



**УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ  
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА**

**Мр.сци. мед. др Велимир Милошевић**

**КОРЕЛАЦИЈА ЕКСПРЕСИЈЕ ЛЕПТИН РЕЦЕПТОРА СА  
ПРОЛИФЕРАЦИЈОМ, НЕОАНГИОГЕНЕЗОМ И  
СЕКРЕЦИЈОМ МУЦИНА У КОЛОРЕКТАЛНОМ  
АДЕНОКАРЦИНОМУ**

**Докторска дисертација**

**Крагујевац, 2014.год.**

*Sofiji i Veri*

# САДРЖАЈ

<b>1. УВОД</b> .....	<b>5</b>
<b>2. ПРЕГЛЕД ЛИТЕРАТУРЕ</b> .....	<b>8</b>
<b>2.1. Морфолошко- функционалне карактеристике дебелог цријева</b> .....	<b>8</b>
2.1.1. Морфолошке карактеристике дебелог цријева .....	8
2.1.2. Функционалне карактеристике дебелог цријева .....	11
<b>2.2. Колоректални карцином</b> .....	<b>12</b>
2.2.1. Епидемиологија колоректалног карцинома .....	12
2.2.2. Фактори ризика за настанак колоректалног карцинома .....	14
2.2.3. Колоректална карциногенеза .....	19
2.2.4. Клинички ток колоректалног аденокарцинома .....	23
2.2.5. Дијагностичке процедуре .....	25
2.2.6. Прогноза, лијечење и скрининг колоректалног аденокарцинома .....	37
2.2.7. Биомаркери колоректалног карцинома .....	43
<b>3. ЦИЉ ИСТРАЖИВАЊА</b> .....	<b>52</b>
<b>4. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ</b> .....	<b>53</b>
4.1. Ткивни узорци .....	53
4.2. Методе .....	54
4.2.1. Имунохистохемијски метод .....	54
4.2.2. Статистичка обрада података .....	57
<b>5. РЕЗУЛТАТИ ИСТРАЖИВАЊА</b> .....	<b>59</b>
5.1. Демографске карактеристике испитаника .....	59
5.2. Експресија лептин рецептора и муцинске секреције у испитиваној и контролној групи .....	60
5.2.1. Расподјела експресије лептин рецептора, индекса пролиферације и неоангиогенезе и муцинске секреције према демографским параметрима .....	73
5.3. Макроскопски тип и локализација колоректалног аденокарцинома .....	76
5.3.1. Расподјела експресије лептин рецептора, индекса пролиферације и неоангиогенезе и муцинске секреције према макроскопском типу и локализацији колоректалног карцинома .....	78
5.4. Astler-Coller стадијум тумора и метастазе .....	81
5.4.1. Расподјела експресије лептин рецептора, индекса пролиферације неоангиогенезе и муцинске секреције у односу на Astler Colleger стадијум тумора и метастазе .....	83
5.5. Хистопатолошке карактеристике колоректалног аденокарцинома .....	88
5.5.1. Расподјела лептин рецептора, индекса пролиферације и неоангиогенезе и муцинске секреције према хистопатолошким параметрима тумора .....	92

5.6. Корелациона анализа експресије лептинских рецептора, муцинске секреције, индекса пролиферације и неоангиогенезе и осталих параметара .....	101
5.7. Гранична вриједност (cut off) нуклеарног пролиферативног антигена (Ki67) и маркера ангиогенезе (CD105) у предикцији прогресивне колоректалне карциногенезе .....	104
<b>6. Д И С К У С И Ј А .....</b>	<b>117</b>
6.1. Клиничко-патолошке карактеристике колоректалног карцинома .....	117
6.2. Корелација експресије лептин рецептора са клиничко-патолошким параметрима .....	123
6.2.1. Експресија лептин рецептора (LEPR) .....	123
6.2.2. LEPR експресија и хистолошки градус тумора .....	125
6.2.3. LEPR експресија и стадијум примарног тумора (T) .....	127
6.2.4. LEPR експресија и регионални лимфни чворови и удаљене метастазе .....	128
6.2.5. LEPR експресија, инвазија лимфатика, крвних судова и перинеурална инвазија .....	129
6.2.6. LEPR експресија, лимфоцитни инфилтрат, дезмоплазија и некроза .....	130
6.2.7. LEPR експресија и Astler-Coller стадијум тумора .....	132
6.2.8. LEPR експресија, локализација и макроскопски тип тумора .....	133
6.2.9. LEPR експресија, пол и старост испитаника .....	134
6.3. Корелација LEPR експресије са муцин-хистохемијском експресијом .....	135
6.3.1. Хистохемијска експресија муцина .....	135
6.3.2. LEPR експресија и хистохемијска експресија муцина .....	137
6.4. Корелација експресије лептин рецептора и експресије нуклеарног пролиферативног антигена Ki67 .....	138
6.5. Корелација експресије LEPR и експресије Ендоглина (CD105) .....	140
6.6. Узајамни односи испитиваних варијабли .....	141
<b>7.3 А К Љ У Ч А К .....</b>	<b>146</b>
<b>8. ЛИТЕРАТУРА .....</b>	<b>148</b>

## 1.УВОД

Колоректални карцином је најчесталији малигни тумор гастроинтестиналног тракта. Његова инциденца је последњих година у благом порасту и по процјенама из 2011. и 2012.године, колоректални карцином је трећи најчешће дијагностикован малигни тумор, иза карцинома простате и плућа код мушкараца и иза карцинома дојке и плућа у жена (1,2). Упадљиво повећање инциденце колоректалног карцинома је запажено у земљама у транзицији, нарочито у оним државама које су некада биле у саставу источноевропског комунистичког блока (Мађарска, Чешка, Словачка, Пољска и др).Корелативне епидемиолошке студије високу инциденцу колоректалног карцинома у овим земљама, приписују промјени начина исхране (1,3). У Србији, колоректални карцином представља други најчешћи малигни тумор од кога сваке године оболи око 3800 и умре око 2300 особа оба пола. У 2009 години колоректални карцином је са стопом морталитета од 11,9% представљао други најчешћи узрок смрти, одмах после карцинома плућа код мушкараца и карцинома дојке код жена (4).

У односу на локализацију дистрибуција колоректалног карцинома варира у зависности од студије али већина истраживача је сагласна да се преко двије трећине ових тумора локализује у ректуму и у сигми.(5)

Колоректални карцином је мултифакторска болест која је последица интеракције наследних фактора и фактора околине. Бројне епидемиолошке студије и мета-анализе показују најдоследнију повезаност колоректалног карцинома са гојазношћу, јер је висока инциденца овог тумора уочена у гојазних особа са „western type diet“ (високо калорична храна богата мастима животињског поријекла), са смањеном физичком активношћу и смањеним уносом влакнастих материја (3,6, 7-12) У литератури је потврђено да гојазне особе имају 1.5-3.5 пута већи ризик за настанак колоректалног карцинома у поређењу са нормално ухрањеним особама (7), а процјењује се да је 15-45% смртних случајева у Европи приписано последицама гојазности (8-12).

Кључни молекул у развоју гојазности је лептин, продукт *Ob* гена који је локализован на дужем краку хромозома 7(7q31) (13). Лептин је протеин од 167 аминокиселина, а главно мјесто његове продукције, у одраслих особа, је бијело масно ткиво; истовремено и бројна не-адипозна ткива синтетишу и секретују лептин у малим количинама (14-19). Главна функција лептина је да регулише тјелесну масу путем негативне повратне спреге између адипозног ткива и центра за ситост у хипоталамусу (7,19). Поред тога лептин учествује у регулацији утрошка енергије, у пролиферацији многих нормалних и неопластичних ткива, има улогу у хематопоези и репродукцији (7,14,16,20-22). Лептин се ослобађа циклично, обично 2-3 сата после оброка, а његов полуживот износи 30 минута. Ниво лептина је повишен у серуму гојазних људи, а недавни извјештаји указују да висок ниво лептина у серуму представља независан фактор ризика за настанак колоректалног карцинома (23). Лептин испољава своје дјеловање кроз специфичан рецептор (*LEPR*), који је кодиран од стране *Ob* гена. Лептин рецептори припадају првој класи рецептора цитокинске фамилије, који су идентификовани као протеини са мултиплим изоформама од *LEPRa* до *LEPRf*. Дуга изоформа, *LEPRb*, активира интрацитоплазматске трансдукционе путеве и одговорна је за акције лептина (24,25). Експресија лептин рецептора је откривена у многим ткивима при чему је запажено да лептин има стимулативни ефекат на пролиферацију малигнух ћелија тумора различитих локализација (7-10,15,16-19,21-23).

Бројни извјештаји из литературе указују да лептин игра важну улогу у патогенези и прогресији колоректалног карцинома (26-28). Експресија лептина и лептинских рецептора је откривена у различитим ткивима и при томе је истакнуто да лептин показује стимулативни ефекат на пролиферацију малигнух ћелија тумора различите локализације (7,29-31). У култури ткива је показано да лептин индукује пролиферацију хуманог аденокарцинома желуца на дозно зависан начин (6). На основу свих ових извјештаја се сугерише да лептин служи као мулти-функционални фактор раста у туморској генези и да је способан да промовише рак врло агресивног фенотипа (7,30).

Поред тога, постоји више доказа да лептин има важну улогу у инвазији тумора, метастазирању, ангиогенези и отпорности на хемотерапију (31-33)

Одавно је запажено да, осим неконтролисана пролиферације и неоангиогенезе, током колоректалне карциногенезе настају алтерације у структури и/или количини епителних муцина које узрокују промјене како баријерне функције мукуса тако и поремећај ћелијске

сигналне трансдукције (31,34). Ове промјене у муцинској експресији или гликозилацији утичу на ћелијски раст, диференцијацију, трансформацију, адхезију, инвазивност и имунолошку контролу (35,36). У литератури је усаглашен став да постоји позитивна корелација између малигног биолошког потенцијала диферентованог колоректалног карцинома и секреције ембрионалних сијаломуцина (36-38). Постоји мишљење да се, у случају хиперсекреције и појачане експресије сијаломуцина, смањује адхезивност између малигнућ ћелија па је олакшана инфилтрација зида колоне и рано метастазирање (38). Експериментално је показано да је локално администриран лептин потентан секретарог и да је способан да стимулише гастричну мукосекрецију и секрецију муцинских гликопротеина у колону (39).

