 6.3 | Неоткривена експресија маркера епително-мезенхималне транзиције | 35 |
| 6.4 | Експресија породице miR-200 и њених циљних гена у аденому у поређењу са њиховом експресијом у нормалној слузници дебелог црева | 35 |

| | | |
|------|--|----|
| 6.5 | Експресија miRNK и њихових циљних гена у аденому са псеудоинвазијом у поређењу са експресијом miRNK и њихових циљних гена у нормалној слузници..... | 37 |
| 6.6 | Експресија miRNK и њихових циљних гена у раном карциному (малигни аденом) у поређењу са експресијом miRNK и њихових циљних гена у нормалној слузници..... | 39 |
| 6.7 | Експресија породице miR-200 и њених циљних гена у карциному без нодалних метастаза у поређењу са експресијом породице miR-200 и њених циљних гена у нормалној слузници | 40 |
| 6.8 | Експресија породице miR-200 и њених циљних гена у карциному са нодалним метастазама у поређењу експресијом miR-200 и њених циљних гена у нормалној слузници..... | 42 |
| 6.9 | Експресија miRNK и њихових циљних гена у аденомима у поређењу са експресијом miRNK и њихових циљних гена у карциномима | 43 |
| 6.10 | Експресија miRNK и њихових циљних гена у аденому са псеудоинвазијом у поређењу са експресијом miRNK и њихових циљних гена у аденому и раном карциному | 45 |
| 6.11 | Експресија miRNK и њихових циљних гена у карциному са нодалним метастазама у поређењу са експресијом miRNK и њихових циљних гена у карциному без нодалних метастаза..... | 47 |
| 6.12 | Експресија породице miR-200 и њених циљних гена у карциному са серозном инвазијом и без серозне инвазије у поређењу са експресијом породице miR-200 и њених циљних гена у нормалној слузници | 48 |
| 6.13 | Експресија miRNK и њихових циљних гена у карциному са серозном инвазијом и карциному без серозне инвазије..... | 49 |
| 6.14 | Експресија E-кадхерина и његова корелација са експресијом miRNK и mRNK | 50 |
| 6.15 | Корелације између miRNK и њихових циљних гена у свим узорцима..... | 50 |

| | | |
|-----|---|----|
| 7 | Дискусија | 52 |
| 7.1 | Имунохистохемијска експресија Е-кадхерина | 53 |
| 7.2 | Одређени маркери ЕМТ-а су испод границе детекције..... | 54 |
| 7.3 | Породица miR-200 и њени циљни гени у аденому у поређењу са породицом miR-200 и њених циљних гена у нормалној слузници дебелог црева и карциному..... | 54 |
| 7.4 | Породица miR-200 и њени циљни гени у карциному са нодалним метастазама у поређењу са породицом miR-200 и њених циљних гена у карциному без нодалних метастаза | 57 |
| 7.5 | Аденом са псеудоинвазијом..... | 58 |
| 7.6 | Карцином са серозном инвазијом..... | 58 |
| 7.7 | Породица miR-200 и хетерогеност колоректалног аденокарцинома | 59 |
| 8 | Закључак | 61 |
| 9 | ЛИТЕРАТУРА..... | 62 |

1 Колоректални аденокарцином

Колоректални аденокарцином (CRC) је хетерогена група тумора која потиче из епитела дебелог црева. Представља више од 90% свих колоректалних малигних неоплазми. Са више од милион нових дијагностикованих случајева годишње, CRC је трећи најчешћи карциному свету и други најчешћи узрок смрти повезан са малигном неоплазмом (1). Инциденција расте са годинама и, према статистичким подацима, претпоставља се да и мушкарци и жене имају 4,3% ризика од развоја CRC-а (2). Иако постоје изузеци за појединце са генетском предиспозицијом и неким предиспонирајућим стањима (на пример упална болест црева; engl. IBD), ризик од појаве CRC-а пре 40. године прилично је низак.

Будући да се прогноза и терапија разликују од случаја до случаја и да углавном зависе од стадијума, дијагностиковање CRC-а у раној фази је кључно. Упркос чињеници да програми скрининга значајно побољшавају општи опстанак, морталитет је и даље висок, те CRC и даље представља оптерећење за глобално јавно здравље (2).

1.1 Канцерогенеза

Развој CRC-а је дугорочан и вишечлан процес. Велика већина CRC-а (70% – 80%) је спорадична. До сада није доказано да неки специфичан етиолошки фактор има значајан утицај на карциногенезу CRC-а, али постоје индикације о неколико аспеката који могу бити укључени, као на пример пушење, прехранбене навике, старост, физичка активност итд. У напредним фазама, CRC метастазира до регионалних лимфних чворова, јетре и других органа. Модел карциногенезе CRC-а представио је Волгестеин (engl. Vogelstein B.) (3). CRC развија се у неколико корака, од нормалне слузнице до аденома и, последично, до карцинома, као резултат мутационе активације онкогена, заједно са мутационом инактивацијом гена за сузбијање тумора. Акумулација бројних генетских мутација и епигенетских промена потребна је за покретање канцерогене прогресије кроз прогресивни функционални поремећај гена за супресију тумора и онкогена. На крају, то доводи до неконтролисане ћелијске пролиферације и поремећеног ћелијског циклуса. Стицање геномске нестабилности посебна је карактеристика туморигенезе, а у колоректалној карциногенези постоје три различита пута: хромозомска нестабилност или CIN, микросателитска нестабилност или MSI и Фенотип метилације острва CpG или CIMP; од који је CIN најчешћи (75% – 85%) (4 – 7). Као потенцијални механизам повезан са развојем и прогресијом CRC-а, такође се појавила епително-мезенхимална транзиција (EMT) (8, 9).

Према нашим сазнањима, постоје ограничени подаци о доприносу EMT-а у раним фазама развоја CRC-а.

Основни механизам хромозомске нестабилности или CIN-а није потпуно јасан, али су могући и начини промена броја и структуре хромозома и пратећих мутација

у генима супресорима тумора, посебно TP53 и у комплексу, који промовише анафазу (APC). Губитак функционалних мутација TP53, главног гена контролног пункта ћелијског циклуса, узрокује неконтролисан улазак у ћелијски циклус. APC је део сигналног пута VNT, а његова инактивација доводи до повећања нуклеарног CTNNB1 гена (10, 11).

Фенотип метилације острва CpG или CIMP повезан је са епигенетским променама које доводе до инактивације гена за сузбијање тумора или гена повезаних са тумором. CIMP позитиван CRC настаје код назубљених лезија прекурсора. Ови карциноми обично показују фенотип MSI, као и клиничке и патолошке карактеристике типичне за туморе са MSI (10).

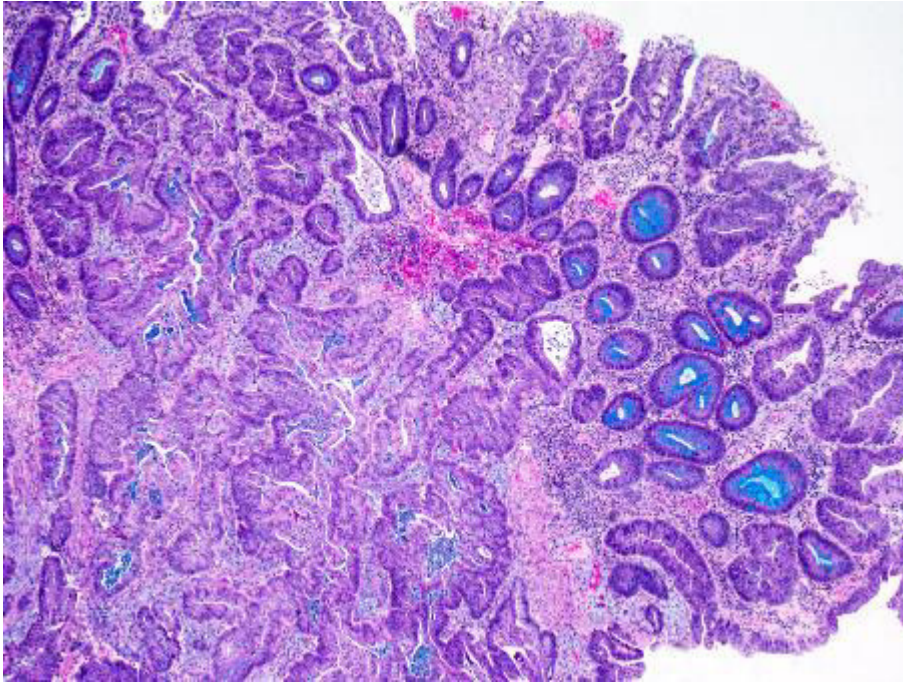
Микросателитска нестабилност или MSI резултат је инактивирања мутација у генима за поправку неусклађености DNK, који су одговорни за исправљање грешака репликације DNK. Постоји неколико протеина, на пример hMSH2, hMSH3, hMLH1, hPMS2, hPMS1 и hMLH3, који су важне компоненте система поправљања неусклађености DNK, а мутације приметне линије могу изазвати дисфункцију ових протеина, што може предиспонирати развој рака (9, 11). MSI налази се у 15 % CRC-а.

1.2 Хистопатологија колоректалног карцинома

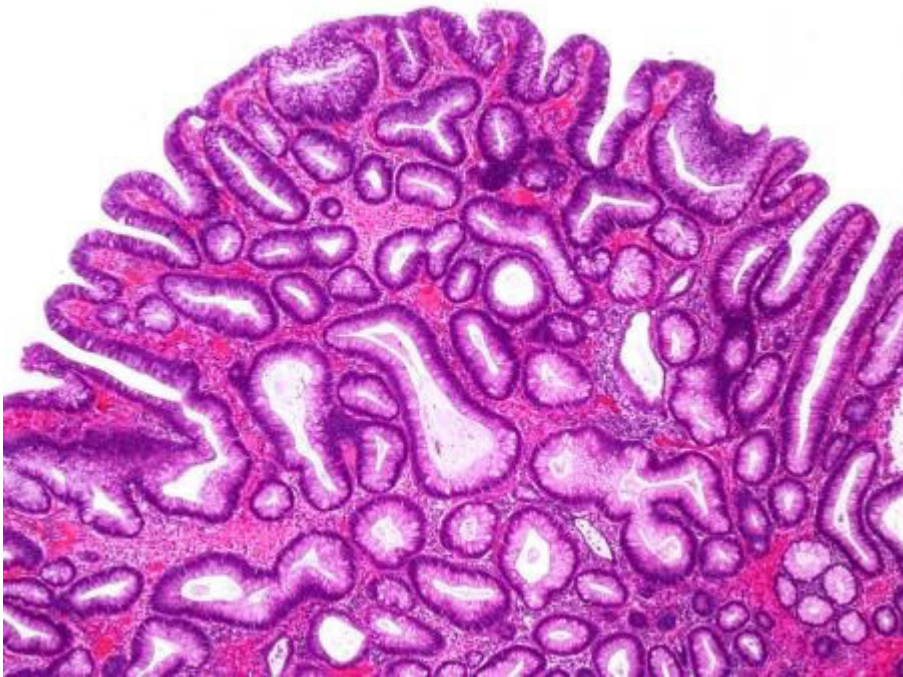
Поред класичног аденокарцинома, постоји и неколико различитих подтипова CRC-а, на пример муцинозни карцином, карцином печатних ћелија, аденокарцином са модуларним карактеристикама, плоски карцином, назубљени карцином и недиференцирани аденокарцином. Они се разликују не само по патоморфолошким карактеристикама, већ могу имати и различита молекуларна обележја (12). Минимални критеријум за дијагнозу инвазивног аденокарцинома је присуство диспластичних жлезда у субмукози (слика 1).

Већина CRC-а развија се из прекурсорске лезије – аденома, премалигних епителних пролиферација, које су састављене од умножених, разгранатих крипти дебелог црева и ресица, прекривених диспластичним епителом. У зависности од морфологије, већина аденома подељена је у три подтипа: тубулни (слика 2), вилусни и тубуло-вилусни аденоми (слика 3).

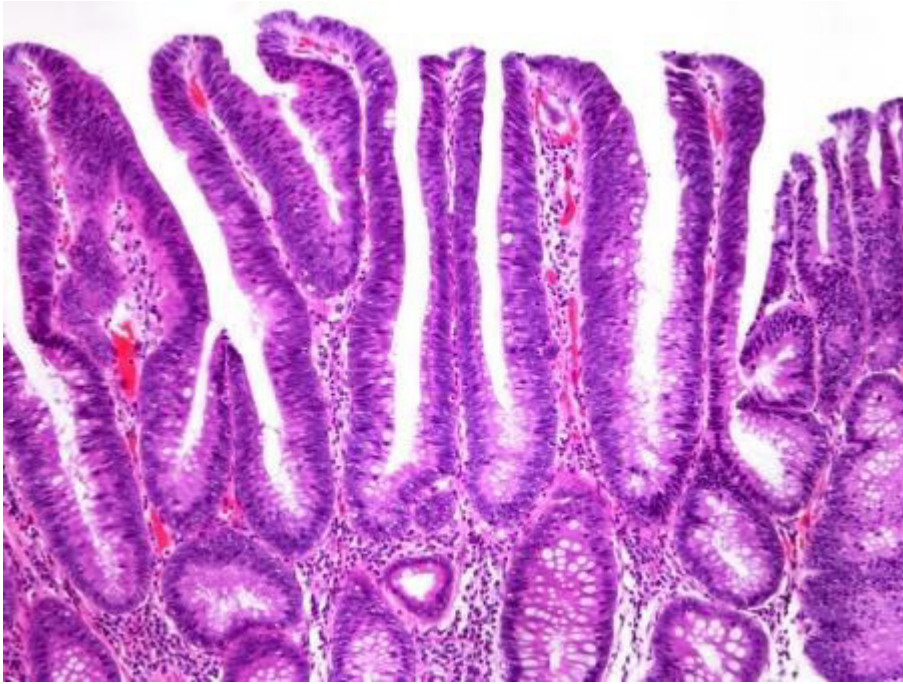
По дефиницији, аденоми показују различит степен дисплазије, који се заснива на цитологији и архитектури и оцењују се као ниски или високи степен.



Слика 1. Рани аденокарцином: у субмукози виде се неправилне диспластичне жлезде, праћене десмопластичном стромалном реакцијом.



Слика 2. Тубуларни аденом са дисплазијом ниског степена: полипоидна лезија састављена од благо неправилних, разгранатих крипти, које су прекривене псеудостратификованим епителом. Поларитет диспластичних ћелија и даље је очуван.



Слика 3. Тубуловилозни аденом са дисплазијом ниског степена сачињеном од ресица и разгранатих крипти, које су прекривене псеудостратификованим епителом. Поларитет диспластичних ћелија и даље је очуван.

Још један морфолошки пут у развоју CRC-а потиче од назубљених лезија, односно назубљених аденома, који су обично присутни на десној страни дебелог црева, са специфичним патоморфолошким карактеристикама, тј. са назубљеним површинама, изгледом зуба, гранањем базе, проширењем крипти и бочним растом уз мишићни слој (*muscularis propria*) мукозе.

1.3 Аденом са псеудоинвазијом

Врло необичан ентитет, који може дијагностички бити прилично изазован, је аденом са епителном псеудоинвазијом, који су први описали 1972. године Муто и сарадници (Muto T. et al) (13). Ова појава обично се види код великих педункулисаних полипа у сигмоидном дебелом цреву, али ретки случајеви могу се наћи и у другим деловима дебелог црева. Интралуминална траума и, у неким околностима, претходна биопсија обично играју улогу у њиховом развоју.



Слика 4. Аденом са псеудоинвазијом –диспластичне жлезде у субмукози окружене су танким слојем конективног ткива (*lamina propria*).

Са карактеристичним хистолошким појавама, у којима су диспластичне жлезде присутне у субмукози, аденом са псеудоинвазијом може личити на праву инвазију. За разлику од инвазивног CRC-а, који карактерише десмопластична стромална реакција, код аденома са псеудоинвазијом, диспластичне жлезде окружене су танким слојем конективног ткива (ламином прорпија) са таложењем хемосидерина. Друга значајна карактеристика је истоветност степена дисплазије и цитолошке карактеристике, обично исте као и оне присутне у површинском делу аденома.

Ове лезије обично су бенигне и немају метастатски потенцијал и стога их је кључно разликовати од CRC-а (13 – 16).

1.4 Дијагностички и прогностички маркери

У рутинском дијагностичком раду, тачна дијагноза аденома, аденома са епителном погрешном поставком (аденом са псеудоинвазијом) и CRC-а, од највећег је значаја, што клиничарима омогућава да изаберу оптимални третман. Упркос пажљивом микроскопском истраживању, није увек могуће направити разлику између различитих лезија, од којих су најизазовнији аденоми са погрешним постављањем епитела (аденом са псеудоинвазијом) и малигни аденоми. Док је ендоскопско уклањање третман избора за неинвазивне лезије, тренутни терапијски приступ за пацијенте са CRC-ом варира од радикалне ресекције дебелог црева са ресекцијом регионалних лимфних чворова, до комбинације хеморадиотерапије и операције у напредним фазама.

Један од најзначајнијих прогностичких и терапијских параметара је стадијум у време постављања дијагнозе. Систем ТНМ развио је Амерички заједнички комитет за рак (AJCC), како би био установљен на подацима заснованим на стадијуму система за одређивање рака, који пружа прецизно предвиђање исхода. Т категорија стејџинг система ТНМ-а подељена је на Т1, Т2, Т3 и Т4 у зависности од дубине инвазије тумора и проширења на суседне органе/структуре. Т3 лезије протежу се изван мишићног слоја (*muscularis propria*) у периколонско масно ткиво, а Т4 лезије продиру у серозу (Т4а) и/или шире се у суседне органе/структуре (Тb). Т4а CRC има најмање повољан исход, са највећом стопом метастаза. Васкуларна инвазија, метастазе у регионалним лимфним чворовима, захваћеност серозе и пупљење тумора (*engl. tumor budding*) сматрају се најзначајнијим прогностичким параметрима.

Поред утврђивања ТНМ-а, специфични маркери укључујући MSI, CRAS/NRAS/BRAF постали су веома важни и сада је готово незамисливо направити план терапије без њиховог дефинисања. У данашње време, постоји тенденција проналаска и примене нових биомаркера са потенцијалном дијагностичком и терапијском применом (17, 18).

Према Радној групи за дефиниције биомаркера (*engl. Biomarkers Definitions Working Group*), формална дефиниција биомаркера је туморска карактеристика која се може објективно мерити и оценити као индикатор(и) нормалних биолошких или патогених процеса или као фармаколошки одговори на терапијску интервенцију, који идентификују повећане или смањене ризика од штете за пацијенте или повећање и смањење користи терапије (19).

Биомаркер је термин који дефинише различите врсте објективних показатеља здравља или болести. Током историје, и у складу са људским технолошким напретком, ови показатељи постајали су све прецизнији и поузданији. Код CRC-а, већина применљивих биомаркера је прогностичка – пружа информације о вероватноћи стања, рецидиву или прогресији болести. Такође, ови биомаркери могу имати улогу и у предвиђању – пружање информација о вероватноћи одговора на специфичне третмане. Током последње две деценије, бројни молекуларни биомаркери за CRC опсежно су проучавани.

Постоји неколико стратегија скрининга за откривање CRC-а. Међутим, у недавно спроведеним студијама, такође је истакнуто то да овим стратегијама обично недостаје одговарајућа осетљивост и специфичност за преглед CRC-а (20 – 22). Стога су потребни нови увиди у молекуларне и генетске аспекте CRC-а, како би се пронашли поузданији, нови биомаркери за рано откривање CRC-а.

1.5 Серозна инвазија у колоректалном карциному

Серозна инвазија у CRC-у (T4a) независан је фактор ризика за гори исход, чак гори и од T4b, па је разликовање T3 (CRC-а са инвазијом мускуларис проприје) и T4a од велике прогностичке и терапијске важности. Значајан број случајева остаје недијагностикован, посебно случајеви дубоких T3 карцинома.



Слика 5. Серозна инвазија – група туморских ћелија и муцин присутни су на површини серозе.

Објављене су различите студије у вези са извештавањем о серозној инвазији (23, 24). Пажљиво узорковање од велике је важности. Резултати из Шепердове (Shepherd NA) групе (25) сугеришу на то да је перитонеално укључивање параметар са најјачим независним прогностичким значајем и чак је моћнији од обима локалног ширења или захваћености лимфних чворова. Сматра се да је захваћеност серозе недовољно дијагностикована, у до 20% случајева T3 CRC-а, вероватно због неадекватног узорковања и стога не препознаје пенетрацију серозе. Вишестепенско резање ткива као и детаљније и обимније узорковања могу бити од помоћи у неким случајевима. Хистолошки параметри за идентификацију ових карактеристика нису увек потпуно јасни, а одсуство стандардних смерница за процену перитонеалног захватања вероватно доприноси томе да се ти случајеви не дијагностикују.