Због свега наведеног, задатак ове студије је да испита утицај експресије лептинских рецептора на пролиферативни и на метастатски потенцијал колоректалног аденокарцинома. Обзиром да су о утицају лептинских рецептора (LEPR) на секрецију муцина, подаци у литератури изузетно оскудни (40), то смо, у овом истраживању испитивали и утицај експресије LEPR на хистохемијску експресију муцина.

## **2.ПРЕГЛЕД ЛИТЕРАТУРЕ**

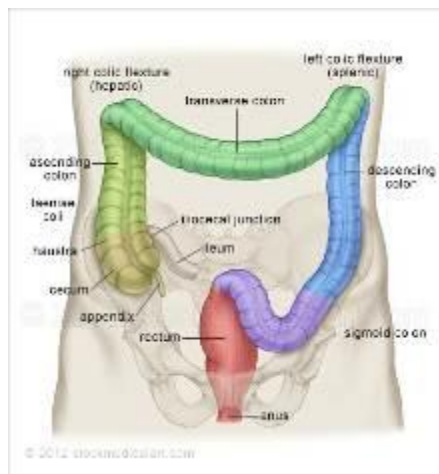
### **2.1.Морфолошко- функционалне карактеристике дебелог цријева**

#### **2.1.1. Морфолошке карактеристике дебелог цријева**

Дебело цријево је завршни дио цријевог канала који се пружа од илеоцекалне валвуле до зупчасте линије у аналном каналу. Дужина дебелог цријева, укључујући и ректум износи око 1,5-2м. Морфолошки јасно издвојени дјелови дебелог цријева су црвуљак, цекум, асцедентни колон, хепатична флексура, трансверзални колон, лијенална флексура, десцедентни колон, сигмоидни колон и ректум.

Црвуљак је слијепи дио дебелог цријева ,који полази од задњег дијела лијевог зида цекума, просјечне дужине око 8цм, али постоје велике индивидуалне варијације.Цекум лежи у десној бедреној јами, и дужине је око 8цм. Асцедентни колон је смјештен у десном бочном дијелу трбушне дупље и дужине је око 10цм , са предње и латералне стране је покривено перитонеумом.Трансверзални колон је најдужи и најмобилнији дио дебелог цријева. Дужине је око 50цм а пружа се попречно од лијевог до десног хипохондријума. Десцедентни колон се усправно спушта од лијеналне флексуре и наставља се на сигмоидни колон. Његова дужина је варијабилна и износи од 12-25цм. Сигмоидни колон има облик латиничног слова “S”, смјештен је у карличној дупљи, а дужина му је варијабилна и износи од 50 па до 100 цм (41).Трансверзални и сигмоидни колон имају свој мезентеријум, док асцедентни и десцедентни колон имају свој мезентеријум свега код 20-22% људи(2).Калибар колона са дужином опада тако да је у почетном дијелу (цекум) 8-9цм, а затим се постепено сужава тако да у попречном колону износи око 5цм, док је у нисходном колону свега 3-4цм.





Слика 1

На спољашној површини дебелог цријева су присутне карактеристичне структуре (42,43):

- уздужне пантљике (*teniae coli*) од лонгитудиналних мишићних влакана, које су ширине око 1цм, дебљине око 2-3мм и пружају се од цекума до сигмоидног колона, док у ректуму нису присутне.
- мјехураста испупчења (*haustreae coli*) која уздижу у виду мјехура дијелове цријевог зида, леже између тенија и дебелом цријеву дају карактеристичан клубчаст изглед.
- попречни жљебови (*sulci transversi*), који на спољној површини дебелог цријева обавијају два сусједна мјехураста испупчења. Они, на луминалној страни дебелог црева, стварају полумјесечасте гребенове (*plicae semilunaris*)
- масне ресице (*appendices epiploicae*) представљају перитонеалне изврате у виду прста на рукавици, који су испуњени машћу.

Горња мезентерична артерија (*a.mesenterica superior*) преко својих десних побочних грана (*a.ileocollica*, *a.collica dextra* и *a.collica media*) васкуларизује апендикс, асцендентни колон и половину трансверзалног колона. Доња мезентерична артерија (*a.meysenterica inferior*) преко својих грана (*a.collica sin.*, *aa. sigmoidae* и *a.rectalis superior*) исхрањује остали дио колона и горњу трећину ректума. Доње двије трећине ректума исхрањују гране *a.iliacae interne* (*a.rectalis media* et *a.rectalis inferior*). Артерије колона се на удаљености од 3-6цм од зида колона (изузев на нивоу ректума) спајају и граде параколичну аркаду, од које се, на размацима од 2-3цм, одвајају артеријске гране које иду до зида колона и које се прије уласка у цријевни зид, подијеле на двије завршне гранчице, за предњу и задњу страну

дебелог цријева. У цјелини посматрано, васкуларизација дебелог цријева је оскудна јер су дуге праве артерије удаљене једна од друге 3-5 цм, а између дугих и кратких правих артерија постоје анастомозе незнатног калибра.

*Вене дебелог цријева* су пратиље истоимених артерија и уливају се у вену порте. Крв из горњег и средњег дијела ректума дренира се преко горње ректалне вене у портни крвоток, док се из доњег дијела ректума венска крв дренира кроз хемороидални плексус преко средње и доње ректалне вене и унутарње илијачне вене у доњу шупљу вену (44).

*Лимфни систем дебелог цријева* чине лимфни судови који одводе лимфу до око тридесетак регионалних лимфних жлијезда (*nodi lymphatici mesocolici*). Из ових жлијезда еферентни лимфни судови одводе лимфу до мезентеријалних жлијезда (*nodi lymphatici mesenterici*)(45,46).

Дебело цријево добија инервацију од целијачног плексуса (*plexus coeliacus*) преко двије његове гране (*plexus mesentericus superior et inferior*). Средњи и доњи дио ректума су инервисани од пелвичног плексуса (41,42). Парасимпатичка инервација дебелог цријева у проксималном дијелу, до лијеналне флекуре долази из *n.vagus-a*. Испод ове границе парасимпатичка влакна потичу од карличног парасимпатичног нерва *n.pelvicus-a*, званог “карлични вагус”.

Зид колона је сачињен из четири слоја: слузнице (*tunica mucosae*), подслузнице (*tunica submucosae*), мишићног слоја (*tunica muscularis*) и серозног омотача (*tunica serosae*).

Слузница (*tunica mucosae*) састоји се из *laminae epithelialis*, *laminae propriae* и *laminae muscularis mucosae*. *Lamina epithelialis* чини једноредан цилиндрични епител, у чијем саставу су ентероцити, пехарасте ћелије и ендокрине ћелије. Површина слузнице је покривена једним слојем нискоцилиндричног до кубичног епитела у који се отварају *Lieberkühn*-ове крипте које се пружају вертикално надоље кроз *lamina propria* и својим дном допиру до *laminae muscularis mucosae*. Дужина крипти износи око 500µм. Испод *laminae epithelialis* се налази подепителни слој (*lamina propria*) сачињен од везивног ткива. Она садржи оскудне лимфоците, плазма ћелије, хистиоците и мастоците. *Lamina propria* испуњава простор између крипти и непосредно испод њих. Она не садржи лимфне судове, тако да малигни тумори ове области не дају лимфогене метастазе, све док не инфилтришу субмукозу. Испод ње је танак мишићни слој (*lamina muscularis mucosae*) (47,48).

Подслузокожа (*tunica submucosae*), је састављена из растреситог везивног ткива и у њој се налазе неурони и нервна влакна субмукозног нервног плексуса.

Мишићни слој (*tunica muscularis*) има два подслоја, унутрашњи (*stratum circulare*) и спољашни, дужни (*stratum longitudinale*). Унутрашњи, кружни слој је дебљи, и у свим својим сегментима је подједнако добро развијен. Спољашни, дужни слој не обухвата цијели обим цријева, већ је ограничен на три макроскопски видљиве лонгитудиналне мишићне траке (*teniae coli*). Између ова два слоја се налази миентерични нервни плексус (*plexus myentericus Auerbachii*)

Серозни омотач (*tunica serosae*) састоји се од везивног ткива које је прекривено једним редом мезотелних ћелија. Серозни омотач на неким мјестима садржи накупине масног ткива груписаног у режњиће (*appendices epiploicae*). (48)

Ћелије дебелог цријева се умножавају и диференцирају из матичних ћелија у доњим дијеловима крипти, а затим мигрирају ка горњим дијеловима да би обновили површинске епителне ћелије. Животни циклус епитела траје од два до четири, а највише шест дана (47,48)

## **2.1.2. Функционалне карактеристике дебелог цријева**

Основне функције дебелог цријева су апсорпција воде, електролита и витамина који се стварају под дејством бактеријске флоре колона. Неке аминокиселине попут триптофана се могу, у малим количинама, апсорбовати кроз слузницу колона. Апсорпција воде, електролита и других супстанци растворљивих у води врши се претежно у асцендентном колону (42,43).

Функција колона је, осим одржавања нивоа течности у организму, и складиштење фекалних материја док се не елиминишу кроз анални отвор. Дебело цријево учествује и у варењу хране али је варење у колону за човјека од малог значаја. У варењу учествују бројне бактерије које варе целулозу и дневно додају тек неколико калорија. Међутим под дејством бактерија се стварају и неке веома важне материје попут витамина К, витамина Б<sub>12</sub>, тиамина, рибофлавина итд. Бактерије које насељавају колон обично нису патогене јер не секретују растворљиве токсине; изузетак је *Clostridium Welchii*, који се умножава у случају цријевне опструкције, када може изазвати гангрену дебелог цријева (43,48).

У дебелом цријеву се разликују сегментационе контракције и перисталтички таласи. Сегментационе контракције мијешају цријевни садржај и омогућују бољи контакт садржаја са слузницом што олакшава апсорпцију. Перисталтички таласи потискују цријевни садржај до терминалног дијела дебелог цријева. Трећи тип контракција који се јављају само у колону су “*mass movements*”. Ови покрети се јављају под дејством рефлекса активираних растезањем желуца односно дуоденума, који се преносе миентеричним плексусом. Надражај самог колона такође може да изазове ове покрете, чиме се дјелимично објашњавају дијареје у болесника са улцерозним колитисом (48,49)

Слузница дебелог цријева секретује мукоидну алкалну течност у којој се налазе вода, слуз и ензими. Слиз садржи велику количину бикарбонатних јона, а контактни надражај пехарстих ћелија је основни импулс за лучење слузи. Овим се спречава механичко оштећење слузокоже цријева под дејством присутног хумусног садржаја и киселина дигестивних бактерија. Епител колона има и екскреторну функцију, којом се објашњава и излучивање тешких метала при тровању (48,50).

Дигестивна улога колона у нормалним условима је минимална, али у опсежној ресекцији танког цријева, помоћу бактеријских ензима се и у колону могу разградити мале количине скроба, масти и бјеланчевина (43,50)

## **2.2. Колоректални карцином**

Колоректални карцином је епителни малигни тумор који настаје у ткиву колона, најдужем дијелу дебелог цријева, или у ткиву ректума, последњем дијелу великог цријева прије аналног отвора (51)

### **2.2.1. Епидемиологија колоректалног карцинома**

Колоректални карцином је најчешћи малигни тумор у развијеним земљама, у популацијама оба пола. Према подацима Светске здравствене организације колоректални карцином се 2008 год налазио на четвртом мјесту са 1,23 милиона новообољелих особа и око 608.000 умрлих болесника. Учешће колоректалног карцинома, на глобалном нивоу, је 9,7% у групи свих обољелих од малигних болести. У мушкој популацији колоректални карцином се по учесталости налазио иза карцинома плућа, простате и желуца, док је у

женкој популацији колоректални карцином трећи најчешћи малигни тумор, иза карцинома дојке и карцинома грлића материце (51).

Упадљиво повећање инциденце колоректалног карцинома је, као што је већ поменуто, запажено у транзиционим земљама, због навика у исхрани и растућој преваленци гојазности. (1,52).

Стопа инциденце карцинома дебелог цријева у земљама Европске уније (ЕУ), према процјенама из 2008 год. се разликовала: најнижа стопа инциденце је била у Грчкој (31/100000 за мушкарце и 21,3/10000 за жене), а највиша у Мађарској (106/100000 за мушкарце и 50,6/100000 за жене) (52). Највећу инциденцу карцинома колоне код мушкараца има Јапан (59,2 на 100000 становника), а код жена Нови Зеланд (28,6 на 100000 становника). Највећу инциденцу малигнух тумора ректума код мушкараца има такође Јапан (27,4 на 100000 становника), код жена Сингапур (12,1 /100000) (3). Земље које се налазе на сјеверу Европе имају већу инциденцу колоректалног карцинома од земаља у централном или јужном дијелу Европе. У Сједињеним Америчким Државама инциденца колоректалног карцинома је већа у бијелаца у односу на црно становништво(52).

Компаративне студије које се баве испитивањем стопе морталитета, истичу да је смртност од колоректалног карцинома у порасту, баш у оним земљама гдје је ризик био традиционално низак (Јапан, Руска Федерација). Највећи пораст морталитета је забиљежен у Азији (Јапан, Хонг Конг, Сингапур) и у централној и источној Европи (Мађарска, Пољска, Израел). Са друге стране, у земљама високог ризика, стопа морталитета показује или стабилизацију (Француска) или опадање, као што је то у САД (3). Овај тренд пада морталитета се приписује увођењу скрининга за рак дебелог цријева, који резултује откривањем и уклањањем преканцерозних лезија. У Сједињеним Америчким Државама препоруке за скрининг рака дебелог цријева први пут су објављене 1997 год, а у Канади су националне смјернице за скрининг колоректалног карцинома издате 2001 год. Процес скрининга карцинома дебелог цријева је тек почео да се уводи у Црној Гори, Србији, источноевропским државама и у Новом Зеланду (52).

Анатомска дистрибуција колоректалног карцинома варира у зависности од студије али се сматра да је најчешћи у ректуму (око 50 %), сигми (око 20%), потом у десном колону (цекум и асценс, око 15%), трансверзуму (10%) и десценсу (око 5%). Већина истраживања је сагласна да је преко двије трећине ових тумора локализовано у ректуму и

сигми (5) Колоректални карцином се најчешће јавља између 60 и 70-те године живота, док мање од 20% случајева настаје прије 50-те године живота. Запажено је да су карциноми који се јављају у млађој животној доби најчешће последица преегзистирајућег улцерозног колитиса или једног од ФАП(фамилијарна аденоматозна полипоза) синдрома. Такође је примијећено да болесници млађи од 40год, чешће имају деснострану локализацију тумора. Операбилност колоректалног карцинома износи око 65%,иноперабилно је око 25%, а просјечно око 10% пацијената одбија операцију (53,54,55).

Петогодишње преживљавање за колоректални карцином, када се болест открије у раном стадијуму, износи 65% у Сјеверној Америци, у западној Европи износи 54%, у источној и централној Европи 34%, а у Индији, Кини и на Куби око 30% (52,56,57).

У Србији, колоректални карцином представља други најчешћи малигни тумор од кога сваке године приближно оболи око 3800 и умре око 2300 особа оба пола. У 2006год. колоректални карцином је са стопом морталитета од 11,9% представљао други најчешћи узрок смрти, одмах после карцинома плућа код мушкараца и карцинома дојке код жена (4). У Црној Гори још увијек не постоје валидни подаци, с обзиром да регистар обољелих од колоректалног карцинома тек заживљава.

## **2.2.2. Фактори ризика за настанак колоректалног карцинома**

### **2.2.2.1. Навике и начин живота**

Велика дискрепанца учесталости колоректалног карцинома, у различитим дијеловима свијета, највише говори о значају начина живота за настанак овог тумора. Највећа инциденца овог тумора се биљежи у најразвијенијим дјеловима свијета: у Сјеверној Америци, Сјеверној Европи, Аустралији и на Новом Зеланду, а знатно је мања у сиромашној популацији и економски неразвијеним земљама, при чему варијације инциденце иду чак и до 60 пута. Колико је за настанак малигнух тумора колоне у економски развијеним земљама битан начин живота, показује и чињеница да инциденца овог карцинома код досељеника из сиромашних земаља постаје слична инциденци домаћег становништва (3,58).

Сматра се да је разлика у исхрани круцијални фактор који условљава варијације у учесталости овог тумора. Високо калорична храна са много црвеног меса, богата мастима животињског поријекла, унос рафинисаних шећера, са смањеном физичком активношћу и

смањеним уносом влакнастих материја, доводе до успорене активности дигестивних органа, нарочито колоне, на шта се надовезује опстипација; при томе се на зидовима колоне задржавају слојеви химуса, који различитим токсичним материјама и самим својим присуством иритирају епител и ремете функционисање цријевног екосистема, чиме се стварају услови за настанак различитих болести цријева. Са друге стране, храна богата биљним влакнима која имају способност директног везивања за токсине из фекалне масе смањује ризик за настанак болести цријева (51,58).

Сматра се да храна богата мастима доводи до повећане синтезе холестерола и жучних киселина у јетри, који се у дебелом цријеву под утицајем бактеријске микрофлоре, посебно бактеријског рода *Bacteroides* трансформишу у јаке карциногене. Раст ових сојева бактерија поспјешује присуство велике количине рафинисаних угљених хидрата. У литератури је потврђено да гојазне особе имају 1.5-3.5 пута већи ризик за настанак колоректалног карцинома у поређењу са нормално ухрањеним особама (7), и процјењује се да је 15-45% смртних случајева у Европи приписано посљедицама гојазности (8). Бројне студије су показале да је абдоминална гојазност фактор који доприноси настанку карцинома колоне. Наиме, показано је да особе са метаболичким синдромом X, који карактеришу абдоминална гојазност и резистенција на инсулин имају чак 50-75% већи ризик да оболе од карцинома. Код ових особа у крви је присутна хиперинсулинемија, повишени нивои C-пептида и лептина и снижен ниво адипонектина (12,59).

У факторе ризика за настанак колоректалног карцинома се убраја и начин припремања хране. Истиче се да се храна пржена у врелој масти (нарочито у оној која је коришћена више пута), печена на роштиљу или димљена може сматрати значајним фактором ризика, због полицикличних угљоводоника који су доказани карциногени (8,12,59).

Недовољна физичка активност, нитрити као конзерванси хране, пушење и конзумирање алкохола такође повећавају ризик за колоректални карцином. Хронично уношење алкохола повећава ризик за настанак карцинома дебелог цријева чак за 20%. Као значајан фактор ризика се истиче и пушење цигарета, а у прилог тога говори и мета-анализа Botteri-ја и сар, 2008, који су, користећи резултате из 42 контролне групе (15.354 случајева и 101.011 контрола), показали да је пушење цигарета сигнификантно повезано са високим ризиком за настанак колоректалног карцинома (60).

Сматра се да поједини лекови који се уносе у дужем временском периоду могу имати протективну улогу кад је у питању колоректални карцином. Тако је утврђено да особе женског пола које су користиле оралне контрацептиве имају за око 19% нижи ризик од осталих жена да добију колоректални карцином. Уношење лековитих препарата прављених на бази бијелог лука или самог бијелог лука, више од два пута недјељно такође смањује ризик од настанка карцинома колона за око 10-30% (3,59).