1.6 Епително-мезенхимална транзиција

Идеја да епителне ћелије могу смањити регулацију епителних карактеристика и стећи мезенхимске карактеристике настала је у прошлом веку. Елизабет Хаи (Haue E.D.) је у истраживањима (26) описала промене од епителног до мезенхимског фенотипа у примитивном низу пилећих ембриона. У почетку описан као „епителна до мезенхимална трансформација“, овај процес диференцијације сада је опште познат као епително-мезенхимална транзиција (ЕМТ) (27). ЕМТ обично се опажа током ембриогенезе, регенерације и зарастања рана, али је њена потенцијална улога у карциногенези изазвала велико интересовање.

Кључни догађаји у ЕМТ-у су растварање међусобних веза епителних ћелија, губитак апикално-базалног поларитета и стицање поларитета напред-назад, реорганизација цитоскелетне архитектуре и промене у облику ћелија, смањена регулација записа експресије епителног гена и активација гена који помажу у дефинисању мезенхималног фенотипа, повећане ћелијске избочине и покретљивости и, у многим случајевима, способност деградације протеина ванћелијског матрикса (ЕСМ), како би се омогућило инвазивно понашање (28 – 30).

Туморске ћелије које пролазе кроз ЕМТ повезане су са стварањем *tumour budding* процеса (туморско пупљење) и микрометастазама. Верује се да ће CRC повезан са ЕМТ-ом вероватно имати лошу прогнозу.

Како ЕМТ у карциномима углавном није потпуна, туморске ћелије које пролазе кроз транзицију и добијају мезенхимални фенотип имају потенцијал хибридних ћелија; ова јединственост омогућава туморским ћелијама да поврате свој епителни фенотип на месту метастазирања, реверзибилног процеса, који се назива мезенхимално-епителна транзиција (МЕТ). Сви ови резултати описани су *in vitro*, с обзиром да их није лако препознати *in vivo*.

За ЕМТ значајна је смањена регулација мембранског Е-кадхерина, ћелијског адхезионог протеина, који је регулисан различитим факторима транскрипције. Е-кадхерин налази се на латералној базалној мембрани на адхерентном споју, који дефинише апико-базални поларитет, који повезује суседне епителне ћелије хомотропним интеракцијама зависним од калцијума, на њиховим екстрацелуларним крајевима (31). Смањење регулације може бити подстакнуто од стране неколико фактора. ZEB1, ZEB2 и SNAIL гени чланови су репресора Е-кадхерина, који могу директно потиснути ген транскрипције Е-кадхерина или то могу урадити индиректно, као нпр. TWIST и FoxC2 гени (32, 33).

Такође, сугерисано је то да микро РНК (miRNA), мале некодирајуће РНК, посебно породица miR-200, играју централну улогу у регулацији ЕМТ процеса током прогресије карцинома и метастаза, утичући на ове репресоре (33 – 35).

1.7 Хетерогеност тумора

Хетерогеност тумора је феномен различит код сваког пацијента и уско је повезан са прогнозом и прогресијом рака, резистенцијом на терапију и рецидивима. Хетерогеност може бити интратуморска и интратуморска, које су од велике важности, јер тумори могу имати различите нивое диференцијације, као и различите морфолошке обрасце, присутне у истом тумору (нпр. централни део и инвазивни фронт). Паралелно са морфолошким разликама, добро је познато да различита подручја истог тумора могу имати различите обрасце експресије гена, која се такође назива и молекуларна хетерогеност (нпр. централни део тумора у поређењу са периферним делом, чврста подручја упоређена са другим подручјима) (36).

Молекуларна интратуморска хетерогеност (ITH) може се поделити на клонску и неклонску. Клонску ITH карактерише пренос на ћерку ћелију и повезана је са различитим врстама геномске нестабилности, која такође утиче на агресивност и третман тумора. Неклонална ITH је функционална и повезана је са микроокружењем. Према литератури, микроокружење утиче на ћелијски фенотип у било којој врсти клонова; интеракција може варирати од подручја до подручја примарног тумора. Не само да се туморске ћелије могу разликовати, већ и строма тумора може бити хетерогена и може утицати на фенотип тумора (37, 38). Ове сложене интеракције познате су као функционална фенотипска пластичност (нпр. ЕМТ или као матичност ћелија рака) (39). И клонска и неклонска молекуларна хетерогеност блиско су повезане и утичу једна на другу (36).

Како је ITH анализа кључна за ефикасније третмане, специфично, стандардизовано узорковање могло би побољшати поновљивост молекуларне анализе, будући да је доказана веза између хистолошких образаца и молекуларних промена.

2 микро-RNK

2.1 Геномска организација

Микро-RNK (miRNK) су геном кодиране мале (~ 20 nt – 22 nt), једноланчане некодирајуће RNK, изведене било из међугеничних региона, било из секвенци егзона некодираних транскрипционих јединица; до 60% познатих miRNK су из интронских секвенци, кодирајућих протеина или некодирајућих транскрипционих јединица. Они су кодирани као један ген или генске групе. Неки од кластера miRNK су корегулисани и котранскрибовани. Претпостављено је да miRNK чине више од 3% људских гена (40). Интергенске miRNK транскрибују се као независна транскрипциона јединица, као моноцистронски, бикистронски или поликистронски примарни транскрипт (40). Интронска miRNK преференцијално се транскрибује у истој оријентацији као и ген домаћина, будући да се вероватно не транскрибује из сопствених промотера.

Они се обрађују из интрона, као и многи miRNA. Интронске miRNA и њихови транскрипти домаћина заједно су регулисани и котранскрибовани од стране истог промотера (41). Унутар генома, може постојати више од једне копије одређених miRNA. Сугерисано је то да су неке miRNA такође кодиране у антисенс DNK, која се не транскрибује у miRNA (42).

2.2 Биогенеза микро-RNK

Регулација експресије miRNA зависи од транскрипционих фактора и епигенетских механизма. Током сазревања, miRNA пролазе кроз опсежне посттранскрипционе модификације. Гени који кодирају miRNA транскрибују се са RNK полимеразом II или RNK полимеразом III (Pol II or Pol III) у дугачки примарни транскрипт (200 nt до неколико kb), назван пре-miRNA. Добијена пре-miRNA (која садржи реп поли-А и 7-метилгуанозин капу) обрађује се у језгру помоћу *drosha* ензима (ензим рибонуклеазе III). Добијена структура од 70 nt матичне петље, која се назива пре-miRNA, увози се у цитоплазму помоћу транспортног протеина, екпортина 5.

Након хидролизе GTP-а, уз последично ослобађање пре-miRNA, дволанчани део RNK пре-miRNA везује се и цепа помоћу *dicer* ензима (ензим рибонуклеазе III). Деловање ових протеина уклања терминалну петљу и производи miRNA: miRNA* дуплекс, који је пролазни интермедијер у биогенези miRNA (20 nt – 25 nt). Један од два ланца сваког фрагмента је, заједно са протеинима аргонауте (Ago 1 – 4), хеликазама, нуклеазама и протеинима који везују RNK, инкорпориран у комплекс који се зове комплекс рибонуклеопротеина, који садржи miRNA (miRNP). Добијен је комплексни пар база са комплементарним секвенцама miRNA. Други ланац, miRNA* вероватно је деградиран, мада постоји све више доказа о томе да један ланац или оба ланца могу бити функционални (40, 42 – 44). Интронске miRNA заобилазе *drosha* цепање и ослањају се на дејство машина за спајање/уклањање грана пре-miRNA да би произвеле приближно 60 nt прекидне miRNA укоснице (engl. hairpin) (пре-miRNA) (41). Недавно су описани бројни алтернативни путеви, који се разликују од канонских путева биогенезе miRNA, а подскуп неколико различитих дужих некодирајућих RNK може послужити као прекурсор miRNA (45, 46). Биогенеза miRNA приказана је на слици 6.

2.3 Механизам микро-RNK

Функционална улога miRNA варира, али верује се да је примарни механизам деловања miRNA код сисара инхибиција транслације miRNA упаривањем базе са 3'-UTR (*untranslated regions*) циљне miRNA. Каталитичке компоненте комплекса miRNP су протеини аго. Након упаривања базе између miRNA и циљане miRNA,

долази до деградације циљне miRNA (савршено, комплементарно, везивање miRNA за miRNA) или долази до супресије њеног превођења (када упаривање базе између ова два молекула није комплетно). Нарочито код животиња, свака miRNA може инхибирати транслацију многих различитих miRNA; могло би бити чак 200 предвиђених циљних гена по miRNA. Осим тога, miRNA може се регулисати са више од једне miRNA. Чини се да кооперативно деловање више идентичних (вишеструкост) или различитих miRNP (кооперативност) пружа најефикаснију транслациону инхибицију и додатни механизам за повећање специфичности miRNA. Везивање само једне miRNA обично није довољно да се мерљиво блокира транслација; комбинаторна контрола експресије гена такође може бити обезбеђена скупом координисано експримираних miRNA (47). Протеини или секундарне структуре miRNA могу ограничити приступ miRNP UTR-овима или могу олакшати препознавање аутентичних мета miRNA (40, 42 – 44).

2.4 Резултати функције микро-RNA

Верује се да miRNA углавном функционишу као транслаторни репресори, а у нормалним ћелијским условима то се може догодити на различите начине. (I) За miRNA, које не би требало да се експримирају у одређеном типу ћелије, производња протеина смањује се на безначајне нивое (искључите мете). (II) MiRNA могу прилагодити излаз протеина за прилагођену експресију у различитим типовима ћелија (фино подешавање експресије циља). (III) Неке miRNA делују као посматрачи, где се редукција miRNA толерише или поништава процесима повратне спреге (неутрална циљна експресија) (42).

Улога miRNA може се даље поделити на три парадигме: комбинаторна контрола (дефинисана као кооперативност), варијација ћелија у ћелију и специфичне, у односу на функције одржавања (48). Још увек постоји могућност да би неке miRNA могле да прецизирају више од посттранскрипционе репресије; неки би, поред тога, могли циљати DNK за утишавање транскрипције (42). MiRNA такође могу циљати 5'UTR отворене оквире за читање, па чак и DNK секвенце, како би регулисале транскрипцију, иако се, као преовлађујући механизам, сугерише потискивање транслације. Парадоксално, показано је да miRNA такође регулишу експресију гена побољшавајући транслацију под специфичним условима (49).

2.5 Биолошка функција микро-RNA

Упркос великом броју идентификованих miRNA, опсег њихових улога у регулисању ћелијске експресије гена није у потпуности разјашњен. Већина

познатих функција miRNK односи се на негативну генску регулацију, за коју се сматра да регулише 30% до 90% гена у људском геному. Профилирање експресије многих miRNK у различитим нормалним и оболелим ткивима показало је јединствене просторне и временске обрасце експресије. Многе miRNK изражене су на начин специфичан за ткиво и/или за ћелијски тип; важни су у различитим фазама развоја и утврђено је да регулишу различите развојне и физиолошке процесе (49). MiRNK укључене су у велики број биолошких процеса, укључујући пролиферацију, апоптозу, диференцијацију и ЕМТ, регулацију секреције инсулина, деобу и развој матичних ћелија, правилно формирање органа, ембрионално формирање и раст тела, отпорност на вирусне инфекције и оксидативни стрес, имунолошки одговор итд., као и у функционисање метаболизма и метаболизма холестерола (49, 50). Са свим различитим генима и обрасцима експресије, разумно је претпоставити да сваки тип ћелије у свакој фази развоја може имати посебан профил експресије miRNK.

2.6 Биолошка улога микро-RNK у карциному

MiRNK препознате су као генски специфични регулатори и по активности сличне су великом броју транскрипционих фактора протеина, за које се зна да имају критичну улогу у трансформацији ћелија у малигно стање. Ове RNK могу регулисати сваку фазу експресије гена: транскрипцију, стабилност miRNK и транслацију miRNK. Ћелије рака пролазе кроз генетске и епигенетске промене у односу на нормалне ћелије, а улога miRNK у посредовању ових разлика почиње да се појављује. Профилирање широм генома показало је то да miRNK имају различите потписе специфичне за одређени тип рака. Комбиновање miRNK са другим биомаркерима за откривање и прогнозу рака побољшало би процену, откривање и прогнозу ризика од рака.

Специфични генетски полиморфизми повезани су са ризиком од развоја неколико врста карцинома. Дакле, постоји потреба за комбиновањем геномских мутација са miRNK маркерима за развој маркер панела за прецизнију процену ризика и рану дијагнозу (51 – 53).

2.7 Значај микро-RNK као потенцијалних биомаркера за рано откривање пренеопластичних лезија

Микро-RNK могу послужити као потенцијални биомаркери за дијагнозу рака, прогнозу и циљеве за терапију. Као потенцијални маркери за дијагнозу, бољи су фактори класификације од miRNK (54, 55). Као потенцијални маркери за прогнозу,

miRNK корисне су као маркери за одговор на лечење, за предвиђање прогресије, метастазирања карцинома и преживљавања пацијената. Као биомаркери за терапију, miRNK могу бити корисне као онкогени, супресори тумора, матичне ћелије, инвазије и метастазе и осетљивости на лекове. Неке од кључних карактеристика miRNK, које их чине корисним као потенцијалне биомаркере, могу се укратко сумирати. (I) Чини се да су обрасци експресије miRNK у карциномима људи специфични за ткиво. (II) Изгледа да профили miRNK одражавају развојну линију и стање диференцијације тумора. (III) MiRNK могу успешно класификовати слабодиференциране туморе са великом прецизношћу (~ 70%). Насупрот томе, профили miRNK у истом скупу узорака имали су тачност од само 6%. Због тога, комбинација података профилирања miRNK и mRNA има потенцијал да повећа тачност класификације тумора. (IV) MiRNK стабилне су у течностима плазме и серума људског тела. (V) MiRNK могу се квантитативно мерити у микролитарским количинама људских серума или плазме помоћу квантитативног PCR-а у реалном времену qPCR). (VI) MiRNK такође се могу профилисати и квантитативно мерити у ткивима фиксираним формалином (54, 55,56).

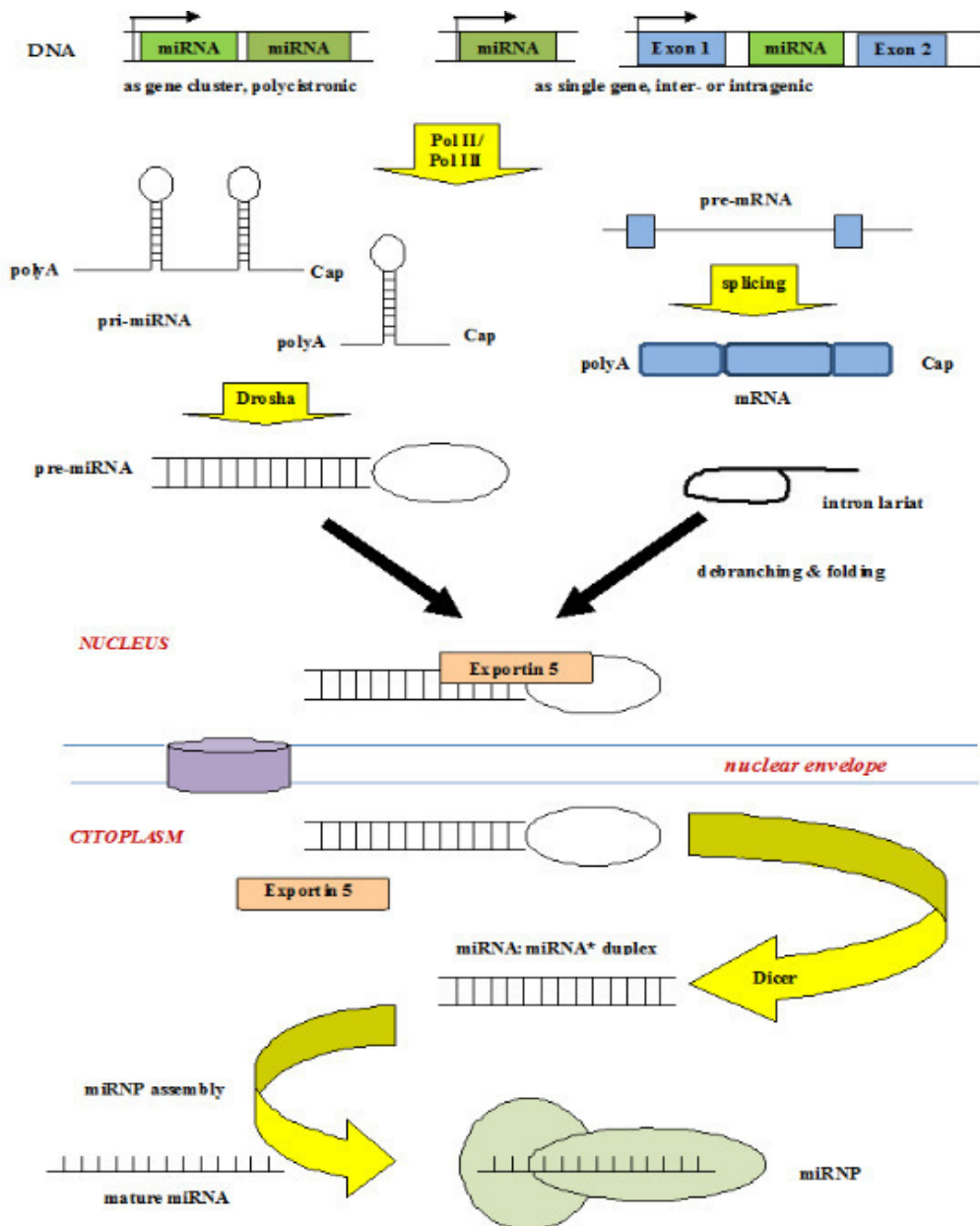
2.8 Корисност miRNK као потенцијалних биомаркера

Профилисање у целом геному испитивало је miRNK у преканцерозним лезијама или њихову корисност за предвиђање прогресије од преканцерозе до карцинома. Неколико претпоставки сугерише: (I) на потенцијалну корисност miRNK, као знакове раних догађаја у карциногенези и као биомаркере у раном откривању рака; (II) употребу miRNK као диференцијалних показатеља бенигне, пренеоплазије и неоплазије; (III) на могућност да би miRNK могле бити корисне у одређивању тога које ће пренеопластичне лезије, вероватно, напредовати до рака. Разликовање бенигну болести и одређених непреканцерозних лезија од преканцерозних лезија и метастатских тумора, побољшало би исходе и преживљавање пацијената, смањило непријатности пацијената и трошкове (54).

2.9 Двострука улога микро-RNK – гена за сузбијање тумора и онкогена

Сматра се да miRNK регулишу четвртину свих гена сисара, а промене у њиховој експресији повезане су са развојем рака. Утврђивање природе регулације гена miRNK током нормалног развоја и физиологије биће од виталног значаја за разумевање њихове улоге у настанку и развоју рака (53). Показало се да су miRNK регулисане нагоре или надолу, у широком спектру карцинома код људи, што указује на улогу miRNK у туморигенези.

Постоје различити начини на које се чини да су miRNK укључене у рак: као супресори тумора, као онкогени или као агенси који утичу на стабилност генома. Чини се да miRNK функционишу као супресори тумора, јер смањена функција одговарајуће miRNK доводи до повишене експресије потенцијалних онкогена или процеса, на пример пролиферације или смањених процеса, као што је апоптоза. Изгледа да повећана експресија онкогених miRNK (онкомири) делује на начин аналоган онкогену. Претпоставља се да онкомири функционишу помоћу гена за сузбијање тумора који утичу на *down* регулацију (48, 57).



Слика 6. Биогенеза miRNK (преузето од Боштјанчич и сарадника (Boštjančič E. Et al.), 2013).

3 Циљ истраживања

Циљ истраживања био је анализирати ЕМТ у различитим корацима колоректалне карциногенезе, користећи miRNK и њихове циљне гене.

Циљ је, такође, био утврдити да ли се било која од испитиваних miRNK и њихових циљних гена могу користити као дијагностички и прогностички маркери.

4 Хипотезе

У овој студији претпостављено је да је:

1. ЕМТ важан механизам у развоју и прогресији CRC-а из аденома (нпр. у метастазирању и проширењу на серозу);
2. ЕМТ може помоћи у разликовању аденома са епителном псеудоинвазијом и CRC-а;
3. ЕМТ маркери могу се користити за разликовање проблематичних случајева - аденом са епителном псеудоинвазијом од CRC-а и за спречавање непотребних операција, у првом случају;
4. ЕМТ се може користити као маркер напредног CRC-а.