Бројне студије, из различитих земаља, указују да храна богата влакнастим материјама значајно смањује могућност настанка карцинома дебелог цријева. Сматра се да влакна у исхрани повећавају масу столице, па разређују концентрацију претпостављених карциногена, а истовремено убрзавају пролаз кроз дебело цријево и тиме смањују могуће излагање слузнице колона штетним утицајима. Такође неке влакнасте материје могу да послуже и за везивање токсичних састојака, што представља још једну заштитну мјеру (51,58).

Епидемиолошке студије спроведене последњих година су показале да употреба аспирина има заштитно дејство против карцинома дебелог црева. У истраживању је показано да жене које су користиле аспирин на дневној основи, током десет година или дуже, имају мању инциденцу карцинома дебелог цријева. Претпоставља се да се тај ефекат постиже инхибицијом циклооксигеназе 2 (COX-2), која је прекомјерно експримирана у око 90% колоректалних карцинома. Још увијек није сасвим јасан механизам којим COX-2 подстиче карциногенезу колона (61).

Одавно је примијећено да инциденца колоректалног карцинома расте са годинама живота, са највећом учесталošћу у популацији између 60-те и 70-те године. У општој популацији ризик за настанак карцинома дебелог цријева се повећава након 50-те године и удвостручује се у свакој следећој деценији (62,63). Ово се објашњава смањењем имунобиолошке отпорности организма, што доводи до кумулације мутација које успијевају да избјегну репер механизме и тако постају жариште туморогенезе (51,63).

Недавна истраживања Ahnen-а и сар., показују да је једна десетина колоректалних карцинома (11% карцинома колона и 18% ректалних карцинома) у Сједињеним Америчким Државама, регистрована у особа испод 50-те године живота. Исти аутори су запазили и повећање стопе морталитета у овој популацији са истовременим смањењем морталитета у особа изнад 50-те године живота (64).



У земљама окружења, као и у неким другим земљама, уочава се пораст броја обољелих код особа млађих од 40 година (65)

#### **2.2.2.2. Насљедни фактори**

У односу на услове настанка колоректални карцином може бити спорадичан (70-80% тумора), фамилијаран(20-30%) или наследан (5-10%) (51).

За фамилијарни карцином је запажено да особе чији су први рођаци имали карцином дебелог цријева, имају 2-3 пута већи ризик ,од осталих особа, да оболе од колоректалног карцинома (43,66).

Наследни колоректални карцином се јавља у оквиру различитих наследних синдрома: фамилијарна аденоматозна полипоза (ФАП),јувенилна полипоза колона, Peutz-Jeghers синдром,атенуирана фамилијарна аденоматозна полипоза,П307К мутација код Ашкенази Јевреја, незнатна аденоматозна полипоза колона, наследни неполипозни колоректални карцином и инфламаторне болести цријева (ИБЦ) Сви ови синдроми се, осим ИБЦ, наслеђују аутозомно-доминантно (43,59,66).

**Фамилијарна аденоматозна полипоза (ФАП)** се карактерише великим бројем полипа у колону некада и у вишим дијеловима дигестивног тракта) и туморима других локализација, најчешће у ЦНС-у и штитастој жлијезди. Већ у првим данима живота, код особа које су наслиједиле овај синдром, развија се безброј полипоидних аденома по читавом колону, који су у 100% случајева подложни развоју карцинома дебелог цријева после 50-те године. Хистолошки се углавном ради о тубуларним аденомима различите величине и различитог степена дисплазије (12).Пропорционално степену дисплазије смањује се и секреција муцина, а у фокусима малигне алтерације присутна је асекреција муцина.Изузетак су желатинозни аденокарциноми и вилозни аденоми код којих су муцини у хиперсекрецији, чиме се може сугерисати хистогенетска повезаност ове двије лезије.Генетске алтерације се односе на р53 ген који је мапиран на хромозому 5q21. Овај идентификован тумор супресорни ген је назван APC (Adenomatous Polyposis Coli) (43,66).

**Gardner-ov синдром** се сматра варијантом ФАП-а због клиничке слике и последица које су готово исте као код ФАП-а.Овај синдром карактерише триас: интестинална полипоза,мекоткивни и коштани поремећаји. Најчешћа локализација аденоматозних полипа је у колону и ректуму, мада могу бити присутни и у другим дјеловима гастринтестиналног

тракта. Специфично за овај синдром је честа појава екстраинтестиналних лезија, обично остеома мандибуле, лобање и других костију. Епидермалне цисте, егзоцитоза и зубне абнормалности такође могу бити удружени са полипима у овом синдрому (43,59).

**Turcot-ov синдром** је тежак облик фамилијарне аденоматозне полипозе која је праћена појавом малигнух тумора мозга (6). Запажено је да код варијанте синдрома код кога је тумор мозга из групе медулобластома постоји мутација APC гена, док су код варијанте са тумором мозга из групе глиобластома мултиформе нађене мутације hMLH1 и hPMS2 гена (67).

**Јувенилна полипоза** карактерише се већим бројем хамартомских полипа у дебелом, танком цријеву или желуцу. Оболеле особе наслеђују мутиран PTEN ген који кодира тирозин-фосфатазу. Јавља се код дјеце, а манифестује се дијарејом, хеморагијом и неухрањеношћу. Ова дјеца умиру у младости (43,61).

**Peutz-Jeghers синдром** се такође карактерише хамартомским полипима у желуцу, танком и дебелом цријеву (1). За разлику од предходног синдрома овдје су полипи праћени слузокожо-кожним пигментацијама у периоралној, букалној и перианалној регији. Полипи су велики, са петелком, чврсте и режњевите грађе. Предпоставља се да је Peutz-Jeghers-ov синдром повезан са мутацијом у LKB/STK11 гену на хромозому 19p13 (68).

**Наследни синдром неполипозног карцинома колоне** није удружен са предходном појавом аденоматозних полипа. Синдром је познат и као Lynch-ov синдром и чини 2-5% случајева колоректалног карцинома. Синдром се карактерише развојем карцинома колоне у раном периоду, претежно у проксималном колону, а важна карактеристика синдрома је да тумор дебелог цријева може бити удружен са карциномом ендометријума, оваријума, танког цријева, простате или бубрежне карлице (68,69). Сматра се да су за већину случајева наследних неполипозних карцинома колоне одговорне високо пенетрантне генске мутације у пет гена "mismatch repair" система: hMLH2, hMLH1, hPMS1, hPMS2 и hMSH6 које онемогућавају да се коригују репликационе грешке (51).

Развој карцинома из аденоматозних лезија потврђују бројне чињенице (43,61):

- популације са високом преваленцијом аденома имају и високу преваленцију колоректалних карцинома
- дистрибуција аденома у дебелом цријеву је слична дистрибуцији колоректалног карцинома

- када се инвазивни карцином открије у раном стадијуму, често је у околини присутно ткиво аденома.
- ризик за карцином је директно повезан са бројем аденома.

### 2.2.3. Колоректална карциногенеза

Колоректална карциногенеза је вишеетапни процес, током кога кумулативне мутације гена доводе до промјена фенотипа које се манифестују растом цријевне слузнице, диспластичним промјенама и на крају инвазивном неоплазијом. Дугогодишња клиничка и молекулска истраживања, као и интензивни скрининг (енгл. screening) програми омогућили су прецизније дефинисање пренеопластичних лезија и боље сагледавање колоректалне карциногенезе. Данас се сматра да постоје два патогенетски различита механизма настанка колоректалног карцинома. Први је APC/ $\beta$  катенински пут (секвенца аденом-карцином или путања хромозомске нестабилности), а други механизам је поправка погрешно упарене ДНК (или микросателитска нестабилност). Оба ова механизма се одликују постепеним нагомилавањем вишеструких мутација, али се гени који се накопљају у њима и механизми којима се мутације накопљају међусобно разликују (61,70).

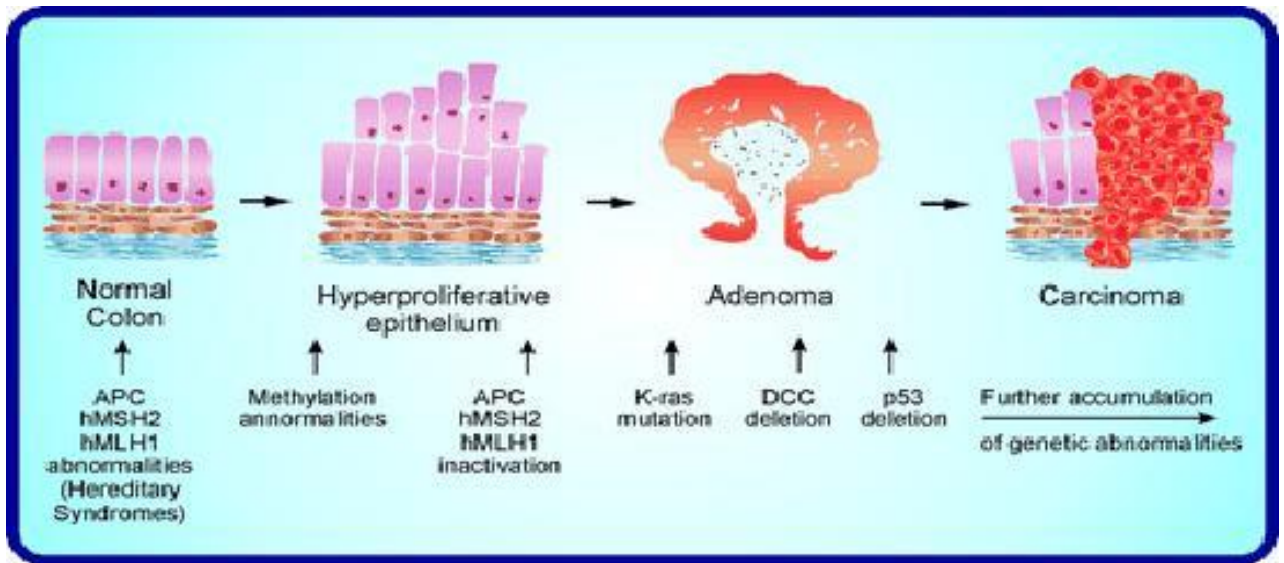
Секвенцу аденом-карцином карактерише постојање хромозомских нестабилности које су удружене са постепеним нагомилавањем мутација у бројним протоонкогенима и тумор супресорским генима. Еволуција колоректалног карцинома се овдје одвија преко неколико стадијума који се међусобно морфолошки разликују. Најраније позната пренеопластична лезија у којој се доказују генетски дефекти је тзв. “аберантни криптални фокус” (ACF), који је истовремено и ендоскопски и хистопатолошки ентитет (70). ACF представља уникрипталну или мултикрипталну поремећену пролиферацију и диференцијацију епитела, па се ова лезија назива и *микрораденом*. Код ACF се описују двије врсте епителних промјена: диспластична која има висок неопластични потенцијал, са могућим развојем у правцу аденома и хетеропластична са ниским неопластичним потенцијалом и нејасним/могућим развојем у правцу аденома и са вјероватним развојем у правцу хиперпластичних полипа (71,72).

Будући да су бројне клиничке и експерименталне студије показале малигни потенцијал и код неких хиперпластичних и хамартоматозних полипа и да су истовремено уочене разлике

и у генетским дефектима, то су предпостављене следеће развојне секвенце колоректалне карциногенезе(72,73,74):

**1. “Dysplastic ACF adenoma carcinoma sequence”** је најбоље проучен пут колоректалне карциногенезе. Сматра се да је губитак тумор супресорног гена APC најранији догађај у секвенци настанка аденома (74,75). Запажено је да се мутације APC гена у герминативној линији редовно налазе код аденома у ФАП и у Гарднеровом синдрому. Оне доводе до настанка на стотине аденома који се прогресивно мијењају и од којих настаје карцином. Да би настао аденом морају недостајати обје копије APC гена. Функција APC гена је у блиској вези са  $\beta$  катенином, тако што нормалан APC-протеин изазива разлагање  $\beta$  катенина. Међутим,уколико APC протеин не функционише, нагомилани  $\beta$  катенин се премјешта у једро и активира транскрипцију различитих гена који покрећу ћелијску пролиферацију (нпр. MYC и Cyclin D<sub>1</sub>) (75,76). Процијењује се да су мутације APC присутне у 60-80% спорадичних колоректалних карцинома. Поред наведеног, у овој секвенци, су присутне и мутације K-RAS протоонкогена. K-RAS кодира молекул за трансдукцију сигнала између активираниог стања када је везан са гуаносин-трифосфатом и инактивираниог стања, када је везан за гуанозин-дифосфат. Овај мутирани ген RAS је “заглављен” у активираниом стању које преноси митотске сигнале и спречава апоптозу (76). Процијењено је да је K-RAS мутиран у мање од 10% аденома који су мањи од 1 цм, у око 50% аденома већих од 1 цм и у 50% колоректалних карцинома. У око 60-70% колоректалних карцинома постоји губитак тумор супресорног гена на 18q21 хромозому. На том хромозому су мапирана три гена: DCC (енгл. deleted in colon carcinoma), SMAD2 и SMAD4. Гени SMAD кодирају сигналне путеве за фактор трансформације раста  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), тако да губитак ових гена доводи до неконтролисаног ћелијског раста, јер сигнални пут TGF- $\beta$ , у нормалним условима, инхибише ћелијски циклус (61).

Губитак p53 супресорног гена је нађен у 70-80% колоректалних карцинома, али обзиром да су губици овог гена у аденомима ријетки, сматра се да су мутације гена p53 касни догађај у колоректалној карциногенези.



Слика 2.

2. *"Heteroplasic ACF adenoma-carcinoma sequence"* представља допунску секвенцу код лезија без дисплазије, са мутацијом K-RAS протоонкогена, али без мутације APC гена (77)

3. *"Hyperplastic polyp-serrated adenoma-dysplasia-adenocarcinoma sequence"* је признати алтернативни пут код хетеропластичне ACF лезије (без дисплазије или са хиперпластично-диспластичним промјенама). У овом путу су забиљежени ниски нивои MSI и RAS мутација. Сматра се да је овај алтернативни пут присутан код неопластичних алтерација мјешовитих, хиперпластично-аденоматозних полипа ("serrated adenoma") и хиперсекреторних аденома ректума са ниском епителном дисплазијом (77,78).

**Поремећај поправке погрешно упарене ДНК** - Осим наведених промјена у колоректалној карциногенези преко аденом-карцином секвенце долази и до поремећаја метилације у тумор супресорним генима. Овај механизам карциногенезе се налази у основи 10-15% спорадичних карцинома (79,80). Карцином може да настане од сесилног зупчастог аденома или пак без претходно дефинисане лезије (10). Почетни догађај карциногенезе, у овом случају, је поремећај поправке ДНК који настаје услед инактивације гена за поправку погрешно упарене ДНК. Због наслеђених мутација у једном од пет гена (MSH2, MSH6, MLH1, PMS1 и PMS2) настаје херeditарни неполипозни карцином колоне, а MLH1 и MLH2 су најчешће оштећени гени не само у овом типу карцинома, већ и у спорадичним карциномима колоне који имају дефекте гена за поправку погрешно упарене ДНК (11). Као последица ових мутација долази до накупљања грешака дуж читавог генома

и феномена који се назива “микросателитна нестабилност”(engl. *microsatellite instability-MSI*) која представља молекуларни потпис поремећаја гена за поправку погрешно упарене ДНК. Већина микросателитских секвенци се налази у некодирајућим генским регионима, али су ипак неке локализоване и у кодирајућим, промоторским сегментима гена који су укључени у регулацију ћелијског рада. Ту спадају тип II рецептора за TGF- $\beta$ , чија сигнализација инхибира раст епителних ћелија у дебелом цријеву и VAX чији генски производи изазивају апоптозу. Губитак поправке погрешно упарене ДНК доводи до нагомилавања мутација што на крају резултује појавом колоректалних карцинома (61,81).

Посебне секвенце хамартоматозних полипа, за које још увијек не постоји опште прихваћен став у литератури, највјероватније представљају групу алтернативних путева који се спајају са аденом-карцином секвенцом и са појавом атипичних фокуса (“атипични хамартоматозни полип”) (82).

Важно је истаћи да се препоручује опрезност кад су у питању молекулске промјене у секвенци аденом-карцином, као и у путањи поправке погрешно упарене ДНК, јер ниједна од наведених промјена није универзална. Тако на примјер, дефекти APC су универзални у ФАП полипима, али су промјенљиви у диспластичним полипима који су повезани са спорадичним колоректалним карциномом.

У литератури се истиче и могућност настанка колоректалног карцинома *de novo*. У прилог овоме говори чињеница да се у многобројним, патохистолошким, серијским резевима карцинома некада не могу наћи остаци аденома. Карциноми колона *de novo* су описивани у пацијената након трансплантације најчешће бубрега и јетре (83,84.) Такође је описан и карцином *in situ* дебелог цријева без присуства аденома. У близини овог карцинома слузница је хиперпластична, задебљана, а крипте су широке и неправилне. Није сасвим разјашњено јесу ли те промјене преканцерозне лезије, инциденталне или су последица неопластичног процеса (43).

Такође је доказано да мали аденокарциноми, макроскопског дијаметра мањег од 1 цм, не морају имати ткиво резидуланог аденома, што је довело до закључка да карцином може настати и *de novo*. (85,86)

## 2.2.4.Клинички ток колоректалног аденокарцинома

### 2.2.4.1.Симптоматологија

Аденокарциноми колона и ректума расту споро, и могу бити присутни и до пет година прије него се симптоми појаве. Особе са асимптоматским карциномом често имају окултни губитак крви из тумора, а степен крварења расте са величином тумора и степеном егзулцерисаности. Симптоми зависе у одређеној мјери и од примарне локализације тумора (87).

Карциноми проксималног (десног) колона (цекум, асценс, трансверзум), обично порасту више да би проузроковали симптоме, у поређењу са карциномима ректума и сигме. Општи симптоми као последица микроцитне анемије (малаксалост, недостатак ваздуха, ангина) најчешћи су симптоми карцинома десног колона. Ређе, крв из тумора ове локализације, измијешана је са столицом, и појављује се као “махагони” фецес. Са порастом тумора може се јавити абдоминални дискомфорт и палпабилна маса у трбуху. Опструкција није уобичајена у овој локализацији тумора због већег дијаметра лумена у цекуму и асценсу, мада карциноми цекума могу блокирати илеоцекалну валвулу и изазвати опструкцију танког цријева (43,87)

Лијеви колон (сигма и десценс), има мањи лумен у односу на проксимални (десни) колон, и карциноми ове регије често захватају цијелу циркумференцију цријева и узрокују опструктивне симптоме. Знатно је ређа перфорација зида цријева. Пацијенти се могу презентовати абдоминалним болом типа колика, нарочито након јела, и промјенама у пражњењу цријева. Констипација се може смјењивати са убрзаним пражњењем малих количина фецеса. Хематохезија је чешћа у дисталној локализацији тумора, па се свјежа крв помијешана са столицом углавном виђа код карцинома лијевог колона и ректума (43,51).

Карциноми ректума могу такође узроковати опструктивне симптоме, промјене у цријевном пражњењу укључујући констипацију, дијареје, лажне позиве на столицу (тенезме) и хитне позиве на столицу (ургенције). Ови карциноми могу инвадирати мокраћну бешику, зид вагине или околне нерве, резултујући перинеалним или сакралним болом, али у каснијој фази болести (43,61).

Симптоматски пацијенти са колоректалним карциномом често су погрешно дијагностиковани као дивертикуларна болест (абдоминална бол, крв у столицу, промјена у

калибру столице), иритабилни цријевни синдром (абдоминална бол, промјене у пражњењу столице), или као хемороидална болест (ректално крварење). На тумор дебелог цријева, нарочито код старијих од 40 година, треба увијек посумњати када је присутна микроцитна хипохромна анемија, са или без хематохезије. Превише често, анемија код старијих се приписује анемији хроничне болести. Колоректални карцином све чешће погађа и млађу популацију, нарочито оне са дуготрајном историјом инфламаторних болести цријева или породичним оперећењем за ову болест. Стога млађој популацији, уколико припадају ризичним групама, а имају поменуте симптоме, треба прилазити са посебном пажњом (87,88).