5 Материјали и методе

Студијом је обухваћено 62 узорка ткива пацијента, који су подвргнути хируршкој ресекцији дебелог црева или ендоскопском уклањању аденома или CRC-а. За рутинско хистопатолошко испитивање, узорци ткива фиксирани су у десетоцентном пуферисаном формалину и уграђени у парафин (FFPE). Узорци су ретроспективно прикупљени из архиве Института за патологију Медицинског факултета Универзитета у Љубљани. За све пацијенте, укључени су узорци тумора и узорци нормалне слузнице (уколико су постојали). Пацијенти лечени радиотерапијом, хемотерапијом или биолошким лековима, пре операције били су искључени из студије.

На основу клиничких и хистопатолошких карактеристика, пацијенте смо поделили у пет група:

- Група 1 (CRC N0): 13 пацијената са CRC-ом без метастаза у лимфним чворовима. Међу испитиванима, било је 9 жена и 4 мушкарца, старости од 60 до 86 година (просек старости био је 74,62 године \pm 11,09 година). У 5 случајева, тумори су били присутни у сигмоидном дебелом цреву, ректуму (3 случаја), асцендентном делу дебелог црева (3 случаја) и десцендентном делу дебелог црева (2 случаја). Статус pTNM био је pT3N0 код 8 пацијената, pT2N0 код 2 пацијента, pT4N0 код 2 пацијента и pT1N0 код једног пацијента.

- Група 2 (CRC N+): 17 пацијената са CRC-ом са метастазама у лимфним чворовима. Међу испитиванима, било је 9 жена и 8 мушкараца, старости од 53 године до 90 година (просек старости износио је 70,88 година \pm 13,87 година). Тумори су били присутни у асцендентном делу дебелог црева (6 случајева), ректуму (3 случаја), десцендентном делу дебелог црева (4 случаја) и сигмоидном дебелом цреву (4 случаја). Статус pTNM био је pT3N1 код 6 пацијената, pT4N2 код 7 пацијената и pT4N1 код 4 пацијента. У групама 1 и 2 (CRC N0 и CRC N+) 10 пацијената имало је серозну инвазију (CRCT4a). У тој групи било је 8 жена и 2 мушкарца, старости од 35 до 89 година (просечне старости 64,5 година \pm 8,8 година). Тумори су били присутни у сигмоидном дебелом цреву (3 случаја), у асцендентном делу дебелог црева (2 случаја), десцендентном делу дебелог црева (2 случаја), ректуму (2 случаја) и трансферзном делу дебелог црева (један случај).

- Група 3 (аденоми): 10 пацијената са тубуларним и тубуловилусним аденомима. Међу испитиванима, било је 9 мушкараца и била је једна жена, старости од 50 година до 83 године (просек старости износио је 61,00 година \pm 10,99 година). Аденоми су били присутни у сигмоидном дебелом цреву (4 случаја), у асцендентном делу дебелог црева (један случај), десцендентном делу дебелог црева (2 случаја), ректуму (2 случаја) и трансферзном делу дебелог црева (један случај). У групи је било 4 тубуларна аденома са дисплазијом високог степена, 4

тубуловилозна аденома са дисплазијом високог степена и 2 тубуловилозна аденома са дисплазијом ниског степена.

- Група 4 (малигни аденоми): 10 пацијената са малигним аденомима (T1 карцином). Међу испитиванима, било је 5 жена и 5 мушкараца, старости од 56 до 87 година (просек старости био је 65,4 године \pm 9,22 године). Тумори су били присутни у сигмоидном дебелом цреву (6 случајева), ректуму (2 случаја), десцендентном делу дебелог црева (један случај) и асцендентном делу дебелог црева (један случај).

- Група 5 (аденоми са псеудоинвазијом): 12 пацијената са аденомима са псеудоинвазијом. Међу испитиванима, било је 8 жена и 4 мушкарца, старости од 52 до 64 године (просек старости износио је 57,07 година \pm 6,02 године). Тумори су били лоцирани у сигмоидном дебелом цреву (10 случајева), ректуму (један случај) и десцендентном делу дебелог црева (један случај).

У свим случајевима, ЕМТ је процењиван на основу експресије Е-кадхерина, породице miR-200 и експресије циљних гена и морфологије.

За потребе истраживања:

- аденоми су упоређени са карциномом и нормалном слузницом дебелог црева;

- малигни аденоми (аденоми са карциномом) упоређени су са аденомима и аденомима са псеудоинвазијом;

- упоређени су карциноми са метастазама у регионалним лимфним чворовима са онима без метастаза у лимфним чворовима;

- карцином са серозном инвазијом упоређен је са карциномом без серозне инвазије (CRC N0 и CRC N+).

Анализирана је хетерогеност унутар тумора, упоређујући инвазивни предњи део тумора и центар тумора у свим случајевима CRC-а.

Студију је одобрио Државни етички комитет (0120-595/2017/5).

5.1 Имунохистохемија

Узорци ткива FFPE исечени су на 4 μ m за имунохистохемију. Сви реагенси су из компаније Медицински системи Вентана (Тусон, САД) (engl. Ventana Medical Systems, Inc., Tuscon, USA), осим ако није другачије назначено. Коришћена су комерцијално доступна антитела против Е-кадхерина (Dako, M3612, clone NC-38, разблажење 1 : 10). Депарафинизација, проналажење антигена и бојење изведени су у аутоматском имунолајзеру (Benchmark KST) користећи пероксидазу од хрена (*iVIEW™ DAB Detection Kit*) за развој боје. Препарати су затим обојени хематоксилином.

5.2 Изолација RNK из узорака ткива фиксираних формалином

За изолацију RNK из узорака ткива фиксираних формалином (FFPE) коришћени су узорци дебљине 10 μm , а за сам поступак изолације коришћено је шест до осам препарата ткива од 10 μm . Изолација тоталне RNK изведена је коришћењем комплета *allprep DNA/RNA FFPE* (Qiagen), према протоколу произвођача. Концентрација и квалитет изолата процењиваће се спектрофотометром ND-1000 (NanoDrop) на таласним дужинама 260 nm, 280 nm и 230 nm.

5.3 Изолација RNK из узорака ткива фиксираних формалином

За анализу интратуморске хетерогености, узорковани су тачно одређени делови тумора ткивних блокова фиксираних у десетопроцентном пуферисаном формалину и уграђених у парафин (FFPE). Биопсирање је вршено иглом (пречника 600 μm) (*engl. punch biopsy*), са инвазивног предњег и централног дела тумора. За поступак изолације коришћена су 3 узорка из сваке туморске регије. Изолација тоталне RNK изведена је помоћу *MagMAX FFPE DNA/RNA Ultra* комплета, према протоколу произвођача са једном модификацијом. Дигестија протеазом изведена је преко ноћи на 56 оС уз мешање 15 секунди при 300 обртаја по минути, свака 4 минута.

Концентрација и квалитет изолата процењиваће се спектрофотометром ND-1000 (NanoDrop) на таласним дужинама 260 nm, 280 nm и 230 nm.

5.4 Анализа експресије чланова породице miR-200 и miR-205

MiRNK породица гена miR-200 анализирана је коришћењем kPCR методе, на основу *TaqMan* методологије (Thermo Fisher Scientific). Коришћена је унапред дизајнирана мешавина сонди и прајмера специфичних за експресију циљних miRNK. Пре kPCR-а, створена су четири базна узорака RNK, добијених из нормалне слузнице, аденома, раног карцинома и напредног CRC-а. После реверзне транскрипције (RT), cDNK разблажена је у пет корака, у распону од разблажења у 4 тачке до разблажења у 1024 тачке и сонде су тестиране на ефикасност kPCR-а. Све реакције ефикасности kPCR изведене су на апарату *Rotor-Gene Q*, у три примерка.

5.5 Реверзна транскрипција

За специфичну реверзну транскрипцију (RT) коришћени су верижни прајмери miRNK и микро RNK *TaqMan RT* комплет (Thermo Fisher Scientific) према протоколу произвођача. RNU6B и miR-1247b коришћени су као референтни гени (RG). MiRNK, miR-141, miR-200a, miR-200b, miR-200c и miR-429 тестиране су у односу на геометријску средњу експресију RNU6B и miR-1247b. Укратко, изведена је 10 μl RT реакциона мешавина са 10 ng укупног узорка RNK, 1,0 μl *MultiScribe* реверзне транскриптазе (50 U/ μl), 1 μl пуфера за реверзну транскрипцију (10x), 0,1 μl dNTP (100 mM), 0,19 μl инхибитора рибонуклеазе (20 U/ μl) и 2 μl RT прајмера (5x). Реакциони услови били су: на 16° С30 минута, на 42°С 30 минута и на 85°С 5 минута.

5.6 Квантитативни PCR у реалном времену

Квантитативни PCR у реалном времену (qPCR) за miRNK изведен је у 20 μl PCR мастер мешавине, која садржи 5 μl *TaqMan 2k* универзалне PRC мастер мешавине, 0,5 μl *TaqMan* теста и 4,5 μl RT производа разблажених 100 пута. qPCR реакције изведене су на *Rotor-Gene Q* апарату у дупликатима на следећи начин: почетна денатурација на 95°С током 10 минута и 40 циклуса за 15 секунди на 95°С (денатурација), 60 секунди на 60°С (жарење и продужење прајмера). Сигнал се прикупљао на крају сваког циклуса.

5.7 Анализа експресије циљних гена породице miR-200

MiRNK експресија гена за кодирање протеина анализирана је коришћењем qPCR-а, на основу *TaqMan* методологије (Thermo Fisher Scientific). Коришћена је унапред дизајнирана мешавина сонди и прајмера, специфичних за експресију циљних mmiRNK. Пре qPCR-а, створено је пет група узорака RNK, добијених из нормалне слuzнице, аденома, раног карцинома, узнатредовалог CRC-а без нодалних метастаза и CRC-а са нодалним метастазама. После RT и преампа, унапред појачана cDNK разблажена је у четири корака, у распону од разблажења у 5 тачака до разблажења у 625 тачака, а сонде су тестиране на ефикасност помоћу qPCR-а. Све реакције ефикасности qPCR-а изведене су на *Rotor-Gene Q* апарату у три примерка.

5.8 Реверзна транскрипција

Циљни гени miRNA породице miR-200, CDKN1B, ONECUT2, PTPN13, RND3, SOX2, TGFB2, WAVE3, ZEB1, ZEB2 анализирани су у односу на геометријску средину RG, IPO8 и B2M. MiRNA реверзно су транскрибоване помоћу *OneTaq* RT-PCR комплета (New England Biolabs, UK), помоћу случајно изабраних прајмера, према упутствима произвођача. Реакције обрнуте транскрипције започете су са 3 μ l (60 ng) укупне RNK и 1 μ l *Random Primer Mix* мешавине инкубиране на 70°C током 5 минута. Десет μ l RT мастер мешавине укључивало је 5,0 μ l M-MuLVM реакционе мешавине, 1,0 μ l M-MuLVM реверзне транскриптазе и 4,0 μ l реакционе мешавине, након случајног пуњења. Реакциони услови били су: на 25°C 5 минута, на 42°C 60 минута и на 80°C 4 минута.

5.9 Преамплификација и квантитативни PCR у реалном времену

Након реверзне транскрипције (RT), преамплификација је изведена помоћу *TaqMan PreAmp MasterMix-a* у 10 μ l према протоколу произвођача. Добијена *ReAmp* реакција 5 пута је разблажена и 4,5 μ l коришћено је у 10 μ l реакционој запремини са *FastStart Essential DNA Probes MasterMix* мешавином (Roche, Немачка) и *TaqMan* сондом. Термички услови примењени су на следећи начин: 50°C 2 минута, почетна денатурација на 95°C 10 минута и 40 циклуса денатурације на 95°C 15 секунди и жарење на 60°C у трајању од 1 минут. Све qPCR анализе изведене су на *Rotor-Gene Q* апарату у дубликатима. Сигнал је прикупљен на крају сваког циклуса.

5.10 Статистичка анализа експерименталних података

Резултати су представљени као релативна експресија гена. Сви Δ Cq кориговани су за PCR ефикасност и калкулација гена од интереса (GOI, CtGOI) извршена је у односу на референтни ген (RG, CtRG), назван Δ Cq. У узорцима CRC-а, разлике у експресији miRNA и mRNA упоређене су између тумора и суседног нормалног ткива користећи Δ Cq и Вилкоксонев ранк тест (*Wilcoxon signed-rank test*). За поређење релативне квантификације miRNA и mRNA између независне групе узорака (тј. аденома и нормалне слузнице) коришћени су Δ Cq и *Mann-Whitney U test*. Исти тест коришћен је за поређење тумора са нодалним метастазама са туморима без нодалних метастаза, само је коришћен Δ Cq. За све корелације/асоцијације коришћена је Спирманова корелација по рангу (*Spearman's rank-order correlation*).

Статистичка анализа података извршена је коришћењем програма SPSS верзије 24 (SPSS Inc.). Разлике су сматране значајним при $p < 0,05$.

6 Резултати

6.1 Пацијенти и узорци ткива

Група аденома са погрешним епителом укључивала је 12 пацијената, група аденома 10 пацијената, група малигних аденома (рани CRC) 10 пацијената, група CRC без метастаза у лимфним чворовима (CRC N0) укључивала је 13 пацијената, група CRC са метастазама у лимфним чворовима (CRC N+) укључивала је 17 пацијената, а група са серозном инвазијом 10 пацијената са CRC-ом (pT4a) без обзира на N стадијум. Као контролна група, укључена је здрава слузница дебелог црева са хируршким маргинама, узета од 30 пацијената са CRC N0 и CRC N+. Пол, старост и локација за сваку групу приказани су у Табели 1. У студији су били укључени само случајеви са јасном патохистолошком дијагнозом утврђеној путем биопсије. У групи аденома била су 4 тубуларна аденома са дисплазијом високог степена, 4 тубуловиозна аденома са дисплазијом високог степена и 2 тубуловиозна аденома са дисплазијом ниског степена. Сви узорци ткива фиксирани су 24 сата у десетоцентном пуферисаном формалину пре уметања у парафин. Након фиксације и уградње, узорци ткива резани су на дебљину од 3 μm – 4 μm и обојени хематоксилином и еозином, како би били припремљени за рутински хистопатолошки преглед. За потребе истраживања, репрезентативни парафински блокови прикупљени су из архиве Института за патологију Медицинског факултета Универзитета у Љубљани.

6.2 Имунохистохемијска експресија бојења Е-кадхерином

Изражавање Е-кадхерина већим делом било је очувано у нормалној слузници дебелог црева, као и, углавном, у аденомима и карциномима. Међутим, у одређеном броју узорака аденома и карцинома приметили смо фокални губитак или слабо бојење Е-кадхерином на периферији лезије или инвазивном фронту. Сва 4 случаја аденома са фокалним губитком бојења Е-кадхерином показала су дисплазију високог степена. Бојење Е-кадхерином такође је било слабо или изгубљено у 7 од 13 случајева са CRC-ом N0 и 9 од 17 случајева са CRC-ом N+.

Резултати су сажети у Табели 1.

| Group | Age (mean \pm SD) | Female / male | pTNM | No of cases with weak or focal loss of E-cadherin staining |
|---|------------------------|---------------|--|--|
| Adenoma (n = 10) | 61,00 \pm 10,99 | 1 : 9 | - | 4 40,0 % |
| CRC N0 (n = 13) | 74,62 \pm 11,09 | 9 : 4 | pT1N0 (n = 0) pT2N0 (n = 3) pT3N0 (n = 5) pT4N0 (n = 1) | 7 53,9 % |
| CRC N+ (n = 17) | 70,88 \pm 13,87 | 9 : 8 | pT3N1 (n = 6) pT4N1 (n = 4) pT4N2 (n = 7) | 9 52,9 % |
| Malignant adenoma (n = 10) | 65,4 \pm 9,22 | 5 : 5 | pT1 | |
| Adenoma with epithelial misplacement (n = 12) | 57,07 \pm 6,02 | 9 : 3 | - | |
| CRC T4 | 67,8 \pm 13,87 | 8 : 2 | pT4a (n = 10) | |

6.3 Неоткривена експресија маркера епително-мезенхималне транзиције

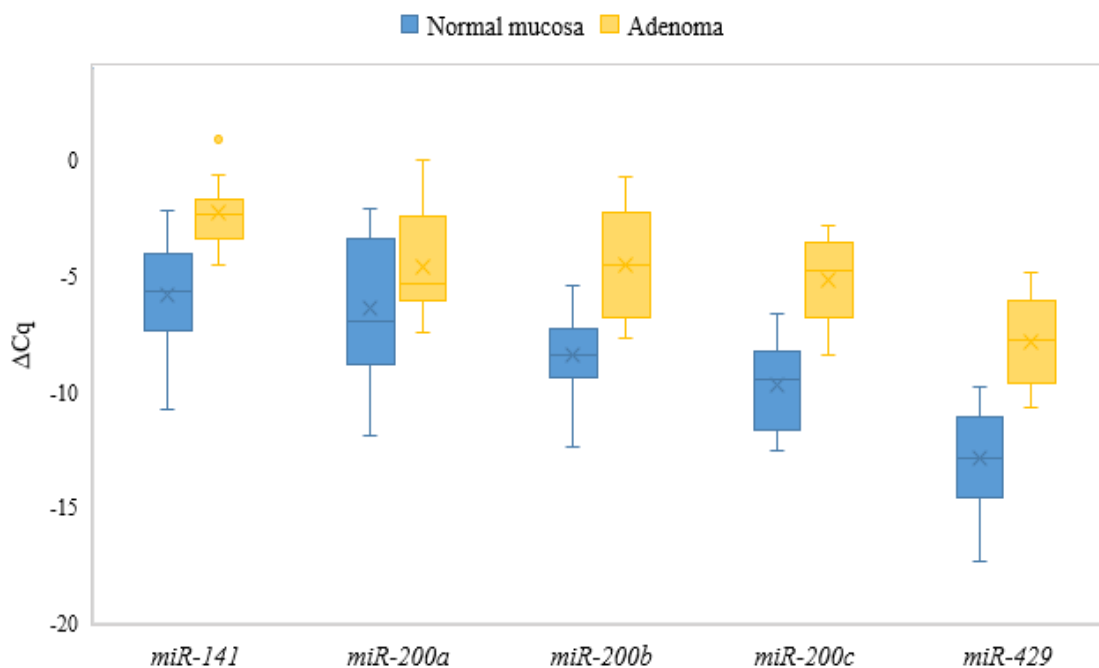
Ниво експресије miR-205, ZEB1 (циљни ген породице miR-200) и WAVE3 (циљни ген miR-200b) гена био је изнад границе детекције при припреми испитивања ефикасности на сакупљеним узорцима. Ови ЕМТ маркери стога су изостављени из даље анализе. Експресија miR-205, ZEB1 и WAVE3 гена била је изван граница детекције у свим групама, тј. у нормалној слузници, аденомима, аденомима са псеудоинвазијом CRC-а са нодалним метастазама и CRC-а без нодалних метастаза.

6.4 Експресија породице miR-200 и њених циљних гена у аденому у поређењу са њиховом експресијом у нормалној слузници дебелог црева

Геометријска средина експресије референтних гена за miRNK била је упоредива између аденома и нормалне слузнице пацијената са CRC-ом N0, али се разликовала од геометријске средње вредности изражавања референтних гена за miRNK у CRC-у N+. Због тога, сва поређења аденома са нормалном слузницом извршена су само са нормалном слузницом CRC-а N0. Избор смо такође потврдили тиме да смо у истраживању дошли до статистичне разлике у експресији 4 од 5 истраживаних miRNK између нормалне слузнице CRC-а N0 и CRC-а N+.

Експресија свих испитиваних miRNK била је повећана у аденому у поређењу са експресијом miRNK у нормалној слузници CRC-а N0; *up* регулација била је статистички значајна у случају miR-141 (~ 12,2 пута, $p = 0,001$), miR-200b (~ 14,3 пута, $p < 0,001$), miR-200c (~ 23,4 пута, $p < 0,001$) и miR-429 (~ 33,2 пута, $p < 0,001$).