#### **2.2.4.2. Локализација и макроскопске особине**

Као што је већ поменуто, најчешћа локализација ових тумора је ректум и сигма. Последњих година, међутим, све је више извјештаја о порасту учесталости проксималније локализације, нарочито у старијој животној доби (89,90). Студије о молекуларној патологији такође су показале неке разлике када је у питању локализација ових тумора. Тумори са високим степеном микросателитске нестабилности или *RAS* протоонкогеном мутацијом, су чешћи у десном колону (91,92).

Макроскопске карактеристике колоректалних карцинома зависе од фазе у природном току тумора у тренутку откривања. Ови тумори могу бити егзофитични (вегетантни) са предоминантно интралуминалним растом, ендофитични (улцеративни) са доминантно интрамуралним растом, дифузно инфилтративни са интрамуралним растом и ануларни са циркуферентним захватањем зида и констрикцијом лумена. Преклапања међу овим типовима су честа. Карциноми цекума и асценденса тендирају да расту као егзофитичне масе, док су они у трансверзуму и лијевом колону чешће ендофитични или ануларни. Аденокарциноми муцинозног типа често имају видљиве површине са доста мукуса, док су они са високим степеном микросателитске нестабилности често циркуферентни (93).



## 2.2.5. Дијагностичке процедуре

### 2.2.5.1. Клиничка дијагностика

Када постоји сумња на колоректални карцином, најприје се приступа ендоскопској или радиолошкој дијагностици. *Колоноскопија* је ендоскопска метода која подразумева преглед дебелог цријева ендоскопом до цекума. Она представља златни стандард у дијагностици ових тумора, јер омогућава узимање биопсија одговарајућим форцепсима (биооптичким клијештима), а истовремено омогућава и одстрањивање полипа електроресекцијом са дијатермијским омчама уколико се током прегледа визуализују. Много је прецизнија у односу на радиолошку методу која се изводи са двојним контрастом клизмама кроз ректум, методом којом чак до 50% аденома већих од 1 цм могу бити превиђени (94).

Уколико је колоноскопија недоступна, технички тешко изводљива или је пацијент не жели, радиолошки преглед колоне може се спровести као комплементарни преглед након проктосигмоидоскопије, тј ендоскопског прегледа само ректума и сигме.

Радиолошке методе које се користе у откривању колоректалног карцинома обухватају иригографију ( преглед са пуним контрастом ректалним клизмама), преглед са двојним контрастом (ваздух и контраст) као и у новије вријеме СТ (компјутеризована томографија) или MR (магнетна резонанца) колонографију ( тзв., виртуелна колоноскопија“). За процјену клиничког стадијума болести, тј постојање евентуалних метастаза, користе се конвенционални СТ или MR преглед , као и PET („Positron emission tomography“) скен (95).

„Виртуелна колоноскопија“ подразумева тродимензионалну реконструкцију колоне употребом спиралног СТ прегледа абдомена и мале карлице уз обраду слике одговарајућим софтвером. С обзиром на динамичан развој „imaging“ метода ( СТ и MR), СТ колонографија има све значајнију улогу у дијагностици полипа и тумора дебелог цријева код пацијената који не желе колоноскопију или је она технички тешко изводљива. Ову методу одликује велика сензитивност (89-94%) и специфичност (80-96%), у откривању полипа већих од 6 мм, што је препоручује као неинвазивну методу за скрининг колоректалног карцинома. (96). Недостаци ове методе били би слабија поузданост у откривању полипоидних лезија мањих од 6 мм и флат (равних) лезија, као и потреба за едукацијом радиолога, што се покушава превазићи развојем компјутерских софтвера (97).

Серолошка дијагностика је непоуздана, и поред чињенице да су чињени велики напори да се открију маркери који би довели до ране детекције и дијагнозе колоректалног карцинома. Најпроучаванији маркер је свакако СЕА (Carcinoembryonic Antigen). Он се може користити у преоперативном „staging”-у пацијената, као и у њиховом постоперативном праћењу, али има малу предиктивну вриједност у дијагностици асимптоматских пацијената. Његова ниска специфичност и сензитивност искључују га и као опцију у скринингу колоректалног карцинома (96).

Генетско тестирање се данас спроводи код чланова породица у којима се јавља ФАП и херeditарни неполипозни колоректални карцином (5), док у свакодневној клиничкој пракси и даље нема широку примјену (98).

### **2.2.5.2.Хистопатолошка дијагностика**

Колоректални карцином је “хируршка болест” јер се у највећем броју случајева завршава ресекцијом колона и ректума, а ресековани сегмент дебелог цријева представља круцијални извор података који су неопходни за даљи третман и праћење пацијента.

Стандардни извјештај о хистопатолошкој анализи ресекованих карцинома дебелог цријева садржи бројне информације које укључују: хистолошки тип тумора, хистолошку диференцијацију малигну хелија и хистолошки градус тумора, патолошки стадијум болести, број метастазама захваћених лимфних чворова, васкуларну инвазију, перинеуралну инвазију, перитуморску лимфоцитну инфилтрацију, хистопатолошку потврду удаљених метастаза и друге прогностичке и предиктивне параметре.

#### **2.2.5.2.1.Хистолошки тип тумора**

На хистопатолошком прегледу далеко најчешћи хистолошки тип тумора, који се среће у ресекату дебелог цријева, је аденокарцином (у више од 95% случајева). Аденокарциноми могу бити муцинозни (када туморске ћелије стварају слуз) и немучинозни. Посебан тип аденокарцинома дебелог цријева је “signet ring cell” карцином са ћелијама које личе на печатни прстен (51). Да би се олакшала комуникација међу љекарима, у употреби су униформни класификациони системи. Више од једне деценије се користила хистолошка класификација колоректалних карцинома, предложена од стране Светске здравствене организације 2000 год. по којој се дијагноза базира на предоминантно хистолошком типу

тумора при чему један хистолошки тип увијек доминира. ИАРК- СЗО 2010 год објављује ревизију претходне класификације. У ревидираној хистолошкој класификацији микропапиларни, муцинозни, медуларни, “signet ring cell“, крибриформни комедо тип и зупчасти карцином више нису самостални хистолошки ентитети, већ су „преведени“ у групу аденокарцинома (Табела 1). Хистолошки тип тумора нема независан прогностички значај, а изузетак су “signet ring cell” и ситноћелијски карцином, који имају неповољну прогнозу и који су независни од стадијума болести (51,61).

Табела 1. Класификација хистолошких типова колоректалног карцинома

<b>Хистолошки тип колоректалног карцинома (СЗО, 2010)</b>
Аденокарцином -Крибриформни комедо тип аденокарцинома -Медуларни карцином -Микропапиларни карцином -Муцинозни аденокарцином -Зупчасти аденокарцином -Signet ring cell карцином
Аденосквामозни карцином
Вретенастоћелијски карцином
Сквामозни карцином
Недиферентовани карцином

#### 2.2.5.2.2. Хистолошки градус

Бројне студије су показале да је степен хистолошке диферентованости важан прогностички фактор и независан од стадијума тумора. Градирање се базира на броју митоза у тумору и на степену сличности туморског ткива са нормалним матичним ткивом, из кога тумор потиче (61). Међутим, поред постојања неколико система градирања хистолошке диферентованости, ипак је градирање тумора у великој мјери субјективна категорија, будући да још увијек не постоји универзалан и опште прихваћен стандард градирања хистолошке диферентованости тумора. Већина система градирања колоректалне карциноме дијели на три или четири степена диферентованости (99,100):

1. Градус 1 ( $G_1$ ) - добро диферентован тумор
2. Градус 2 ( $G_2$ ) - умјерено диферентован тумор

3. Градус 3 (Г<sub>3</sub>) - лоше диферентован тумор

4.Градус 4 (Г<sub>4</sub>) – недиферентован тумор

По наведеној класификацији добро развијене аденоматозне формације по цијелом тумору представљају градус 1, само обриси или остаци аденоматозних формација су градус 3, а мјешавина ова два типа је градус 2.

Посљедње деценије се, по препорукама Мултидисциплинарне радне групе за колоректалне карциноме из 2000 год. користи градирање на сљедећи начин (100):

1.*Low grade* - добро диферентован колоректални карцином (раније добро и умјерено диферентовани тумори)

2.*High grade* - слабо диферентовани колоректални карцином (раније слабо диферентовани и недиферентовани карциноми)

Градирање на овај начин се базира на процентуалној заступљености glandуларних формација у тумору. Уколико је присутно више од 50% glandуларних формација тумор припада добро диферентованом типу, док тумори слабе диферентованости садрже мање од 50% glandуларних формација.

Уколико се у преко 95% тумора налазе добро формиране канцерске жљездане формације тумор је добро диферентован тумор HG1, ако је тај проценат 50%-90% тумор се сврстава у умјерено диферентоване HG2 туморе, и ако је мањи од 50% слабо диферентован аденокарцином HG3. Ако нема жљезданих формација, то су HG4 су недиферентовни карциноми (101).

Подаци из разних литературних извора су показали да је хистолошки градус независан прогностички параметар (102,103) и да слабо диферентовани карциноми у преко 50% случајева имају метастазе у лимфним нодусима, док умјерено и добро диферентовани имају мањи постотак метастаза (104).

### **2.2.5.2.3.Патолошки стадијум болести**

Патолошки стадијум болести је за сада једини независан прогностички фактор. Патолошки стадијум болести се односи на степен туморског раста и његовог ширења. Традиционално се, преоперативно, колоректални карцином дијагностикује мултиплим ендоскопским биопсијама. Послије хируршке ресекције и одстрањења тумора са лимфним нодусима,након хистопатолошког прегледа ресеката одређују се степен малигнитета и

стадијум болести. Да би се одредио стадијум болести потребно је дефинисати следеће параметре: дубину инвазије, захваћеност лимфних нодуса, васкуларну инвазију и удаљене метастазе (43).