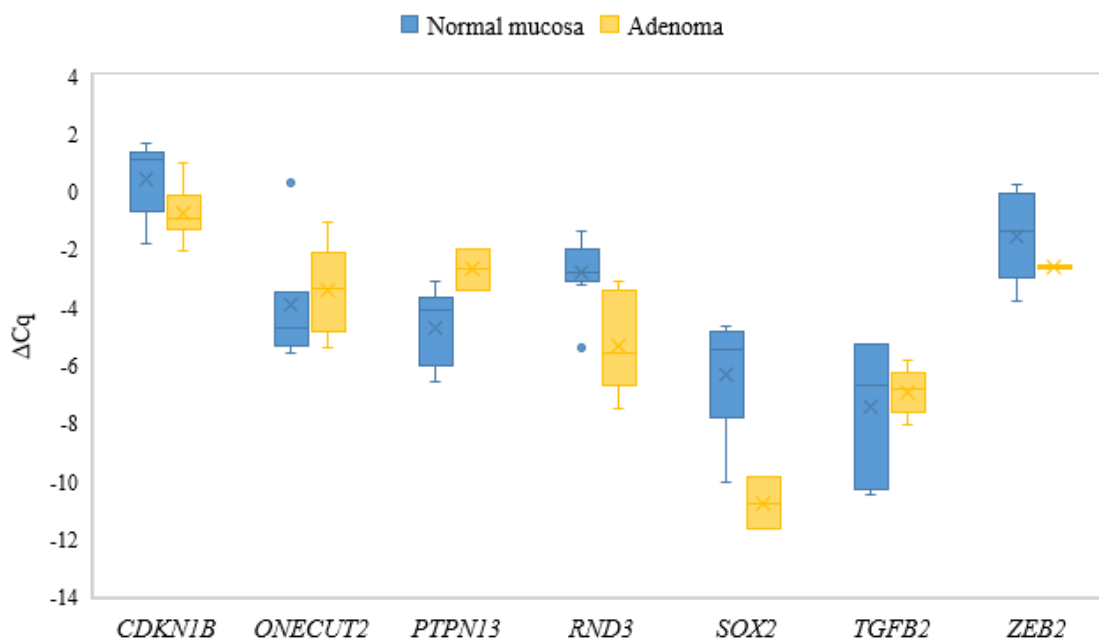
Резултати су сумирани на слици 7а.



Слика 7а. Експресија свих miRNK у аденому у поређењу са експресијом miRNK у нормалној слузници.

Сви испитивани и експримирани циљни гени, CDKN1B, PTPN13, RND3, SOX2 и ZEB2 били су снижени у аденому у поређењу са њиховим статусом у нормалној слузници CRC-а N0, осим ONECUT2 и TGFB2 гена, који су били повећано регулисани. Штавише, PTPN13, SOX2 и ZEB2 гени изражени су само у 2 узорка од 10 узорака аденома, па прорачун статистичке значајности не би био одговарајућ. Укратко, снижена регулација достигла је статистичку значајност само у случају CDKN1B (~ 2,3 пута, $p = 0,015$) и RND3 (~ 5,9 пута, $p < 0,001$), оба изражена циљна гена miR-200b.

Резултати су сумирани на слици 7б.



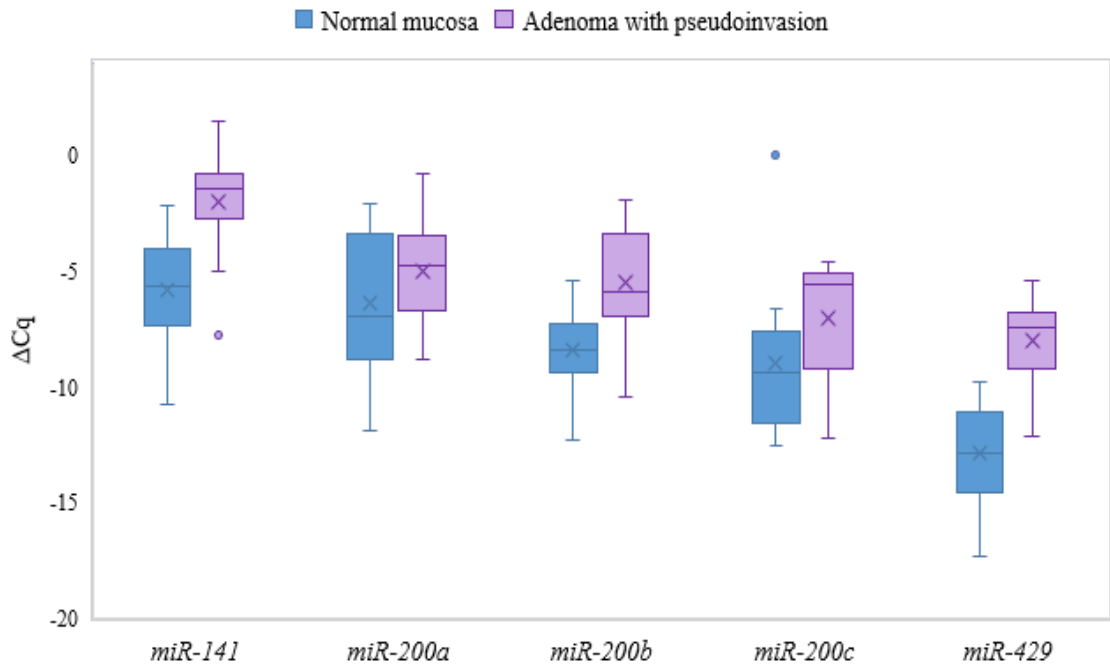
Слика 76. Експресија свих испитиваних циљних гена у аденому у поређењу са експресијом циљних гена у нормалној слузници.

Такође, приметили смо статистички значајну, јаку, негативну корелацију између експресије CDKN1B и miR-200a ($r_s = -0,648$, $p = 0,043$) гена у аденомима.

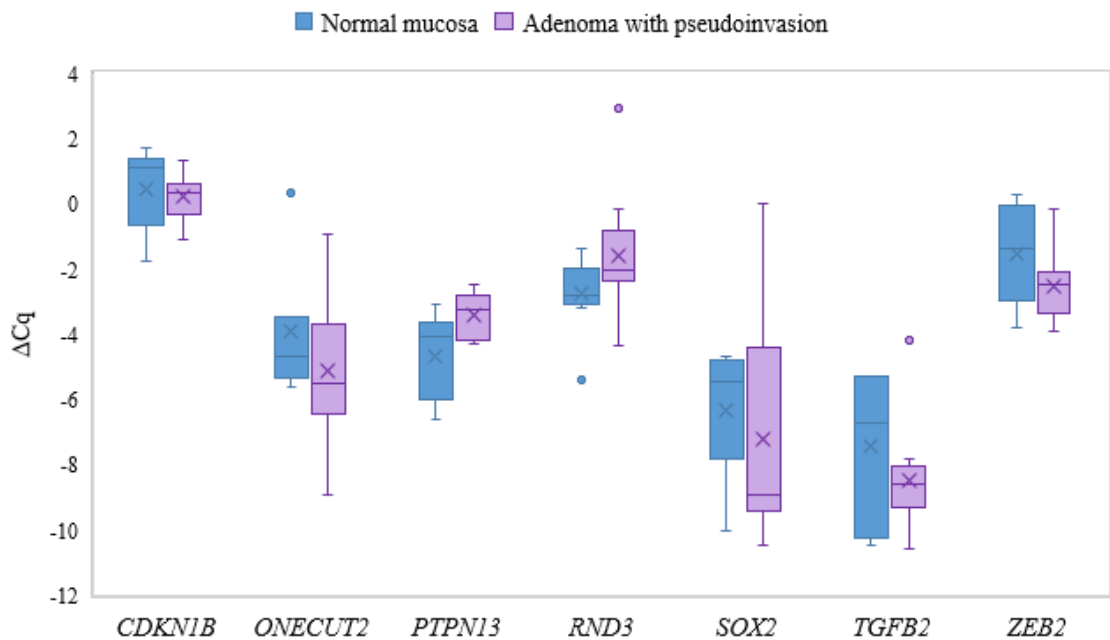
6.5 Експресија miRNK и њихових циљних гена у аденому са псеудоинвазијом у поређењу са експресијом miRNK и њихових циљних гена у нормалној слузници

Mann-Whitney тест и ΔCq открили су статистички значајну горњу регулацију miR-141 (14,2 пута, $p = 0,001$), miR-200b (7,6 пута, $p = 0,002$), miR-200c (6,6 пута, $p = 0,011$) и miR-429 (28,2 пута, $p < 0,001$) гена у аденому са псеудоинвазијом у поређењу са поменутом регулацијом у здравом ткиву слузнице. Такође, приметили смо статистички значајну горњу регулацију PTPN13 код аденома са псеудоинвазијом у поређењу са овом регулацијом у здравој слузници (2,5 пута, $p = 0,028$).

Резултати су сумирани на сликама 8а и 8б.



Слика 8а. Експресија miRNK у аденому са псеудоинвазијом у поређењу са експресијом miRNK у нормалној слузници.

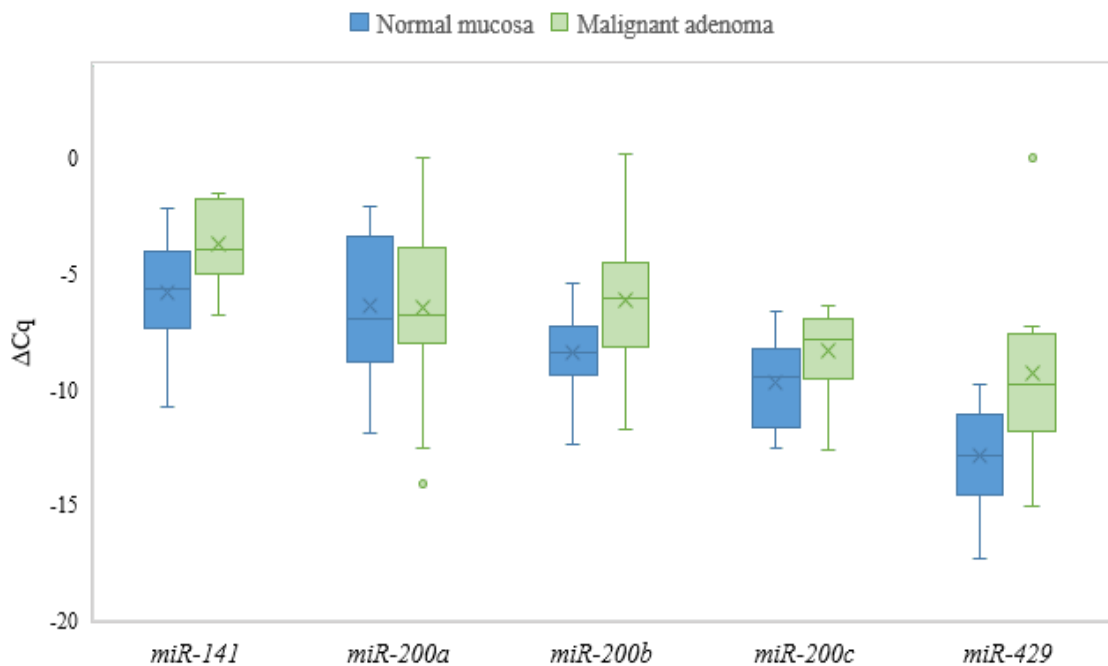


Слика 8б. Експресија циљних гена у аденому са псеудоинвазијом у поређењу са експресијом циљних гена у нормалној слузници.

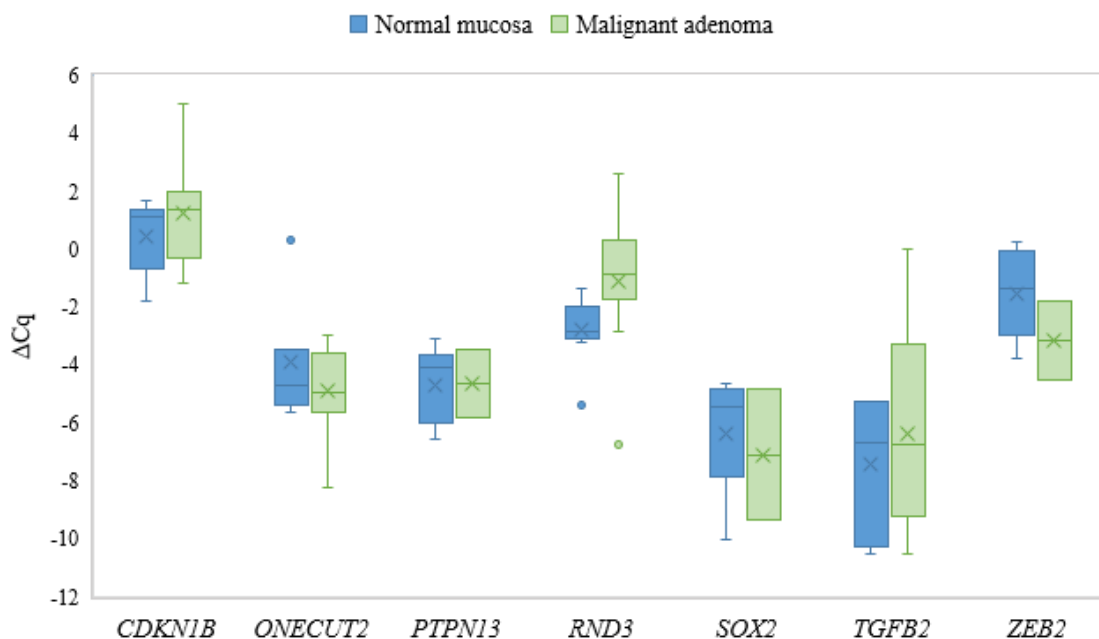
6.6 Експресија miRNK и њихових циљних гена у раном карциному (малигни аденом) у поређењу са експресијом miRNK и њихових циљних гена у нормалној слузници

Mann-Whitney тест и ΔCq открили су статистички значајну повећану регулацију miR-141 (5,0 пута, $p = 0,027$), miR-200b (5,1 пута, $p = 0,016$) и miR-429 (6,7 пута, $p = 0,029$) гена у поређењу са поменутом регулацијом у раном карциному са здравим ткивом слузнице. Такође, приметили смо статистички значајну повећану регулацију RND3 у раном карциному у поређењу са овом регулацијом у нормалној слузници (3,1 пута, $p = 0,010$).

Резултати су сумирани на сликама 9а и 9б.



Слика 9а. Експресија miRNK у раном карциному (малигни аденом) у поређењу са експресијом miRNK у нормалној слузници.

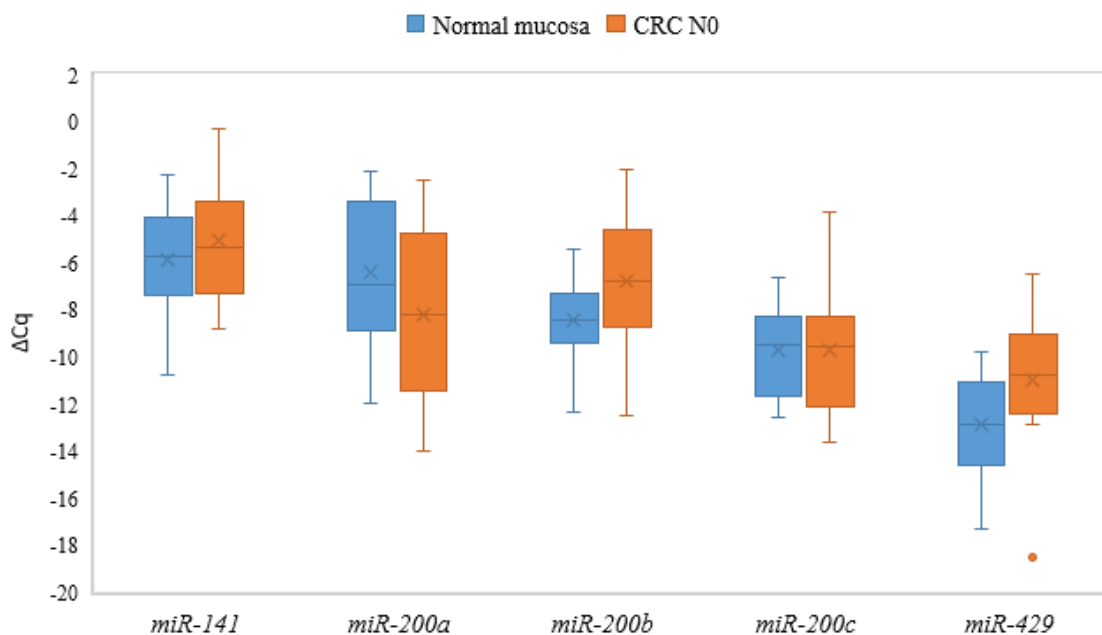


Слика 9б. Експресија циљних гена у раном карциному (малигни аденом) у поређењу са експресијом циљних гена у нормалној слузници.

6.7 Експресија породице miR-200 и њених циљних гена у карциному без нодалних метастаза у поређењу са експресијом породице miR-200 и њених циљних гена у нормалној слузници

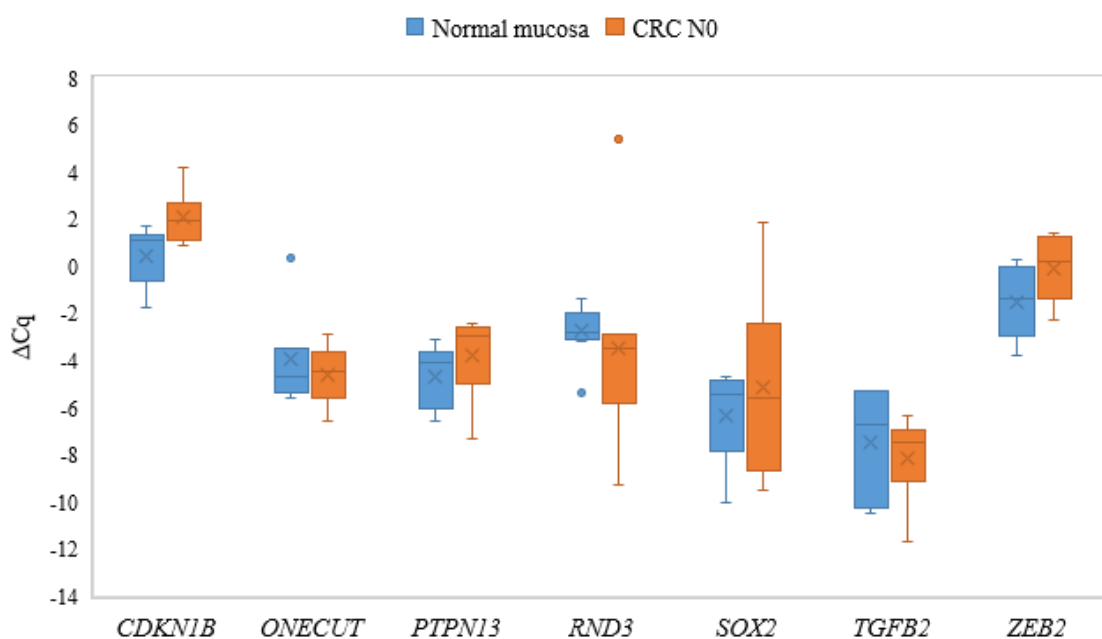
Експресија свих miRNK била је повећано регулисана у CRC-у N0 у поређењу са експресијом miRNK у одговарајућој нормалној слузници, осим miR-200a гена, који је био снижен; *up* регулација била је статистички значајна у случају miR-141 (~ 1,7 пута, $p = 0,019$) и miR-429 (~ 3,7 пута, $p = 0,041$) гена.

Резултати су сумирани на слици 10а.



Слика 10а. Експресија miRNK у карциному без нодалних метастаза у поређењу са експресијом miRNK у нормалној слузници.

За разлику од аденома, испитивани циљни гени CDKN1B, PTPN13, RND3, SOX2 и ZEB2 били су горе регулисани у CRC-у N0, осим ONECUT2 и TGFB2 гена, који су били снижени. С татистички значајна повећана регулација примећена је за CDKN1B (~ 3,0 пута, $p = 0,015$) и за ZEB2 (~ 2,7 пута, $p = 0,011$) гене. Резултати су сумирани на слици 10б.