За одређивање стадијума тумора су предложени бројни класификациони системи, али се највише користе Duke класификација (105), TNM класификација Светске здравствене организације (IARC-International Agency on research in Cancer) и Astler-Coller класификација (106). Dukes је предложио прву класификацију још давне 1929. године (107), која је од тада доживјела многобројне ревизије у циљу побољшања њене прогностичке вриједности. У бројним здравственим центрима се користи и Astler Coller класификација из 1954 године (106), која је модификована 1974 године. Заједничко за све ове класификације је да се базирају на степену туморског раста, који зависи од директног тј. локалног ширења тумора и његовог метастатског потенцијала који се одређује присуством метастаза у регионалним лимфним чворовима (108).

У Dukes-ову *A* групу спадају они тумори који инфилтрују слузницу и субмукозу до мишићног омотача, без метастаза у регионалне лимфне нодусе. Болесници са овим туморима, после ресекције се могу сматрати излеченим у 100% случајева. Тумори *B* групе по Dukes-у у потпуности инфилтрују зид цријева, а евентуално и периколично масно ткиво, али без метастаза у регионалне лимфне нодусе. Важно је нагласити да одређивање инвазије зида колона подразумијева максималну дубину туморске инвазије. Показано је да инфилтрација мишићног зида има прогностички значај независан од лимфонодалног статуса. Петогодишње преживљавање код ових болесника је 70%. У Dukes-у *C* групе спадају тумори са метастазама у регионалним лимфним нодусима. Петогодишње преживљавање код ових болесника је 30%. Петогодишње преживљавање у *D* групи по Dukes-у износи око 15% (108).

Модификације су се односиле на промјену *C* стадијума. Gastrointestinal Tumor Study Group (GITSG) је 1974г предложила за *C*<sub>1</sub> стадијум захваћеност од 1-4 регионална лимфна чвора, а за стадијум *C*<sub>2</sub> лезије код којих више од 4 регионална лимфна чвора садрже туморске ћелије, а уколико су захваћени лимфни чворови дуж великих крвних судова предложен је стадијум *C*<sub>3</sub>. Прије тога (1967год) је у класификацију уведен и *D* стадијум који даје податке о удаљеним метастазама (109,110).

Табела 2. Упоредни TNM, Dukes и Astler Coller “staging” системи за колоректални карцином

<b>TNM</b>	<b>Опис</b>	<b>Dukes</b>	<b>Модификација Astler-Coller 1974.</b>
<b>T<sub>1</sub>N<sub>0</sub></b>	карцином ограничен на мукозу и субмукозу	<b>A</b>	<b>A</b>
<b>T<sub>2</sub>N<sub>0</sub></b>	карцином захвата мускуларис проприју		<b>B1</b> -
<b>T<sub>3</sub>N<sub>0</sub></b>	карцином захватио субсерозу или околна ткива-	<b>B</b>	<b>B2</b>
<b>T<sub>4</sub>N<sub>0</sub></b>	Карцином захватио перитонеум и ураста у околне органе		<b>B3</b>
<b>T<sub>1-2</sub>N<sub>1-2</sub></b>	Мета у 1-3 периколична/периректална лимфна чвора	<b>C</b>	<b>C1</b>
<b>T<sub>3</sub>N<sub>1-2</sub></b>	Мета у 4 и више периколична/периректална лимфна чвора		<b>C2</b> --
<b>T<sub>4</sub>N<sub>1-2</sub></b>	Метастазе у лимфне чворове дуж великих крвних судова		<b>C3</b>
<b>M<sub>1</sub></b>	Удаљене метастазе	<b>D</b>	<b>D</b>

У покушају да се униформишу класификациони системи, амерички заједнички комитет за канцер (AJCC) представља TNM класификацију која узима у обзир следеће параметре:

- T - односи се на величину примарног тумора,
- N - узима у обзир статус регионалних лимфних чворова
- M - се односи на удаљене метастазе

На тај начин су сврстали све колоректалне карциноме у 5 стадијума (од 0 до 4) (108,109):

Табела 3..TNM класификација колоректалних карцинома проглашена од стране American Joint Comitee on cancer (AJCC) – 6. ревизија из 2002. године.

<b>T – примарни тумор</b>
<p>Tx- величина примарног тумора се није могла процијенити  T<sub>0</sub>- примарни тумор није нађен  T<sub>is</sub> -карцином “ин ситу” *  T<sub>1</sub> -продор у субмукозу, без пенетрације кроз мускуларис проприју  T<sub>2</sub> - продор у мускуларис проприју, али не и кроз њу  T<sub>3</sub>- пенетрација кроз мускуларис проприју у субсерозу (ако је присутна), или периколично масно ткиво, али не у перитонелану шупљину или друге органе.  T<sub>4</sub>- инвазија у околне органе или захватање перитонеалне шупљине</p>
<b>N- регионални лимфни нодуси</b>
<p>Nx- метастазе у лимфне чворове се не могу процијенити  N<sub>0</sub>.- без метастаза у локалне лимфне чворове  N<sub>1</sub>- 1-3 периколичних/периректалних лимфних чворова захваћено  N<sub>2</sub>- 4 или више периколичних/периректалних лимфних чворова захваћено</p>
<b>M – удаљене метастазе</b>
<p>Mx- не може се одредити  M<sub>0</sub> - нема удаљених метастаза  M<sub>1</sub> - постоје удаљене метастазе</p>

\*Термин T<sub>is</sub> (тумор “in situ”) у овој класификацији, за разлику од малигнух тумора друге локализације, због специфичности колоректалне мукозе, обухвата интрепителни и интрамукозни карцином, као и тумор са продором малигнух ћелија у, али не изван, ламине мускуларис мукозе. Познато је да неки патолози ову лезију класификују као тешку (high grade) дисплазију (111)

Табела 4: Стадијуми колоректалног карцинома према TNM класификацији, проглашене од AJCC – 6. ревизија из 2002. год.

<b>Стадијуми колоректалног карцинома по TNM класификацији (AJCC, 2002 год )</b>	
Стадијум 0	T <sub>is</sub> , N <sub>0</sub> , M <sub>0</sub>
Стадијум I	T <sub>1-2</sub> , N <sub>0</sub> , M <sub>0</sub>
Стадијум IIa	T <sub>3</sub> , N <sub>0</sub> , M <sub>0</sub>
Стадијум IIb	T <sub>4</sub> , N <sub>0</sub> , M <sub>0</sub>
Стадијум IIIa	T <sub>1-2</sub> , N <sub>1</sub> , M <sub>0</sub>
Стадијум IIIb	T <sub>3-4</sub> , N <sub>1</sub> , M <sub>0</sub>
Стадијум IIIc	T <sub>1-4</sub> , N <sub>2</sub> , M <sub>0</sub>
Стадијум IV	било који T, било који N, M <sub>1</sub>

И предходна TNM класификација из 2002г је претрпјела ревизију у смислу да је у њу, осим преоперативних података, укључена и интраоперативна процјена хирурга.

Табела 5. Модификована TNM класификација (AJCC,2010 год)

Т – примарни тумор
<p>Тх- величина примарног тумора се није могла процијенити  Т<sub>0</sub>- примарни тумор није нађен  Т<sub>is</sub> -карцином “ин ситу”  Т<sub>1</sub> -продор у субмукозу, без пенетрације кроз мускуларис проприју  Т<sub>2</sub> - продор у мускуларис проприју, али не и кроз њу  Т<sub>3</sub>- пенетрација кроз мускуларис проприју у субсерозу (ако је присутна), или периколично масно ткиво, али не у перитонелану шупљину или друге органе.  Т<sub>4</sub> – тумор пробио висцерални перитонеум и/ или врши инвазију околних органа или структура  Т<sub>4a</sub> – тумор пробио висцерални перитонеум  Т<sub>4b</sub>- тумор захвата околне органе или структуре</p>
N- регионални лимфни нодуси
<p>N<sub>x</sub>- метастазе у лимфне чворове се не могу процијенити  N<sub>0</sub>.- без метастаза у локалне лимфне чворове  N<sub>1</sub> – метастазе у 1-3 регионална лимфна нодуса  N<sub>1a</sub>- метастазе у 1 регионалном лимфном чвору  N<sub>1b</sub>- метастазе у 2 до 3 регионална лимфна чвора  N<sub>1c</sub>-туморски депозити,тј сателити у субмукози, или не перитонеализованом периколичном или периректалном меком ткиву без метастаза у регионалним лимфним чворовима  N<sub>2</sub>- метастазе у 4 или више регионална лимфна чвора  N<sub>2a</sub>- метастазе у 4 до 6 регионална лимфних чворова  N<sub>2b</sub>- метастазе у 7 или више регионалних лимфних нодуса</p>
M – удаљене метастазе
<p>M<sub>x</sub>- не може се одредити  M<sub>0</sub> - нема удаљених метастаза  M<sub>1</sub>-постоје удаљене метастазе  M<sub>1a</sub>-метастазама захваћен један орган  M<sub>1b</sub>- метастазама захваћено више од једног органа у перитонеуму</p>

Обзиром да преоперативно одређивање TNM стадијума није лако, савремена TNM класификација је заснована како на преоперативном клиничком налазу, тако и на оперативном налазу, уз детаљну патохистолошку анализу ресеката . Ова модификована



TNM класификација је објављена 2010 године (51). Као што се запажа у њој, у односу на претходну, постоје важне промјене у Т,Н и М категорији.

Прво, у Т<sub>4</sub> категорију су уведене двије подкатегије, при чему је у првој (Т<sub>4а</sub>) тумор пробио висцерални перитонеум а у другој подкатегији (Т<sub>4б</sub>) захвата околне структуре и органе. Ове подкатегије су уведене након што је у бројним студијама утврђено да је пенетрација серозе независан и неповољан прогностички параметар, који је у корелацији са краћим преживљавањем. Инвазија околних органа или структура (Т<sub>4б</sub>) обухвата инвазију других сегмената колоректума преко серозе или мезоколоне (51,112,113,114).