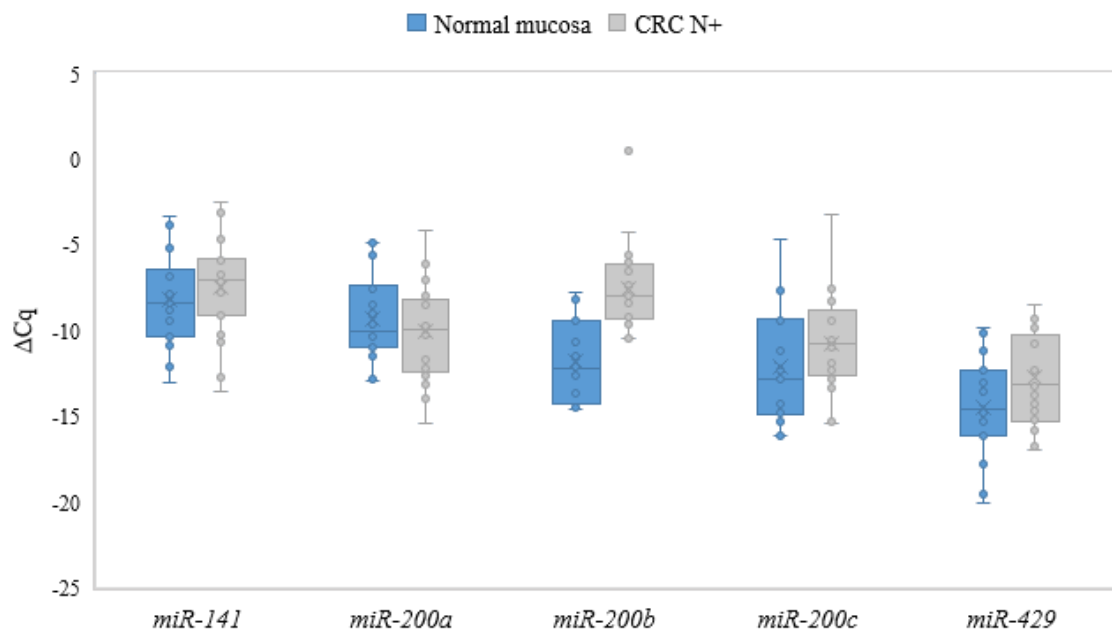
Слика 10б. Експресија циљних гена у карциному без нодалних метастаза у поређењу са експресијом циљних гена у нормалној слузници.

Спирманов коефицијент корелације (engl. Spearman's correlation coefficient) показао је то да је у CRC-у N0 експресија miR-200a гена била у корелацији са експресијом TGB2 гена ($r_s = 0,900$, $p = 0,037$), CDKN1B гена у корелацији са miR-141 ($r_s = 0,683$, $p = 0,042$) геном и RDN3 ген у корелацији са miR-200c ($r_s = 0,867$, $p = 0,002$) геном. Све корелације биле су позитивне и јаке или врло јаке.

6.8 Експресија породице miR-200 и њених циљних гена у карциному са нодалним метастазама у поређењу експресијом miR-200 и њених циљних гена у нормалној слузници

Експресија свих miRNK, осим miR-200a гена, била је повишено регулисана код CRC-а N+ у поређењу са експресијом у одговарајућој нормалној слузници; *up* регулација била је статистички значајна у случају miR200b (~ 19,4 пута, $p < 0,001$), miR-200c (~ 2,7 пута, $p = 0,003$) и miR-429 (~ 3,2 пута, $p = 0,006$) гена.

Резултати су сумирани на слици 11а.

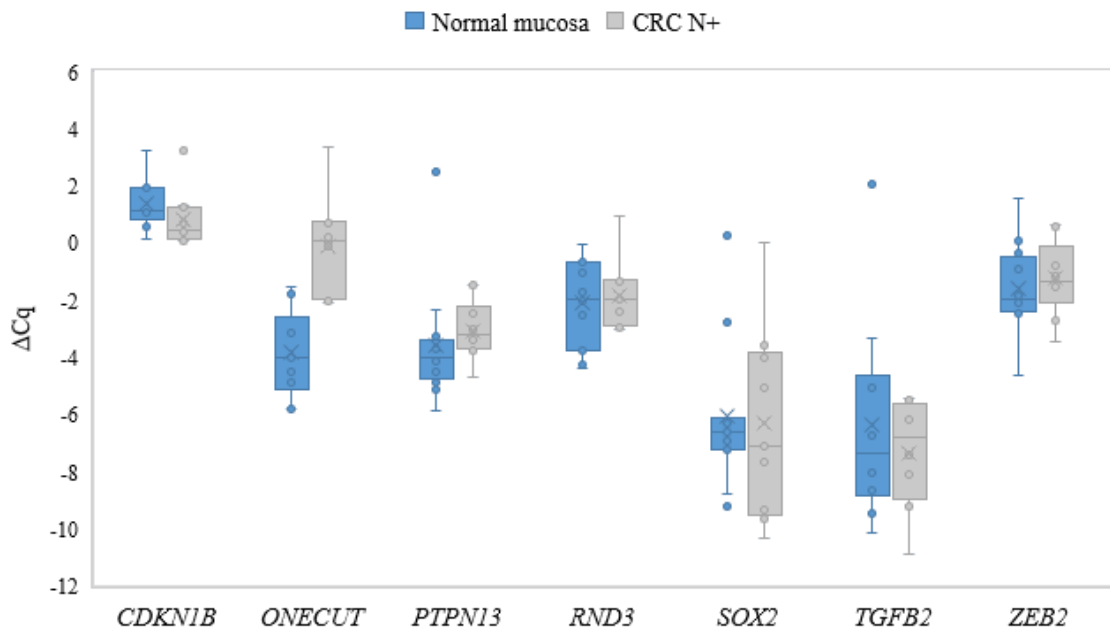


Слика 11а. Експресија miRNK у карциному са нодалним метастазама у поређењу са експресијом miRNK у нормалној слузници.

Експресија циљних гена miRNK била је хетерогенија код CRC-а N+ него код аденома и CRC-а N0. PTPN13, ONECUT, SOX2 и RND3 гени били су повишено регулисани, а TGFB2, ZEB2 и CDKN1B гени показали су смањење регулације код

CRC-a N+ у поређењу са поменутом регулагиијом код одговарајућих нормалних слузница. Статистичка значајност постигнута је само у случају CDKN1B (~ 1,5 пута, $p = 0,017$) и ONCECUT (~ 13,1 пута, $p = 0,018$) гена.

Резултати су сумирани на слици 116.



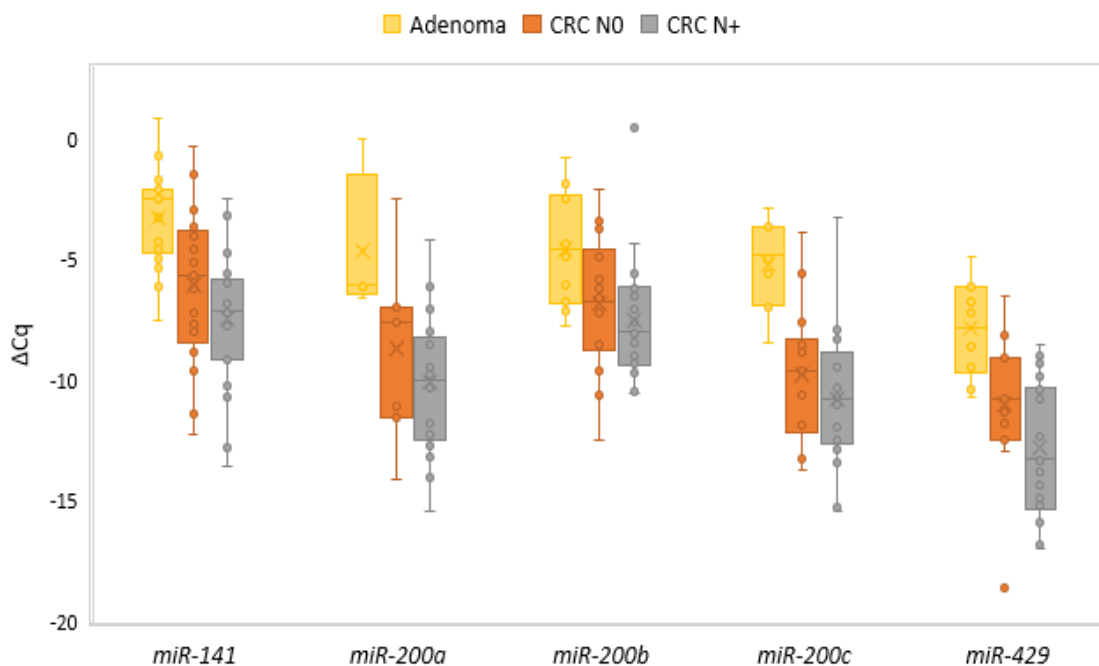
Слика 116. Експресија циљних гена у карциному са нодалним метастазама у поређењу са експресијом циљних гена у нормалној слузници.

Спирманов коефицијент корелације (engl. Spearman's correlation coefficient) показао је да су miR -200a, miR -200c и miR -141 гени изражени у негативној корелацији са TGFB2 геном у CRC-у N+ ($r_s = -0,841$, $p = 0,005$; $r_s = -0,765$, $p = 0,016$; $r_s = -0,668$, $p = 0,049$; респективно).

6.9 Експресија miRNK и њихових циљних гена у аденомима у поређењу са експресијом miRNK и њихових циљних гена у карциномима

Приметили смо статистички значајну разлику у обрасцима експресије породице miR-200 и њихових циљних гена када су аденоми упоређени са CRC-ом N0 или CRC-ом N+. Четири miRNK различито су експримиране између аденома и CRC-a N0 или CRC-a N+ (miR-200a, $p = 0,026$ и $p < 0,001$, респективно; miR-200c, $p = 0,001$ и $p < 0,001$, респективно; miR-141, $p = 0,007$ и $p < 0,001$, респективно; miR-429, $p = 0,011$ и $p < 0,001$, респективно), док је miR-200b ген био различито изражен само између аденома и CRC-a N+ ($p = 0,003$).

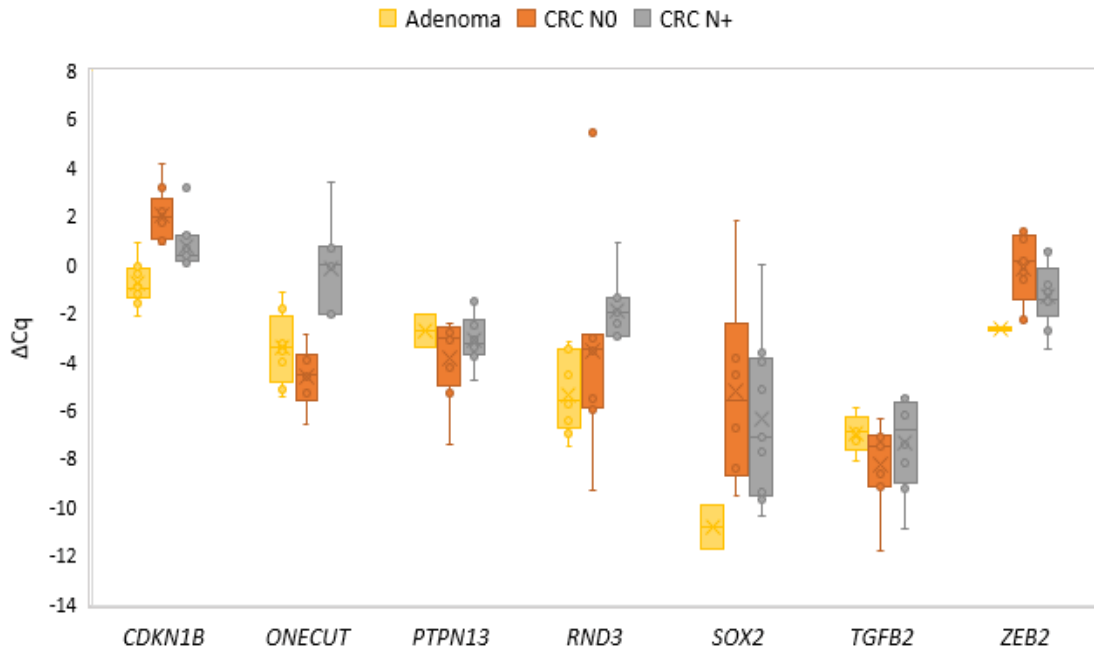
Резултати су сумирани на слици 12а.



Слика 12а. Експресија miRNK у аденомима у поређењу са експресијом miRNK у карциномима.

За разлику од miRNK, једини miRNK циљани ген, који је био различито изражен између аденома и оба типа карцинома, CRC-а N0 и CRC-а N+, био је CDKN1B ($p < 0,001$ и $p = 0,001$, респективно). Код аденома, такође је примећена диференцијална експресија у поређењу са експресијом у CRC-у N0 за ZEB2 ($p = 0,034$) и SOX2 ($p = 0,046$) гене, а у поређењу са експресијом у CRC-у N+ за ONECUT2 ($p = 0,006$) и RND3 ($p < 0,001$) гене.

Резултати су сумирани на слици 12б.

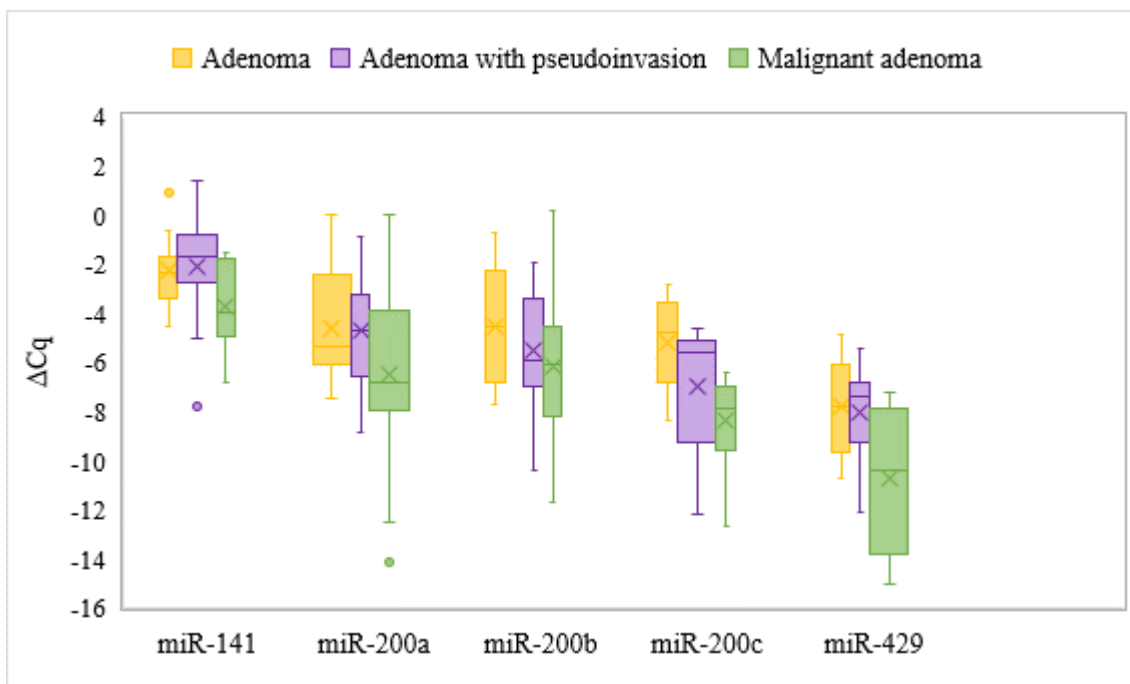


Слика 126. Експресија циљних гена у аденомима у поређењу са експресијом циљних гена у карциномима.

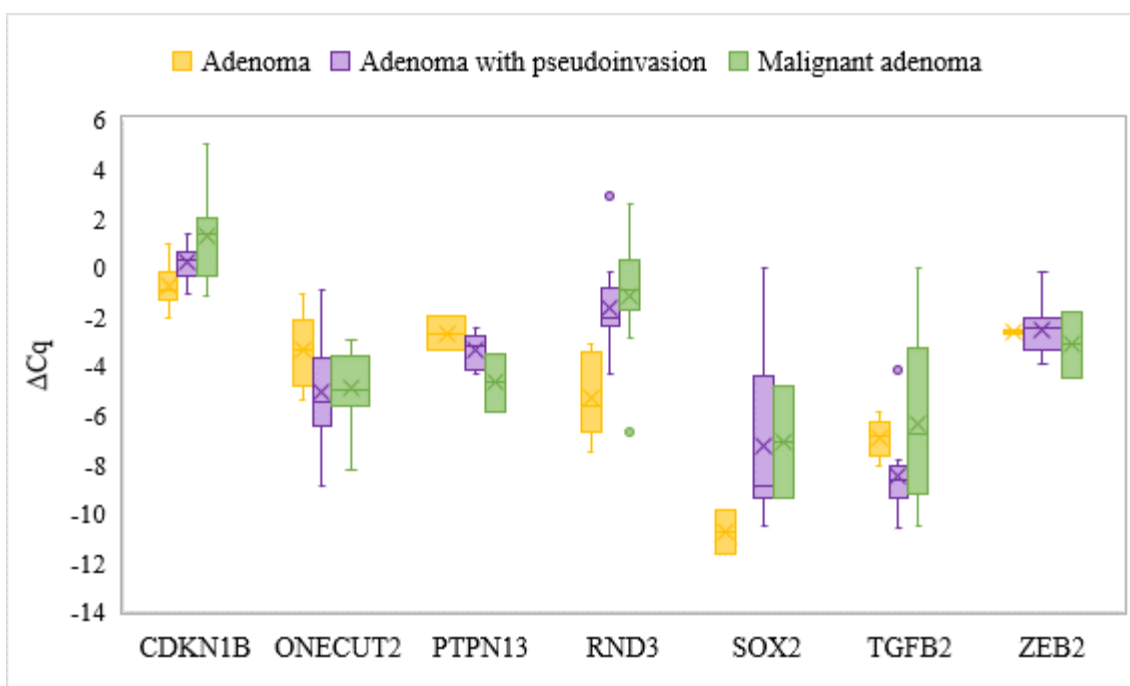
6.10 Експресија miRNK и њихових циљних гена у аденому са псеудоинвазијом у поређењу са експресијом miRNK и њихових циљних гена у аденому и раном карциному

Приметили смо статистички значајну повишену регулацију miR-141 ($p = 0,051$) и miR-429 ($p = 0,030$) гена у раном карциному у поређењу са њиховом регулацијом у аденому са псеудоинвазијом. Сличан образац експресије примећен је за PTPN13 ген ($p = 0,019$), док је експресија CDKN1B гена у раном карциному била регулисана нагоре у поређењу са експресијом у аденому са псеудоинвазијом ($p = 0,051$).

Резултати су сумирани на сликама 13а и 13б.



Слика 13а. Експресија miRNK у аденомима са псеудоинвазијом у поређењу са експресијом miRNK у аденому и раном карциному

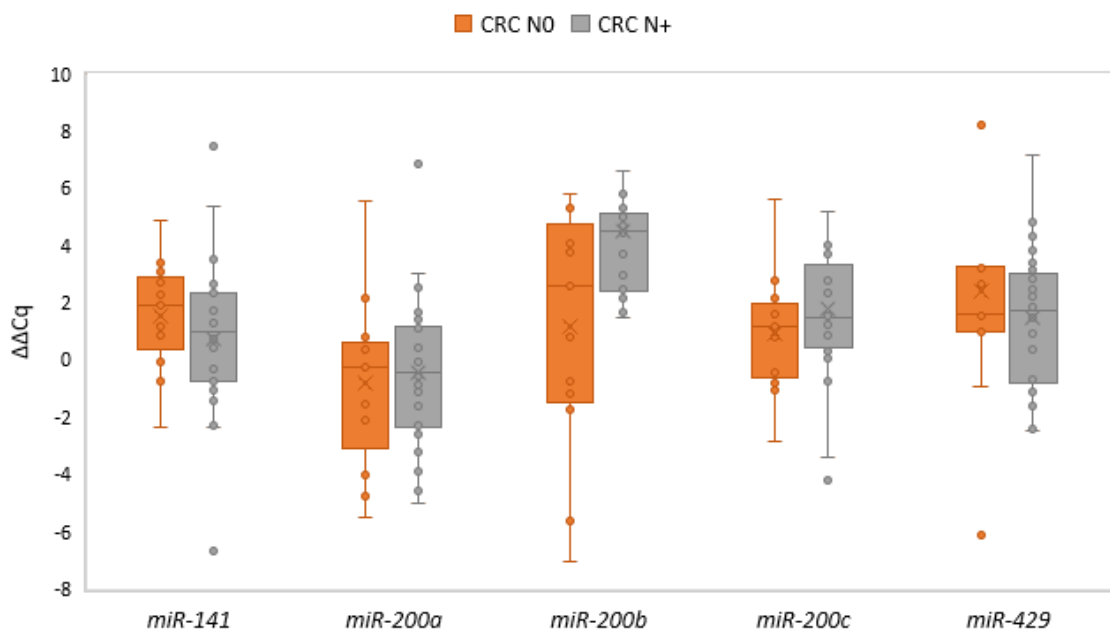


Слика 13б. Експресија циљних гена у аденомима са псеудоинвазијом у поређењу са експресијом циљних гена у аденому и раном карциному.

6.11 Експресија miRNK и њихових циљних гена у карциному са нодалним метастазама у поређењу са експресијом miRNK и њихових циљних гена у карциному без нодалних метастаза

Експресија miRNK и њихових циљних гена у карциному нормализованом на нормалну слузницу упоређена је међусобно, односно CRC N0 и CRC N+. Испоставило се да нема значајне промене у експресији испитиваних miRNK између CRC-а N+ и CRC-а N0, осим експресије miR-200b гена.

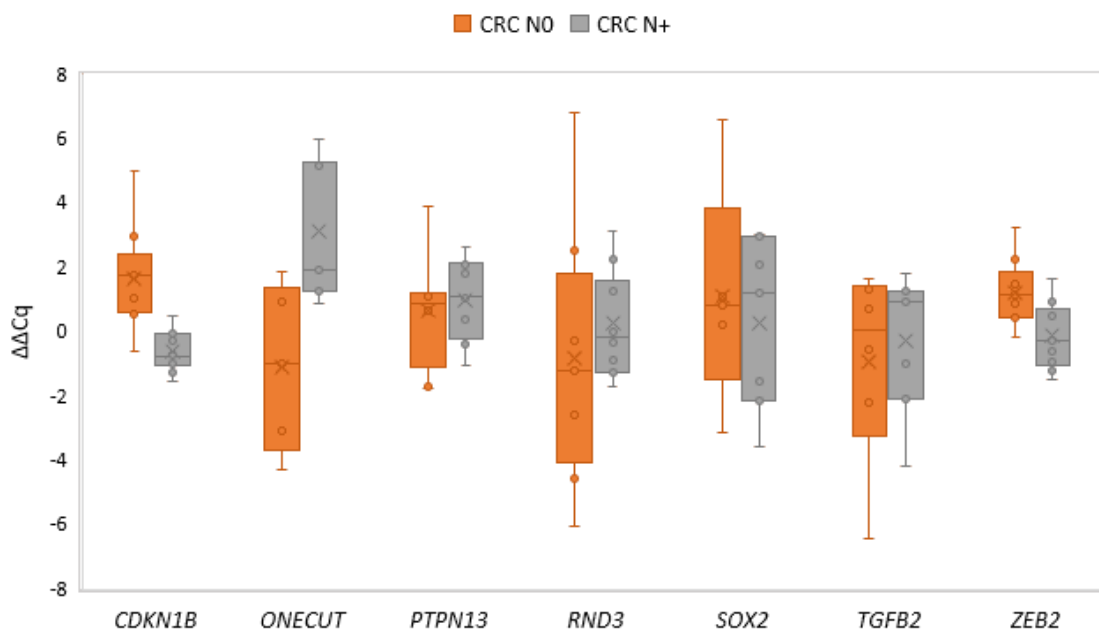
Резултати су сумирани на слици 14а.



Слика 14а. Експресија miRNK у карциномима са нодалним метастазама у поређењу са експресијом miRNK у карциномима без нодалних метастаза.

Циљни гени породице miR-200, ONECUT2 показали су повећање регулације у CRC-у N+ у поређењу са регулацијом у CRC-у N0 ($p = 0,028$), док су ZEB2 и CDKN1B гени показали смањење регулације у CRC-у N+ у поређењу са регулацијом у CRC-у N0 ($p = 0,038$ и $p = 0,001$, респективно).

Резултати су сумирани на слици 14б.



Слика 146. Експресија циљних гена у карциномима са нодалним метастазама у поређењу са експресијом циљних гена у карциномима без нодалних метастаза.

6.12 Експресија породице miR-200 и њених циљних гена у карциному са серозном инвазијом и без серозне инвазије у поређењу са експресијом породице miR-200 и њених циљних гена у нормалној слузници

Користећи *Willcoxon Rank* тест приметили смо значајну повишену регулацију *ONECUT2* гена у целом туморском ткиву у поређењу са регулацијом у одговарајућој нормалној слузници ($p = 0.028$). Ниједна друга miRNK, нити mRNK нису биле различито експримиране. Узорци су подељени у две групе, на основу статуса серозне инвазије. Нисмо запазили битне разлике у изражавању свих miRNK у туморском ткиву без серозне инвазије у поређењу са изражавањем свих miRNK у одговарајућој нормалној слузници. Такође, опазили смо и то да циљни гени нису били значајно измењени. Исто важи и за тумор са серозном инвазијом.

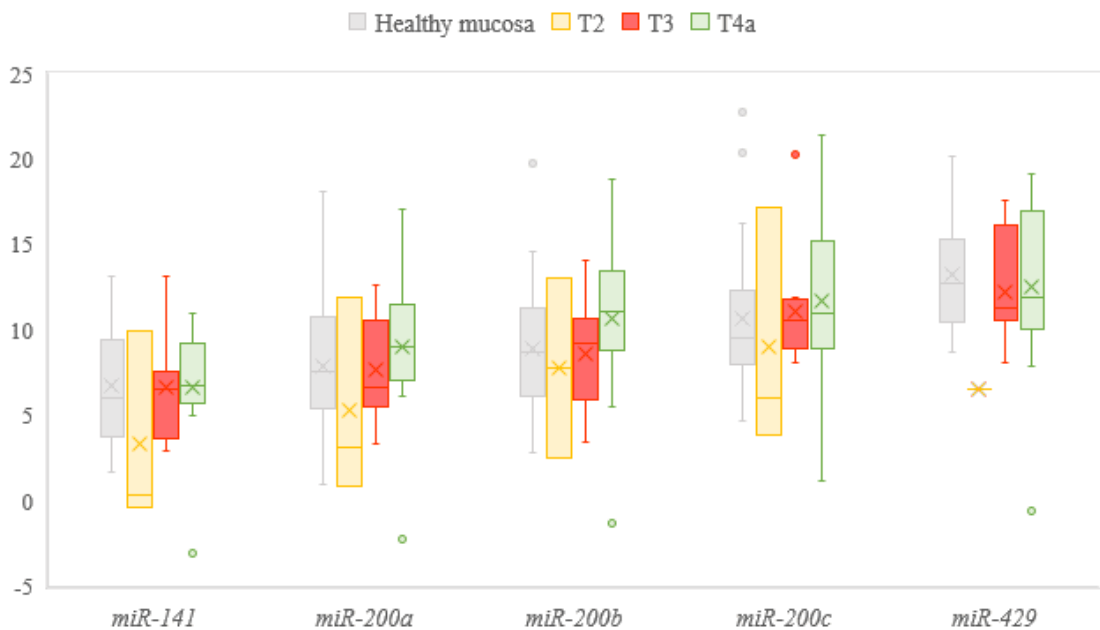
Даље, користили смо *Mann-Whitney* тест и ΔCq како би упоредили експресију анализираних транскрипата у свим нормалним узорцима слузокоже ($n = 33$) са узорцима CRC-а T2 ($n = 4$), CRC-а T3 ($n = 14$) и CRC-а T4 ($n = 15$). Уочили смо статистички значајну промену експресије за miR-429 ген у CRC-у T2 ($p = 0,031$), за *ONECUT2* ген ($p = 0,035$) у CRC-у T3 и *ONECUT2* ($p = 0,006$), *ZEB2* ($p = 0,017$) и *SOX2* гене ($p = 0,025$) у CRC-у T4. Спиарманов коефицијент корелације даље је показао повезаност експресије *ONECUT2* гена из нормалне слузнице са T2, T3 и T4 CRC-а ($Rho = 0.621$, $p = 0.001$).

6.13 Експресија miRNK и њихових циљних гена у карциному са серозном инвазијом и карциному без серозне инвазије

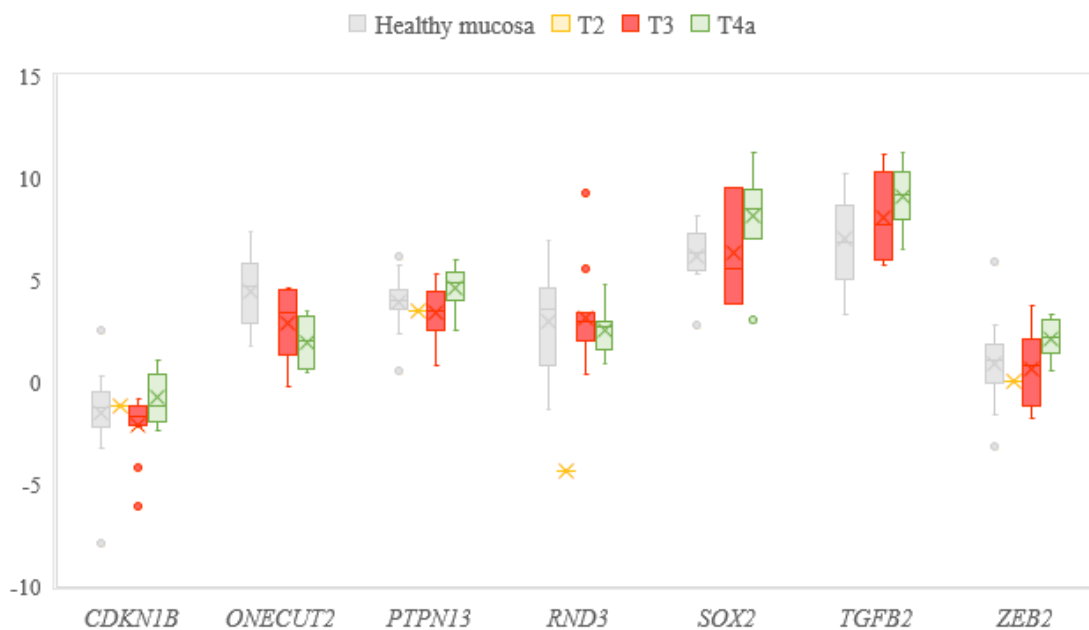
Даље, користили смо *Mann-Whitney* тест и ΔCq да упоредимо експресију анализираних транскрипата између CRC-а T2, CRC-а T3 и CRC-а T4. Уочили смо статистички значајну промену израза за PTPN13 ($p = 0,037$) и ZEB2 ($p = 0,017$) гене.

Резултати су сумирани на сликама 15а и 15б.

Експресија у карциному, која је претходно нормализована на нормалној слузници ($\Delta\Delta Cq$), такође је упоређена између CRC-а T2, CRC-а T3 и CRC-а T4. Испоставило се да није било значајних промена у експресији испитиваних miRNK, па ни mRNK.



Слика 15а. Експресија miRNK у карциномима са серозном инвазијом и карциномима без серозне инвазије.



Слика 156. Експресија циљних гена у карциномима са серозном инвазијом и карциномима без серозне инвазије.

6.14 Експресија Е-кадхерина и његова корелација са експресијом miRNK и mRNK

Све испитиване miRNK показале су снижену регулацију, док су сви њихови циљни гени показали повишену регулацију у узорцима CRC-а, када се упореде они са фокалним или slabим губитком бојења Е-кадхерином са онима са очуваним изражавањем (нормално бојење). Статистички значајна промена у експресији примећена је у случају свих miRNK ($p = 0,036$ за miR-141, $p = 0,003$ за miR-200a, $p = 0,014$ за miR-200b, $p = 0,003$ за miR-200c, $p = 0,034$ за miR-429), као и у случају SOX2 гена ($p = 0,05$).

6.15 Корелације између miRNK и њихових циљних гена у свим узорцима

Уочене су бројне корелације између експресије miRNK и експресије њихових циљних гена. Изненађујуће, примећене су и корелације између експресије одређених miRNK и гена који још нису функционално потврђени као мета за ту одређену miRNK.

Све уочене корелације сумиране су у табели 2.

| | <i>CDKN1B</i> | <i>ONECUT2</i> | <i>PTPN13</i> | <i>RND3</i> | <i>SOX2</i> | <i>TGFB2</i> | <i>ZEB2</i> | Е-кадхерин |
|-------------------|---------------|----------------|---------------|---------------|-------------|--------------|-------------|-------------------|
| <i>miR-200a</i> | -0,360 | -0,395 | / | -0,325 | / | / | / | 0,474 |
| <i>miR-200b</i> | / | / | / | -0,384 | / | / | / | 0,400 |
| <i>miR-200c</i> | -0,503 | / | / | -0,337 | / | / | / | 0,484 |
| <i>miR-141</i> | / | / | / | -0,351 | / | / | / | 0,355 |
| <i>miR-429</i> | / | / | / | -0,347 | / | / | / | 0,363 |
| Е-cadherin | / | / | / | / | 0,521 | / | / | 1 |

Табела 2. Корелација између експресије miRNK и експресије њихових циљних гена.

Додатно, експресија miR-200b ($r_s = -0,499$, $p < 0,001$) и miR-429 ($r_s = -0,287$, $p = 0,014$) гена била је у негативној корелацији са тежином болести (нормална слузница, аденом, CRC N0 и CRC N+). Када су узорци подељени у само три групе (нормална слузница, аденом и CRC), примећена је корелација тежине болести са експресијом већег броја miRNK и њихових циљних гена, наиме miR-200b ($r_s = -0,620$, $p < 0,001$), miR -200c ($r_s = -0,401$, $p < 0,001$), miR -141 ($r_s = -0,420$, $p < 0,001$), miR -429 ($r_s = -0,522$, $p < 0,001$) и CDKN1B ($r_s = 0,377$, $p = 0,007$), PTPN13 ($r_s = -0,426$, $p = 0,006$) и RND3 ($r_s = 0,467$, $p = 0,016$) гена.

7 Дискусија

Колоректална канцерогенеза: од нормалне слузнице до аденома и карцинома са нодалним метастазама и карцинома без нодалних метастаза

Колоректални карцином један је од водећих узрока смрти повезаних са малигним туморима у свету. Иако је морталитет поступно опадао у многим земљама (58 – 60), приближно 60% пацијената са CRC-ом ће у време постављања дијагнозе имати локализоване, али удаљене метастазе, што је лош прогностични параметар (60). ЕМТ појавила се као важан механизам у канцерогенези, али њена улога у CRC-у остаје само делимично схваћена. Потпуна ЕМТ обично се опажа само у добро контролисаним експерименталним условима, на пример у ћелијским линијама, док се ретко примећује код хуманих тумора (34, 61).

У овој студији, претпоставили смо да је током канцерогенезе CRC-а индукована парцијална (делимична) ЕМТ. Делимична ЕМТ примећује се када туморске ћелије стекну мезенхимске карактеристике, које се могу доказати различитим имунохистохемијским и молекуларним анализама, али њихов епителни фенотип (морфологија) остаје и даље сачуван. Наше претходне студије показале су то да употреба једног епителног или мезенхималног маркера или неколико њих, као алата за анализу ЕМТ-а у целини није прикладна (34, 36), стога смо користили неколико ЕМТ маркера (Е-кадхерин, породица miR-200 и њихови циљни гени) у корелацији са ћелијском морфологијом. Наши резултати подржавају хипотезу која говори о томе да ЕМТ игра важну улогу у CRC-у и у његовом развоју и напредовању, али само као делимична ЕМТ. Наша анализа укључивала је нормалну слузницу дебелог црева, аденом, малигни аденом, аденом са псеудоинвазијом и CRC са нодалним метастазама и CRC без нодалних метастаза. Такође, истражили смо експресију ових маркера на CRC са серозном лезијом и CRC без серозне инвазије.

У овој студији, најпре смо анализирали експресију чланова породице miR-200 и њених циљних гена, који су демонстрирани као један од кључних регулатора ЕМТ-а у различитим експерименталним и људским студијама (34, 35, 61). Доказ делимичне ЕМТ индукције додатно је поткрепљен имунохистохемијском анализом Е-кадхерина.

7.1 Имунохистохемијска експресија Е-кадхерина

Губитак експресије Е-кадхерина сматра се обележјем ЕМТ-а. Е-кадхерин, кључни протеин за адхезију ћелија са трансмембранским молекулом, члан је породице функционално повезаних трансмембранских гликопротеина, који посредују у Ca^{2+} зависној међућелијској адхезији. Адхезија се посредује интеракцијом са суседним ћелијама преко њихових N-терминалних ектодомана. Цитоплазматски терминални реп Е-кадхерина везује се посебно за β -катенин, који се директно веже за цитоскелетни актин, што помаже при састављању епителних ћелијских плоча. Губитак његове експресије или функције умањује контакте ћелија–ћелија, што доводи до нарушавања међућелијске сигнализације, али не и до директне трансформације тумора.

У овој студији, имунохистохемијска анализа Е-кадхерина показала је фокални губитак или ослабљену експресију у делу испитаних аденома и CRC-а, што је било у корелацији са смањеном регулацијом свих чланова породице miR-200. Слично претходним студијама о експресији Е-кадхерина (64), приметили смо да је бојење очувано у нормалној слuzници и већини аденома и карцинома, са преовлађујућом мембранозном имунореактивношћу. Ипак, у неколико случајева аденома (аденоми високог степена) и неких CRC-а дошло је до фокалног губитка имунореактивности. За разлику од наших резултата, претходна студија показала је то да нема разлике између експресије протеина у туморима и експресије протеина у нормалној слuzници. Међутим, у другој студији објављено је слично запажање запажању представљеном у нашој студији и доказано је то да се Е-кадхерин експримира у свим колоректалним аденомима и карциномима, с тим да је у половини случајева заступљен са смањеном експресијом (65).

Наша студија стога сугерише то да се ЕМТ индукује током канцерогенезе CRC-а низом регулација гена породице miR-200, што резултира фокалним губитком или слабом експресијом Е-кадхерина, која се често може уочити у делимичној ЕМТ, у којој ћелије пролазно добијају максимум пластичност и постизжу хибридни епителни-мезенхимални фенотип (66). Иако ови резултати снажно указују на индукцију ЕМТ-а у CRC-у, један критеријум за потпуну ЕМТ није испуњен, а то је морфологија. Када смо извршили микроскопску анализу морфологије CRC-а и аденома у поређењу са имунохистохемијом Е-кадхерина, открили смо да су сви случајеви задржали епителиоидну морфологију, чак и они са смањеном експресијом Е-кадхерина. Ниједан од испитиваних аденома или CRC-а није имао морфологију вретенастих ћелија, било у централним деловима или на инвазивном фронту. Спојеви ћелија–ћелија повезују епителне ћелије, које су поларизоване и разликују епител од других ткива. Насупрот томе, мезенхимске ћелије нису поларизоване и не поседују ћелијско–ћелијске везе. Оне су, стога, у стању да мигрирају кроз ванћелијски матрикс, инвадирају околно ткиво и одупру

се апоптози. У току комплетне ЕМТ, епителне ћелије подвргавају се опсежним променама, губе поларитет, кидају севезе ћелија–ћелија (тј. губитак функционалног Е-кадхерина) и реорганизују свој цитоскелет, што резултира променом морфологије и настанком вретенастих ћелија. Све ове промене доводе до раздвајања ћелија и повећања њихове покретљивости, посебно ћелија на инвазивном фронту (9, 61, 67 – 73).

7.2 Одређени маркери ЕМТ-а су испод границе детекције

У нашој студији, нисмо могли открити експресију одређених ЕМТ маркера. Прво, нисмо успели да откријемо експресију miR-205 гена у узорцима ткива нормалне слузнице дебелог црева, аденома или CRC-а. Иако постоје неке објављене студије о експресији miR-205 гена у експерименталним моделима CRC-а, само су неке од њих описале експресију овог гена у узорцима ткива пацијената са CRC-ом (74 – 76). У свима тим студијама, miR-205 ген био је снижен, детектован на свеже смрзнутим ткивима.

Чланови породице miR-200 гена посматрани су не само као регулатори ЕМТ-а, већ и као регулатори транскрипционих фактора ЕМТ-а, на пример ZEB1 и ZEB2 гени. Међутим, ZEB1 ген био је испод границе детекције у нашим узорцима, док је ZEB2 ген био изражен. У случају ЕМТ транскрипционих фактора, постоји могућа разлика у просторно-временској експресији, у зависности од контекста ткива и типа тумора (61). Чланови исте породице фактора транскрипције ЕМТ-а могу чак имати и антагонистичке функције. Надаље, показано је то да је активација било којег појединачног транскрипцијског фактора ЕМТ-а довољна да изазове делимичну/непотпуну ЕМТ, а одсуство специфичних фактора транскрипције ЕМТ-а не може се сматрати доказом одсуства ЕМТ-а (77). Такође, нисмо успели да откријемо циљани гене miR-200b и WAVE3, укључене у ремоделирање цитоскелета актина, који учествује у контроли облика ћелије (78).

7.3 Породица miR-200 и њени циљни гени у аденому у поређењу са породицом miR-200 и њених циљних гена у нормалној слузници дебелог црева и карциному

Према теорији настанка CRC-а, тј. секвенца аденом–карцином, колоректална карциногенеза укључује два корака: трансформацију конвенционалног аденома у рани карцином и инвазивни раст раног карцинома до CRC-а. Иако се ретко објављују анализе експресије miRNK у колоректалним аденомима, додатне информације о дисрегулираној експресији miRNK током ових

прогресија могле би бити од помоћи за идентификацију улоге miRNK у овој секвенци (79).

Једно од ограничења наше студије је различитост, тј. немогућност упоређивања експресије између аденома, CRC-а и нормалне слузнице. Код испитиваних аденома, који су углавном одстрањени ендоксопски, нормална слузница често није присутна или је присутна у врло малим количинама. Насупрот томе, код пацијената са CRC-ом дебело црево је ресецирано и сви ресецирани узорци садржали су нормалну слузницу. Сваки узорак CRC-а стога је упоређен са одговарајућом нормалном слузницом, као узорци упареног ткива, коришћењем *Willcoxon Rank* теста. Насупрот томе, аденоми су упоређивани са нормалним узорцима слузнице ресецираних узорака CRC-а, као независне групе узорака, користећи *Mann-Whitney* тест. Разлика у генетској позадини, коју треба уклонити поређењем упарених узорака ткива, могла би довести до варијације у процени промена у експресији аденома у поређењу са експресијом у нормалној слузници.

Друго ограничење односи се на „нормалне“ узорке, који врло често представљају значајан проблем у људским истраживањима. Пошто се здраво дебело црево не ресецира, не може се добити заиста нормална слузница. У нашој студији, „нормални“ узорци узети су најмање 20 cm удаљености од тумора и нису показали микроскопске абнормалности. Међутим, генетске и протеинске аберације могу бити присутне у морфолошки нормалној слузници (80), иако се чини мало вероватним да се ЕМТ активира у таквим узорцима. Стога, верујемо да се, упркос одређеним ограничењима, ови узорци могу користити као одговарајући контролни узорци за превазилажење разлика у генетској позадини. Штавише, поред тумора, разне инфламаторне болести, инфаркт итд., могу такође бити индикација за операцију дебелог црева. Међутим, приликом проучавања ЕМТ-а, ови узорци не би могли бити прикладни, односно не би их могли користити као тзв. „нормалне“ контролне узорке, будући да се ЕМТ може активирати и код ових болести.

Наше истраживање показало је то да су сви чланови породице miR-200 гена имали повећану експресију у аденомима у поређењу са експресијом у нормалној слузници. У литератури, за разлику од CRC-а, постоје ограничени подаци о експресији породице miR-200 гена у колоректалним аденомима, а ретке објављене студије показале су то да miR-200a и miR-200c гени нису значајно промењени у ткиву аденома у поређењу са ткивом нормалне слузнице (81). Већина циљних гена (*CDKN1B*, *PTPN13*, *RND3*, *SOX2* и *ZEB2*) била је снижена у аденому у поређењу са нивоима регулације ових гена у нормалној слузници. Штавише, *PTPN13*, *SOX2* и *ZEB2* гени показали су детектабилну експресију само у два случаја од десет случајева аденома, док су *ONECUT2* и *TGFB2* гени били повишено регулисани. Постоје ограничени подаци о експресији циљних гена породице miR-200 у колоректалном аденому, а према нашим сазнањима, до сада су истраживани само *CDKN1B* и *SOX2* гени, искључујући студије о диспластичним лезијама код

инфламаторних болести црева. Имунохистохемијска анализа SOX2 гена показала је то да је изражен у мањини случајева аденома и сви су били са дисплазијом високог степена (82, 83). Слично, два случаја представљена у овој студији, која су показала експресију SOX2 гена (такође показују експресију PTPN13 и ZEB2 гена), били су аденоми са дисплазијом високог степена.

Наши резултати, стога, указују на то да инверзна експресија породице miR-200 и ZEB2 гена може допринети диференцијацији/пролиферацији ћелија, такође, током колоректалне канцерогенезе, као што је већ описано у случају неурона (84). CDKN1B ген изражен је у свим случајевима аденома; међутим, објављени подаци ограничени су и према њима CDKN1B ген није изражен у приближно 20% аденома и карцинома (85) и његова експресија не мења се значајно током секвенце аденом–карцином / прогресије у CRC (86).

Једини ген који је био у корелацији са свим испитиваним miRNK био је RND3, такође познат као RhoE. RND3 ген игра кључну улогу у заустављању дистрибуције ћелијског циклуса, инхибирању ћелијског раста и изазивању апоптозе и диференцијације и укључен је у процесе, као што су пролиферација и миграција кроз преуређивање цитоскелета. Иако се чини да је овај протеин различито промењен у зависности од контекста тумора, показано је то да аберантна експресија RND3 гена може бити водећи узрок метастаза тумора и резистенције на хемотерапију, а може бити и ген са протумоуригеном улогом (87, 88).

Сходно реченом, у тумору и суседним нормалним ткивима узоркованих од 202 пацијента са CRC-ом, укључујући 80 нодалних метастаза, анализирана је експресија RND3 гена помоћу имунохистохемије. Изражавање овог гена било је значајно повезано са дубином инвазије, метастазама у лимфним чворовима и удаљеним метастазама. Оно што је најважније, преживљавање без болести и укупно преживљавање били су знатно нижи за пацијенте са RND3 позитивним туморима, него за пацијенте са RND3 негативним туморима (89).

Када се упореди експресија породице miR-200 гена између CRC-а и нормалне слузнице, осим miR-200a, експресија свих осталих чланова miR-200 била је повећана. Експресија циљних гена била је различита између експресије у групама CRC N0 и CRC N+. Можда је прилично интересантна била регулација ONECUT2 гена, која указује на његову потенцијалну улогу у прогресији CRC-а.

7.4 Породица miR-200 и њени циљни гени у карциному са нодалним метастазама у поређењу са породицом miR-200 и њених циљних гена у карциному без нодалних метастаза

Сматра се да је смањена регулација породице miR-200 гена у корелацији са губитком епитела и повећањем фенотипа сличног мезенхиму у пределу инвазивног дела, што доводи до повећане инвазивности туморских ћелија CRC-а, доприносећи тако миграцији кроз ванћелијски матрикс, колонизацији лимфног чвора и метастатском потенцијалу (90).

Један од најважнијих аспеката CRC-а су његови метастатски капацитети. Стога смо анализирали допринос ЕМТ-а развоју чворних метастаза. С обзиром на то да инвазивна својства и метастатски потенцијал нису еквивалентни функционални изрази (77), упоредили смо случајеве CRC-а без нодалних метастаза и оне са нодалним метастазама. Нашли смо статистички значајну горњу *in* регулацију miR-200b гена у CRC-у са нодалним метастазама у поређењу са *in* регулацијом CRC-а без нодалних метастаза, што имплицира улогу miRNK и, вероватно, ЕМТ-а у прогресији CRC-а. Ово запажање и уочена потенцијално инвазивна улога miR-200b гена у CRC-у сугеришу на допринос miR-200b инвазивним и метастатским својствима CRC-а. Експресија miR-200b и miR-429 гена такође је била у корелацији са рТНМ фазом CRC-а, што даље сугерише њихову улогу у прогресији CRC-а.

У претходним студијама, објављено је то да би и miR-200b и miR-429 гени могли допринети метастатском потенцијалу CRC-а (91 – 93), штавише, повећана регулација miR-141 гена доприноси развоју удаљених метастаза у раку дојке (94). У нашој студији, истраживали смо циљне гене CDKN1B, ONECUT2, RPTN13, SOX2, GTFB2, WAVE3, ZEB1 и ZEB2 из породице miR-200. Занимљиво је то да су само CDKN1B, ONECUT2 и ZEB2 циљни гени различито изражени у CRC-у без нодалних метастаза у поређењу са њиховом израженошћу у CRC-у са нодалним метастазама. ZEB2 и CDKN1B циљни су гени породице miR-200b, за које се верује да имају улогу промовисања тумора у CRC, а ONECUT2 је циљни ген породице miR-429. (95). У претходној студији показано је то да код CRC-а губитак протеина p27, кодиран од стране CDKN1B гена, вероватно промовише метастазе у лимфним чворовима и корелира са лошом прогнозом (96).

Наше запажање у односу на CDKN1B ген у складу је са претходно објављеном студијом, у којој је показано то да је смањена експресија CDKN1B гена у корелацији са лошом прогнозом за пацијенте са CRC-ом. Користећи експерименталне моделе, показано је то да miR-429 ген поништава ЕМТ индукован TGF- β ометајући ONECUT2 ген у ћелијама CRC-а (97). Међутим, према нашим сазнањима, ово је први извештај о укључености ONECUT2 гена у људски

метастатски потенцијал CRC-а. Насупрот томе, већ је објављено то да ZEB2, који је један од првих идентификованих циљни гена породице miR-200, промовише метастатски потенцијал тумора и корелира са лошом прогнозом за развој CRC-а код људи (98 – 100). Уочили смо инверзну експресију miR-200b и ZEB2 гена у CRC-у са нодалним метастазама у поређењу са њиховом експресијом у CRC-у без нодалних метастаза, што додатно подржава претпостављену интеракцију ZEB/miR-200 гена у канцерогенези CRC-а (100).

7.5 Аденом са псеудоинвазијом

Упркос добро дефинисаним морфолошким критеријумима за аденом са псеудоинвазијом и аденом са инвазијом, постоји значајан број лезија са двосмисленим карактеристикама, које доводе до различитих дијагностичких мишљења међу патолозима (16, 101). У сврху разликовања тих лезија – аденома са епителном погрешном поставком (псеудоинвазија) и аденома са раним карциномом (права инвазија), потребни су биомаркери. У нашој студији, претпоставили смо да је аденом са псеудоинвазијом генетски сличан аденому, а да је аденом са раним карциномом сличан аденокарциному. Анализирали смо експресију породице miR-200 и њених циљних гена у аденому са псеудоинвазијом у поређењу са њиховом експресијом у аденому и аденому са раним карциномом.

Прилично је занимљив налаз статистички значајне *down* регулације miR-141, miR-429 и RPTN13 гена и повећане регулације CDKN1B гена у раном карциному у поређењу са поменутиим регулацијама у аденомима са епителном погрешном поставком. Такође, приметили смо смањење регулације miR-200c и miR-429 и повећање регулације CDKN1B и RND3 гена у раном карциному у поређењу са поменутиим регулацијама у аденому. Надаље, открили смо смањење регулације TGFβ гена и повећање регулације RND3 и CDKN1B гена у аденому са псеудоинвазијом у поређењу са поменутиим регулацијама у аденому.

7.6 Карцином са серозном инвазијом

Најзначајнији прогностички фактор у CRC-у је ТНМ стадијум успостављен у складу са регулацијама постављеним од стране IJCC-а и AJCC-а. Стога ТНМ има кључну улогу у терапијском доношењу одлука о CRC-у. CRC је подељен у четири фазе, према дубини инвазије у зид црева (Т1-рТ4а-б), где Т4 CRC има најмање повољан исход са највећим стопама метастаза. Будући да је захватање серозе важан негативан прогностички фактор у CRC-у, кључно је разликовање Т3 и Т4а CRC-а.

Наша студија показала је постепено повећање експресије ONECUT2 гена са нормалне слузнице на pT2, pT3 и pT4 тип CRC-а. Осим тога, приметили смо статистички значајну разлику у експресији miR-429, ONECUT2, ZEB2 и SOX2 гена у најмање једном CRT стадијуму у односу на њихову експресију у нормалној слузници.

Поред тога, постојала је значајна разлика у експресији PTPN13 и ZEB2 гена између pT2 и pT3 типа CRC-а и CRC-а са серозном инвазијом (pT4a).

Наши резултати пружају доказе тога да је EMT укључен у прогресију CRC-а, укључујући и серозну инвазију. Смањена експресија PTPN13 гена у напредном CRC-у указује на потенцијалну супресорску улогу тумора PTPN13 гена, барем у погледу серозне инвазије.

7.7 Породица miR-200 и хетерогеност колоректалног аденокарцинома

Упоредили смо експресију породице гена miR-200 у централним деловима тумора и инвазивном фронту и открили њихову снижену регулацију на инвазивном фронту у 73% случајева. Међутим, разлика је била значајна само за miR-200b ген. Овај налаз додатно подржава концепт ИТН-а, чак и на нивоу miRNK (36). Утврђено је да је miR-200b сген мањен у ћелијама пулољака тумора (engl. tumour budding) на инвазивном фронту у 71% случајева (102) и верује се да има улогу промовисања тумора у CRC-у, циљајући RND3 и CDKN1B гене (34).

Поред miR-200b гена, неколико објављених података, такође, описује смањену експресију miR-200c гена на инвазивном делу тумора у метастатским случајевима CRC-а (102 – 104). Поред тога, откривено је да су miR-200a, miR-200b и miR-200c гени такође снижено регулисани на инвазивном фронту случајева CRC-а, са деградираном базалном мембраном (90), али у литератури постоје ограничени подаци о експресији miR-141 и miR-429 гена на инвазивном фронту. Сматра се да је смањена регулација породице miR-200 гена у корелацији са губитком епителних карактеристика и повећањем фенотипа сличног мезенхиму на инвазивном фронту, што доводи до повећане инвазивности ћелија CRC-а, доприносећи тако миграцији кроз екстрацелуларни матрикс, колонизацији лимфног чвора и метастатском потенцијалу (105).

Постоје ограничени подаци о експресији кодирајућих и/или некодирајућих гена на инвазивном фронту у поређењу са њиховом експресијом у центру тумора. Претходне студије (90, 104) и наши налази указују на градијент експресије породице miR-200 гена у вези са ИТН. Међутим, недавне публикације извештавају

о ИТН-у углавном у контексту мутације, варијације броја копија и статуса метилације (106 – 108). ИТН укључује просторни и временски ИТН, морфолошки ИТН, клонални ИТН (изведен из геномске нестабилности) и неклонски ИТН (изведен из интеракција у микроокружењу). Пошто се верује да је ИТН уско повезан са прогресијом рака, резистенцијом на терапију и рецидивом, важно је узети у обзир различите врсте ИТН-а приликом истраживања механизма прогресије рака, прогнозе и могућности лечења (36).

8 Закључак

При поређењу експресије породице miR-200 и њихових циљних гена у аденому и CRC-у са нодалним метастазама и CRC-у без нодалних метастаза открили смо до три обрасца. Први образац примећен је код аденома у поређењу са нормалном слузницом; други и супротан првом примећен је у CRC-у у поређењу са аденомом; трећи образац примећен је у случајевима CRC-а са нодалним метастазама. Занимљиво је да су све испитиване miRNK биле снижене у случајевима са смањеном експресијом E-кадхерина и углавном су биле снижене на инвазивном фронту у поређењу са њиховом експресијом у централним деловима тумора. Наши резултати, стога, указују на то да је парцијални ЕМТ најрелевантнији ЕМТ облик у CRC-у.

Поређењем експресије породице miR-200 и њихових циљних гена у аденому са псеудоинвазијом и раним карциномом показано је смањење регулације породице miR-200 и RPTN13 гена и повећање регулације CDKN13 гена у раном карциному у поређењу са поменутиим регулацијама у аденомоу и аденому са погрешним постављањем епитела. Наши резултати у складу су са претпостављеном улогом ЕМТ-а у прогресији аденома у рани CRC.

Поређење експресије породице miR-200 и њихових циљних гена у карциному са серозном инвазијом и њихове експресије у карциному без серозне инвазије, такође је у складу са укључивањем ЕМТ-а у прогресију CRC-а. Осим тога, смањена експресија RPTN13 гена у напредном CRC-у указује на његову потенцијалну улогу као супресора тумора.

9 ЛІТЕРАТУРА

1. 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.
2. 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):E359-86.
3. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell.* 1990;61(5):759-67.
4. To KK, Tong CW, Wu M, Cho WC. MicroRNAs in the prognosis and therapy of colorectal cancer: From bench to bedside. *World J Gastroenterol.* 2018;24(27):2949-73.
5. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature.* 2012;487(7407):330-7.
6. Pino MS, Chung DC. The chromosomal instability pathway in colon cancer. *Gastroenterology.* 2010;138(6):2059-72.
7. Zhang B, Wang J, Wang X, Zhu J, Liu Q, Shi Z, et al. Proteogenomic characterization of human colon and rectal cancer. *Nature.* 2014;513(7518):382-7.
8. Nieto MA, Huang RY, Jackson RA, Thiery JP. EMT: 2016. *Cell.* 2016;166(1):21-45.
9. Cao H, Xu E, Liu H, Wan L, Lai M. Epithelial-mesenchymal transition in colorectal cancer metastasis: A system review. *Pathol Res Pract.* 2015;211(8):557-69.
10. Inamura K. Colorectal Cancers: An update on their molecular pathology. *Cancers (Basel).* 2018;10(1).
11. East JE, Atkin WS, Bateman AC, Clark SK, Dolwani S, Ket SN, et al. British Society of Gastroenterology position statement on serrated polyps in the colon and rectum. *Gut.* 2017;66(7):1181-96.
12. Nagtegaal ID, Odze RD, Klimstra D, Paradis V, Rugge M, Schirmacher P, et al. The 2019 WHO classification of tumours of the digestive system. *Histopathology.* 2020;76(2):182-8.
13. Muto T, Bussey HJ, Morson BC. Pseudo-carcinomatous invasion in adenomatous polyps of the colon and rectum. *J Clin Pathol.* 1973;26(1):25-31.

14. Loughrey MB, Shepherd NA. Problematic colorectal polyps: is it cancer and what do I need to do about it? *Surg Pathol Clin*. 2017;10(4):947-60.
15. Panarelli NC, Somarathna T, Samowitz WS, Kornacki S, Sanders SA, Novelli MR, et al. Diagnostic challenges caused by endoscopic biopsy of colonic polyps: a systematic evaluation of epithelial misplacement with review of problematic polyps from the Bowel Cancer Screening Program, United Kingdom. *Am J Surg Pathol*. 2016;40(8):1075-83.
16. Griggs RK, Novelli MR, Sanders DS, Warren BF, Williams GT, Quirke P, et al. Challenging diagnostic issues in adenomatous polyps with epithelial misplacement in bowel cancer screening: 5 years' experience of the Bowel Cancer Screening Programme Expert Board. *Histopathology*. 2017;70(3):466-72.
17. Chand M, Keller DS, Mirnezami R, Bullock M, Bhangu A, Moran B, et al. Novel biomarkers for patient stratification in colorectal cancer: A review of definitions, emerging concepts, and data. *World J Gastrointest Oncol*. 2018;10(7):145-58.
18. Arnold M, Sierra MS, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality. *Gut*. 2017;66(4):683-91.
19. Biomarkers Definitions Working G. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther*. 2001;69(3):89-95.
20. Das V, Kalita J, Pal M. Predictive and prognostic biomarkers in colorectal cancer: A systematic review of recent advances and challenges. *Biomed Pharmacother*. 2017;87:8-19.
21. Lin JS, Piper MA, Perdue LA, Rutter CM, Webber EM, O'Connor E, et al. Screening for colorectal cancer: updated evidence report and systematic review for the US Preventive Services Task Force. *Jama*. 2016;315(23):2576-94.
22. Condrat CE, Thompson DC, Barbu MG, Bugnar OL, Boboc A, Cretoiu D, et al. miRNAs as biomarkers in disease: latest findings regarding their role in diagnosis and prognosis. *Cells*. 2020;9(2).
23. Frankel WL, Jin M. Serosal surfaces, mucin pools, and deposits, oh my: challenges in staging colorectal carcinoma. *Mod Pathol*. 2015;28 Suppl 1:S95-108.
24. Lu J, Hu X, Meng Y, Zhao H, Cao Q, Jin M. The prognosis significance and application value of peritoneal elastic lamina invasion in colon cancer. *PLoS One*. 2018;13(4):e0194804.
25. Panarelli NC, Schreiner AM, Brandt SM, Shepherd NA, Yantiss RK. Histologic features and cytologic techniques that aid pathologic stage assessment of colonic adenocarcinoma. *Am J Surg Pathol*. 2013;37(8):1252-8.

26. Hay ED. An overview of epithelio-mesenchymal transformation. *Acta Anat (Basel)*. 1995;154(1):8-20.
27. Thiery JP, Sleeman JP. Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2006;7(2):131-42.
28. Thiery JP, Acloque H, Huang RY, Nieto MA. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell*. 2009;139(5):871-90.
29. Kalluri R. EMT: when epithelial cells decide to become mesenchymal-like cells. *J Clin Invest*. 2009;119(6):1417-9.
30. Hur K, Toiyama Y, Takahashi M, Balaguer F, Nagasaka T, Koike J, et al. MicroRNA-200c modulates epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) in human colorectal cancer metastasis. *Gut*. 2013;62(9):1315-26.
31. Petrova YI, Schecterson L, Gumbiner BM. Roles for E-cadherin cell surface regulation in cancer. *Mol Biol Cell*. 2016;27(21):3233-44.
32. Yang J, Weinberg RA. Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis. *Dev Cell*. 2008;14(6):818-29.
33. Gregory PA, Bert AG, Paterson EL, Barry SC, Tsykin A, Farshid G, et al. The miR-200 family and miR-205 regulate epithelial to mesenchymal transition by targeting ZEB1 and SIP1. *Nat Cell Biol*. 2008;10(5):593-601.
34. Zidar N, Boštjančič E, Gale N, Kojc N, Poljak M, Glavač D, et al. Down-regulation of microRNAs of the miR-200 family and miR-205, and an altered expression of classic and desmosomal cadherins in spindle cell carcinoma of the head and neck--hallmark of epithelial-mesenchymal transition. *Hum Pathol*. 2011;42(4):482-8.
35. Zidar N, Boštjančič E, Jerala M, Kojc N, Drobne D, Štabuc B, et al. Down-regulation of microRNAs of the miR-200 family and up-regulation of Snail and Slug in inflammatory bowel diseases - hallmark of epithelial-mesenchymal transition. *J Cell Mol Med*. 2016;20(10):1813-20.
36. Stanta G, Bonin S. Overview on clinical relevance of intra-tumor heterogeneity. *Front Med (Lausanne)*. 2018;5:85.
37. Dunne PD, Alderdice M, O'Reilly PG, Roddy AC, McCorry AMB, Richman S, et al. Cancer-cell intrinsic gene expression signatures overcome intratumoural heterogeneity bias in colorectal cancer patient classification. *Nat Commun*. 2017;8:15657.
38. Galván JA, Zlobec I, Wartenberg M, Lugli A, Gloor B, Perren A, et al. Expression of E-cadherin repressors SNAIL, ZEB1 and ZEB2 by tumour and stromal cells influences tumour-budding phenotype and suggests heterogeneity of stromal cells in pancreatic cancer. *Br J Cancer*. 2015;112(12):1944-50.

39. Denisov EV, Skryabin NA, Gerashchenko TS, Tashireva LA, Wilhelm J, Buldakov MA, et al. Clinically relevant morphological structures in breast cancer represent transcriptionally distinct tumor cell populations with varied degrees of epithelial-mesenchymal transition and CD44(+)CD24(-) stemness. *Oncotarget*. 2017;8(37):61163-80.
40. Pillai RS. MicroRNA function: multiple mechanisms for a tiny RNA? *Rna*. 2005;11(12):1753-61.
41. Kim YK, Kim VN. Processing of intronic microRNAs. *Embo J*. 2007;26(3):775-83.
42. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*. 2004;116(2):281-97.
43. Pillai RS, Bhattacharyya SN, Filipowicz W. Repression of protein synthesis by miRNAs: how many mechanisms? *Trends Cell Biol*. 2007;17(3):118-26.
44. Ying SY, Chang DC, Lin SL. The microRNA (miRNA): overview of the RNA genes that modulate gene function. *Mol Biotechnol*. 2008;38(3):257-68.
45. Scott MS, Ono M. From snoRNA to miRNA: Dual function regulatory non-coding RNAs. *Biochimie*. 2011;93(11):1987-92.
46. Miyoshi K, Miyoshi T, Siomi H. Many ways to generate microRNA-like small RNAs: non-canonical pathways for microRNA production. *Mol Genet Genomics*. 2010;284(2):95-103.
47. Zamore PD, Haley B. Ribo-gnome: the big world of small RNAs. *Science*. 2005;309(5740):1519-24.
48. Perera RJ, Ray A. MicroRNAs in the search for understanding human diseases. *BioDrugs*. 2007;21(2):97-104.
49. Williams AE. Functional aspects of animal microRNAs. *Cell Mol Life Sci*. 2008;65(4):545-62.
50. Markou A, Liang Y, Lianidou E. Prognostic, therapeutic and diagnostic potential of microRNAs in non-small cell lung cancer. *Clin Chem Lab Med*. 2011;49(10):1591-603.
51. Esteller M. Non-coding RNAs in human disease. *Nat Rev Genet*. 2011;12(12):861-74.
52. Kaikkonen MU, Lam MT, Glass CK. Non-coding RNAs as regulators of gene expression and epigenetics. *Cardiovasc Res*. 2011;90(3):430-40.

53. Wapinski O, Chang HY. Long noncoding RNAs and human disease. *Trends Cell Biol.* 2011;21(6):354-61.
54. Jay C, Nemunaitis J, Chen P, Fulgham P, Tong AW. miRNA profiling for diagnosis and prognosis of human cancer. *DNA Cell Biol.* 2007;26(5):293-300.
55. Blenkiron C, Miska EA. miRNAs in cancer: approaches, aetiology, diagnostics and therapy. *Hum Mol Genet.* 2007;16 Spec No 1:R106-13.
56. Cho WC. MicroRNAs: potential biomarkers for cancer diagnosis, prognosis and targets for therapy. *Int J Biochem Cell Biol.* 2010;42(8):1273-81.
57. Zhang B, Pan X, Cobb GP, Anderson TA. microRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *Dev Biol.* 2007;302(1):1-12.
58. Salvatore L, Imperatori M, Arnoldi E, Carnaghi C, Cordio S, Cosimelli M, et al. Management of patients with early-stage colon cancer: guidelines of the Italian Medical Oncology Association. *ESMO Open.* 2020;5(6):e001001.
59. Center MM, Jemal A, Ward E. International trends in colorectal cancer incidence rates. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2009;18(6):1688-94.
60. Siegel R, Desantis C, Jemal A. Colorectal cancer statistics, 2014. *CA Cancer J Clin.* 2014;64(2):104-17.
61. Stemmler MP, Eccles RL, Brabletz S, Brabletz T. Non-redundant functions of EMT transcription factors. *Nat Cell Biol.* 2019;21(1):102-12.
62. Onder TT, Gupta PB, Mani SA, Yang J, Lander ES, Weinberg RA. Loss of E-cadherin promotes metastasis via multiple downstream transcriptional pathways. *Cancer Res.* 2008;68(10):3645-54.
63. Bruner HC, Derksen PWB. Loss of E-cadherin-dependent cell-cell adhesion and the development and progression of cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2018;10(3).
64. Bezdekova M, Brychtova S, Sedlakova E, Langova K, Brychta T, Belej K. Analysis of Snail-1, E-cadherin and claudin-1 expression in colorectal adenomas and carcinomas. *Int J Mol Sci.* 2012;13(2):1632-43.
65. Kroepil F, Fluegen G, Totikov Z, Baldus SE, Vay C, Schauer M, et al. Down-regulation of CDH1 is associated with expression of SNAI1 in colorectal adenomas. *PLoS One.* 2012;7(9):e46665.
66. Jolly MK, Mani SA, Levine H. Hybrid epithelial/mesenchymal phenotype(s): The 'fittest' for metastasis? *Biochim Biophys Acta Rev Cancer.* 2018;1870(2):151-7.

67. Goossens S, Vandamme N, Van Vlierberghe P, Berx G. EMT transcription factors in cancer development re-evaluated: beyond EMT and MET. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*. 2017;1868(2):584-91.
68. Iwatsuki M, Mimori K, Yokobori T, Ishi H, Beppu T, Nakamori S, et al. Epithelial-mesenchymal transition in cancer development and its clinical significance. *Cancer Sci*. 2010;101(2):293-9.
69. Prieto-García E, Díaz-García CV, García-Ruiz I, Agulló-Ortuño MT. Epithelial-to-mesenchymal transition in tumor progression. *Med Oncol*. 2017;34(7):122.
70. Bryant DM, Mostov KE. From cells to organs: building polarized tissue. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008;9(11):887-901.
71. Acloque H, Thiery JP, Nieto MA. The physiology and pathology of the EMT. Meeting on the epithelial-mesenchymal transition. *EMBO Rep*. 2008;9(4):322-6.
72. Gurzu S, Silveanu C, Fetyko A, Butiurca V, Kovacs Z, Jung I. Systematic review of the old and new concepts in the epithelial-mesenchymal transition of colorectal cancer. *World J Gastroenterol*. 2016;22(30):6764-75.
73. Findlay VJ, Wang C, Watson DK, Camp ER. Epithelial-to-mesenchymal transition and the cancer stem cell phenotype: insights from cancer biology with therapeutic implications for colorectal cancer. *Cancer Gene Ther*. 2014;21(5):181-7.
74. Orang AV, Safaralizadeh R, Hosseinpour Feizi MA, Somi MH. Diagnostic and prognostic value of miR-205 in colorectal cancer. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2014;15(9):4033-7.
75. Li P, Xue WJ, Feng Y, Mao QS. MicroRNA-205 functions as a tumor suppressor in colorectal cancer by targeting cAMP responsive element binding protein 1 (CREB1). *Am J Transl Res*. 2015;7(10):2053-9.
76. Boulagnon-Rombi C, Schneider C, Leandri C, Jeanne A, Grybek V, Bressenot AM, et al. LRP1 expression in colon cancer predicts clinical outcome. *Oncotarget*. 2018;9(10):8849-69.
77. Brabletz T, Kalluri R, Nieto MA, Weinberg RA. EMT in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2018;18(2):128-34.
78. Humphries B, Yang C. The microRNA-200 family: small molecules with novel roles in cancer development, progression and therapy. *Oncotarget*. 2015;6(9):6472-98.
79. Eizuka M, Osakabe M, Sato A, Fujita Y, Tanaka Y, Otsuka K, et al. Dysregulation of microRNA expression during the progression of colorectal tumors. *Pathol Int*. 2020;70(9):633-43.

80. Polley AC, Mulholland F, Pin C, Williams EA, Bradburn DM, Mills SJ, et al. Proteomic analysis reveals field-wide changes in protein expression in the morphologically normal mucosa of patients with colorectal neoplasia. *Cancer Res.* 2006;66(13):6553-62.
81. Wang X, Chen L, Jin H, Wang S, Zhang Y, Tang X, et al. Screening miRNAs for early diagnosis of colorectal cancer by small RNA deep sequencing and evaluation in a Chinese patient population. *Onco Targets Ther.* 2016;9:1159-66.
82. Talebi A, Kianersi K, Beiraghdar M. Comparison of gene expression of SOX2 and OCT4 in normal tissue, polyps, and colon adenocarcinoma using immunohistochemical staining. *Adv Biomed Res.* 2015;4:234.
83. Miller TJ, McCoy MJ, Hemmings C, Iacopetta B, Platell CF. Expression of PD-L1 and SOX2 during rectal tumorigenesis: potential mechanisms for immune escape and tumour cell invasion. *Oncol Lett.* 2018;16(5):5761-8.
84. Pandey A, Singh P, Jauhari A, Singh T, Khan F, Pant AB, et al. Critical role of the miR-200 family in regulating differentiation and proliferation of neurons. *J Neurochem.* 2015;133(5):640-52.
85. Arber N, Hibshoosh H, Yasui W, Neugut AI, Hibshoosh A, Yao Y, et al. Abnormalities in the expression of cell cycle-related proteins in tumors of the small bowel. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1999;8(12):1101-5.
86. Ohuchi M, Sakamoto Y, Tokunaga R, Kiyozumi Y, Nakamura K, Izumi D, et al. Increased EZH2 expression during the adenoma-carcinoma sequence in colorectal cancer. *Oncol Lett.* 2018;16(4):5275-81.
87. Jie W, Andrade KC, Lin X, Yang X, Yue X, Chang J. Pathophysiological functions of Rnd3/RhoE. *Compr Physiol.* 2015;6(1):169-86.
88. Paysan L, Piquet L, Saltel F, Moreau V. Rnd3 in cancer: a review of the evidence for tumor promoter or suppressor. *Mol Cancer Res.* 2016;14(11):1033-44.
89. Zhou J, Yang J, Li K, Mo P, Feng B, Wang X, et al. RhoE is associated with relapse and prognosis of patients with colorectal cancer. *Ann Surg Oncol.* 2013;20(1):175-82.
90. Paterson EL, Kazenwadel J, Bert AG, Khew-Goodall Y, Ruzkiewicz A, Goodall GJ. Down-regulation of the miRNA-200 family at the invasive front of colorectal cancers with degraded basement membrane indicates EMT is involved in cancer progression. *Neoplasia.* 2013;15(2):180-91.
91. Lv Z, Wei J, You W, Wang R, Shang J, Xiong Y, et al. Disruption of the c-Myc/miR-200b-3p/PRDX2 regulatory loop enhances tumor metastasis and chemotherapeutic resistance in colorectal cancer. *J Transl Med.* 2017;15(1):257.

92. Han Y, Zhao Q, Zhou J, Shi R. miR-429 mediates tumor growth and metastasis in colorectal cancer. *Am J Cancer Res.* 2017;7(2):218-33.
93. Sun Y, Shen S, Tang H, Xiang J, Peng Y, Tang A, et al. miR-429 identified by dynamic transcriptome analysis is a new candidate biomarker for colorectal cancer prognosis. *Omics.* 2014;18(1):54-64.
94. Debeb BG, Lacerda L, Anfossi S, Diagaradjane P, Chu K, Bambhroliya A, et al. miR-141-mediated regulation of brain metastasis from breast cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2016;108(8).
95. Fu Y, Liu X, Zhou N, Du L, Sun Y, Zhang X, et al. MicroRNA-200b stimulates tumour growth in TGFBR2-null colorectal cancers by negatively regulating p27/kip1. *J Cell Physiol.* 2014;229(6):772-82.
96. Li JQ, Miki H, Wu F, Saoo K, Nishioka M, Ohmori M, et al. Cyclin A correlates with carcinogenesis and metastasis, and p27(kip1) correlates with lymphatic invasion, in colorectal neoplasms. *Hum Pathol.* 2002;33(10):1006-15.
97. Lu YX, Yuan L, Xue XL, Zhou M, Liu Y, Zhang C, et al. Regulation of colorectal carcinoma stemness, growth, and metastasis by an miR-200c-Sox2-negative feedback loop mechanism. *Clin Cancer Res.* 2014;20(10):2631-42.
98. Sreekumar R, Harris S, Moutasim K, DeMateos R, Patel A, Emo K, et al. Assessment of nuclear ZEB2 as a biomarker for colorectal cancer outcome and TNM risk stratification. *JAMA Netw Open.* 2018;1(6):e183115.
99. Li MZ, Wang JJ, Yang SB, Li WF, Xiao LB, He YL, et al. ZEB2 promotes tumor metastasis and correlates with poor prognosis of human colorectal cancer. *Am J Transl Res.* 2017;9(6):2838-51.
100. Brabletz S, Brabletz T. The ZEB/miR-200 feedback loop--a motor of cellular plasticity in development and cancer? *EMBO Rep.* 2010;11(9):670-7.
101. Hauptman N, Boštjančič E, Žlajpah M, Ranković B, Zidar N. Bioinformatics analysis reveals most prominent gene candidates to distinguish colorectal adenoma from adenocarcinoma. *Biomed Res Int.* 2018;2018:9416515.
102. Knudsen KN, Lindebjerg J, Nielsen BS, Hansen TF, Sørensen FB. MicroRNA-200b is downregulated in colon cancer budding cells. *PLoS One.* 2017;12(5):e0178564.
103. Muto Y, Suzuki K, Kato T, Tsujinaka S, Ichida K, Takayama Y, et al. Heterogeneous expression of zinc-finger E-box-binding homeobox 1 plays a pivotal role in metastasis via regulation of miR-200c in epithelial-mesenchymal transition. *Int J Oncol.* 2016;49(3):1057-67.

104. Jepsen RK, Novotny GW, Klarskov LL, Christensen IJ, Høgdall E, Riis LB. Investigating intra-tumor heterogeneity and expression gradients of miR-21, miR-92a and miR-200c and their potential of predicting lymph node metastases in early colorectal cancer. *Exp Mol Pathol*. 2016;101(2):187-96.
105. Davalos V, Moutinho C, Villanueva A, Boque R, Silva P, Carneiro F, et al. Dynamic epigenetic regulation of the microRNA-200 family mediates epithelial and mesenchymal transitions in human tumorigenesis. *Oncogene*. 2012;31(16):2062-74.
106. Naxerova K, Reiter JG, Brachtel E, Lennerz JK, van de Wetering M, Rowan A, et al. Origins of lymphatic and distant metastases in human colorectal cancer. *Science*. 2017;357(6346):55-60.
107. Saito T, Niida A, Uchi R, Hirata H, Komatsu H, Sakimura S, et al. A temporal shift of the evolutionary principle shaping intratumor heterogeneity in colorectal cancer. *Nat Commun*. 2018;9(1):2884.
108. Uchi R, Takahashi Y, Niida A, Shimamura T, Hirata H, Sugimachi K, et al. Integrated multiregional analysis proposing a new model of colorectal cancer evolution. *PLoS Genet*. 2016;12(2):e1005778.

Биографија

Др Бранислава Ранковић рођена је 13. јуна 1980. године у Нишу, Република Србија. Основну и средњу школу је завршила у Нишу. Медицински факултет у Нишу уписала је школске 1998/1999 године, а звање доктора медицине стекла је у септембру 2004 године. Након нострификације дипломе започиње специјализацију из области патологије на одељењу за патологију, универзитетског клиничког центра у Марибору. Звање специјалисте патологије је стекла 2014 године. Од јула 2014 године је запошљена на Институту за патологију, медицинског факултета у Љубљани. 2016 године је изабрана у звање асистента. Од 2016 године води одељење за патологију јетре и панкреаса. Део је трансплантацијског тима Еуротранспланта Словеније.

Докторске академске студије уписала је на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, смер физиологија са експерименталном медицином. Аутор и коаутор је више научних радова у српским, словеначким и међународним часописима.

Библиографија

Ranković B, Zidar N, Žlajpah M, Boštjančič E. Epithelial-Mesenchymal Transition-Related MicroRNAs and Their Target Genes in Colorectal Cancerogenesis. *J Clin Med*. 2019 Oct 3;8(10):1603.

Hauptman N, Boštjančič E, Žlajpah M, Ranković B, Zidar N. Bioinformatics Analysis Reveals Most Prominent Gene Candidates to Distinguish Colorectal Adenoma from Adenocarcinoma. *Biomed Res Int*. 2018 Aug 6;2018:9416515.

Ranković B, Limbaeck-Stokin C, Đokić M, Stanisavljević D, Volavšek M. Simultaneous occurrence of pancreatic mixed acinar-ductal adenocarcinoma and primary follicular lymphoma of the duodenum, accompanied by increased number of IgG4 plasma cells in tumor-free parenchyma as concomitant IgG4-related disease or reaction to tumor? A case report. *Pol J Pathol*. 2017;68(1):86-91.

Gavrić A, Dežman R, Ranković B, Ribnikar M, Štabuc B. Nutmeg liver, fever and elevated liver enzymes in a young man. *Gut*. 2019 Oct;68(10):1773-1837.

ИЗЈАВА АУТОРА О ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, Бранислава Ранковић, изјављујем да докторска дисертација под насловом:


Значај епително-мезенхималне транзиције у колоректалној карциногенези

која је одбрањена на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу Универзитета у Крагујевцу представља *оригинално ауторско дело* настало као резултат *сопственог истраживачког рада*.

Овом Изјавом такође потврђујем:

- да сам *једини аутор* наведене докторске дисертације,
- да у наведеној докторској дисертацији *нисам извршио/ла повреду* ауторског нити другог права интелектуалне својине других лица,
- да умножени примерак докторске дисертације у штампаној и електронској форми у чијем се прилогу налази ова Изјава садржи докторску дисертацију истоветну одбрањеној докторској дисертацији.

У Љубљани, 2021 године,


потпис аутора

ИЗЈАВА АУТОРА О ИСКОРИШЋАВАЊУ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, Бранислава Ранковић,

- дозвољавам
 не дозвољавам

Универзитетској библиотеци у Крагујевцу да начини два трајна умножена примерка у електронској форми докторске дисертације под насловом:

Значај епително-мезенхималне транзиције у колоректалној карциногенези

која је одбрањена на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу Универзитета у Крагујевцу, и то у целини, као и да по један примерак тако умножене докторске дисертације учини трајно доступним јавности путем дигиталног репозиторијума Универзитета у Крагујевцу и централног репозиторијума надлежног министарства, тако да припадници јавности могу начинити трајне умножене примерке у електронској форми наведене докторске дисертације путем *преузимања*.

Овом Изјавом такође

- дозвољавам
 не дозвољавам¹

¹ Уколико аутор изабере да не дозволи припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци, то не искључује право припадника јавности да наведену докторску дисертацију користе у складу са одредбама Закона о ауторском и сродним правима.

припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од следећих *Creative Commons* лиценци:

- 1) Ауторство
- 2) Ауторство - делити под истим условима
- 3) Ауторство - без прерада
- 4) Ауторство - некомерцијално
- 5) Ауторство - некомерцијално - делити под истим условима
- 6) Ауторство - некомерцијално - без прерада²

У Љубљани, 2021 године,



потпис аутора

² Молимо ауторе који су изабрали да дозволе припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци да заокруже једну од понуђених лиценци. Детаљан садржај наведених лиценци доступан је на: [http://creativecommons.org/rs/](http://creativecommons.org.rs/)