Због великог прогностичког значаја метастаза у лимфним чворовима, практично највећу ревизију је претрпјела N категорија, која по овој класификацији знатно више обавезује на пажљиву анализу лимфних чворова у свјежем или фиксираном ткиву, будући да је N1 категорија подијељена у три , а N2 у двије подкатегије. Усвојен је став да треба прегледати све лимфне чворове који се пронађу инспекцијом или дисекцијом.

Категорија М је, за разлику од предходне класификације, подијељена у двије подкатегије. У првој субкатегији су удаљене метастазе лоциране у једном органу који је потенцијално подложен хируршкој ресекцији (51). Друга М подкатегија обухвата тумор са удаљеним метастазама у више од једног органа.

Модификација Astler Coller-а из 1954 године је В стадијум подијелила на В1 ако инфилтрише у мускуларис проприју и В2 ако пробија мускуларис проприју, а С стадијум на С1 ако инфилтрише у мускуларис проприју и има метастазе у лимфним нодусима и С2 ако пробија мускуларис проприју и има метастазе у лимфним нодусима (115). Исте године Denoix је предложио *pTNM* канцерску класификацију (патолошки стадијум (p) тумор (T) нодус (N) метастаза (M), која је затим прихваћена од стране Union International Cancer Control (*UICC*) и *American Joint Comitee on Cancer (AJCC)* и најчешће је данас у употреби (116). У овом систему префикс *T* се односи на дубину инвазије тумора:

Стадијум тумора- pT статус: одређује се микроскопским прегледом узорка ткива из дијела тумора који је најдубље инвадирао у зид цријева (116). Истраживања су показала да је 5-годишње преживљавање болесника са локализованим тумором око 91% , док је код болесника код којих је дошло до регионалног ширења тумора преживљавање око 65 %(117).

#### 2.2.5.2.4. Лимфни чворови

Колоректални карциноми најчешће дају метастазе у регионалне лимфне чворове и у јетру. Присуство тумора у регионалном лимфном чвору, настало лимфогеним путем или директном инвазијом кроз капсулу сматра се регионалном лимфонодалном метастазом. Метастазе у удаљеним (нерегионалним) лимфним чворовима сматрају се удаљеним метастазама и представљају pM категорију.

Метастатски потенцијал тумора одређен је присуством метастаза у регионалним лимфним чворовима (pN). Усаглашен је став да су метастазе у лимфним чворовима чешће код слабо диферентованих тумора са израженим инфилтративним растом. Метастазирање у јетру је чешће код тумора код којих је присутна интраваскуларна инвазија (118,119).

У литератури се истиче да је неопходно из материјала, добијеног након хируршке ресекције, изоловати најмање 15-16 лимфних чворова (120,121), али су неки истраживачи успјели да издвоје и до 60 лимфних нодуса по случају, зависно од дубине инвазије и локализације колоректалног карцинома (122).

Локализација и број захваћених лимфних чворова су важан прогностички параметар, јер што је број захваћених лимфних чворова већи то је лошија прогноза за болесника. Доказано је да је петогодишње преживљавање било мање од 10% уколико је тумор захватио више од 6 лимфних чворова. У случајевима када је тумор захватио више од 16 лимфних чворова сви су болесници умрли унутар пет година. Такође је доказано да постоји повезаност између величине тумора и броја захваћених лимфних чворова. (43,122.123)

Последњих година су присутне бројне расправе о присуству и значају микрометастаза у лимфним чворовима код колоректалног карцинома. Рутинска истраживања базирана на Н&Е бојењу и имунохистохемијској детекцији микрометастаза изгледа да нису показала клинички значај; међутим, за окултне промјене детектоване молекуларним техникама попут RT-PCR, се сугерише да могу бити удружене са лошом прогнозом (122).

До коначне консолидације става о микрометастазама, препорука је да се хистолошки идентификовани туморски фокуси мањи од 2мм и већи од 0,2мм класификују као микрометастазе и означе са pN<sub>1</sub> (ми) и pN<sub>2</sub> (100).

#### 2.2.5.2. 5. Удаљене метастазе

Под удаљеним метастазама се подразумевају туморски депозити у било који нерегионални лимфни чвор или било који орган, перитонеумска дисеминација, као и позитиван цитолошки налаз у перитонеалној течности (61).

Патолошки М(рМ) се заснива искључиво на присуству метастаза у удаљеним органима које су идентификоване хистопатолошким прегледом (124). Уколико су присутне једино метастазе у јетри, потребно је разлучити да ли су операбилне или не. Операбилне метастазе се јављају у око 20-25% случајева и њиховом ресекцијом се постиже петогодишње преживљавање у 27-30%, а десетогодишње у око 20% случајева (125).

#### 2.2.5.2. 6. Лимфоцитни инфилтрат, дезмоплазија и некроза

*Лимфоцитни инфилтрат* настаје као резултат имуног одговора домаћина и може бити локализован у самом тумору или у његовој непосредној околини (перитуморално). Сматра се повољним прогностичким параметром, поготово уколико лимфоцитни агрегати формирају фоликулоидне структуре са герминативним центрима на инвазивном рубу тумора, попут оних који се виђају у Кроновој болести (ткз. *Crohn-like aggregate*) (126,127). У прилог овога говоре и резултати Уено-а и сар. 2013 године, који су семиквантитативном проценом *Crohn-like* лимфоцитне реакције у 1.032 пацијента, закључили да величина највећег лимфоцитног агрегата најбоље одражава специфичности *Crohn-like* реакције и да је од значајног утицаја на преживљавање пацијената (128).

Интралиуморски лимфоцитни инфилтрат је повезан са микросателитном нестабилношћу и потребно га је раздвојити од перитуморског инфилтрата (100). Идентификација карцинома са микросателитском нестабилношћу је важна, не само за верификацију наследног синдрома неполипозног карцинома колоне, већ због тога што од микросателитске нестабилности умногоме зависи прогноза и реакција на хемотерапеутике (129).

Током епителне канцерогенезе, не мијењају се само епителне ћелије, мијења се и околна строма. Морфолошки знаци промјена околне строма су: појава различите количине дезмоплазије, ангиогенезе и инфламаторног инфилтрата (126,127) .

Ранија истраживања су била више фокусирана на проучавања епителне компоненте тумора, док је строма била предмет ријетких истраживања, све док Jass и сарадници нису

уочили значај присуства перитуморалних лимфоцита на прогресију тумора (130) Морфолошки знаци промјена околне строме су: појава различите количине дезмоплазије, ангиогенезе и инфламаторног инфилтрата.

*Дезмоплазија* представља реакцију туморске строме која се манифестује дезорганизованом продукцијом фиброзног или везивног ткива, састављеног углавном од колагених влакана и миофибробласта. Иако су мишљења о предиктивном значају дезмоплазије контрадикторна (131,132), у литератури, ипак преовлађује став да је дезмопластична реакција строме у позитивној корелацији са туморском агресивношћу (61,131). Међутим, скорија истраживања на основу Kaplan-Meier анализе утврђују да је дезмопластична реакција значајно повезана са укупним преживљавањем пацијената. Наиме Sarogale и сар. 2010 године су, на основу компјутерске анализе, показали да пацијенти са већом вриједношћу дезмопластичне реакције имају значајно дуже преживљавање у односу на пацијенте са мањим вриједностима дезмопластичне реакције (133).

Сматра се да је за стварање дезмоплазије у строми одговорна активација фибробласта, познатијих као миофибробласти који продукују компоненте екстрацелуларног матрикса (134,135).

*Некроза* је секундарна промјена у тумору и настаје као последица смањеног протока кисеоника и дејства имуног одговора на цитостатску терапију. Критична фаза у еволуцији сваког тумора је пораст до оне величине која онемогућава постојећој васкуларизацији да обезбиједи прилив нутритивних материја и оксигенацију. Код многих тумора постоји преваскуларна фаза (нпр. карцином *in situ*) у којој тумор расте споро а исхрана и оксигенација су још обезбијеђене процесом дифузије. Овако мали тумори могу егзистирати годинама и деценијама, али даљи пораст туморске масе је ограничен све до појаве неоангиогенезе. Током раста тумора постоји одсуство нормалних контролних механизма, па наступа моменат када неоваскуларизација није у стању да прати неконтролисану пролиферацију туморских ћелија и раст тумора. Тада настаје некроза за коју се сматра да је повезана са лошом прогнозом колоректалног карцинома (136,137).

## **2.2.6.Прогноза, лијечење и скрининг колоректалног аденокарцинома**

### **2.2.6.1.Прогноза**

Клиничке и патохистолошке карактеристике су важне у предикцији клиничког исхода тумора, као и у прављењу стратегије третмана и праћења пацијената са колоректалним карциномом.

Дубина трансмуралне пенетрације тумора и захваћеност регионалних лимфних чворова су најзначајније детерминанте прогнозе. Осим тога, и сам степен пенетрације зида цријева, независно од статуса лимфних нодуса, утиче на прогнозу и корелише са инциденцом локалног рецидива након хируршке ресекције (138, 139). Прогноза тумора је у корелацији са хистолошким градусом, о чему је раније било више ријечи. Венска инвазија од стране тумора обично је у корелацији са локалним рецидивом након ресекције, висцералним метастазама и смањеним преживљавањем. Слично је са лимфатичном и перинеуралном инвазијом (140,141). Клинички и хистолошки параметри обухваћени су класификацијама које су детаљно описане у поглављу о патолошком стадијуму болести. Степен преживљавања зависи од стадијума болести. Петогодишње преживљавање креће се од 90% у локализованој болести (без захватања регионалних лимфатика), 70% код оних са захваћеним регионалним лимфним нодусима, до 10 % код оних са удаљеном метастатском болешћу. (142)

Већина скрининг програма за колоректални карцином сугерише да су тумори код асимптоматских пацијената мање узнапредовали, што потврђују и велике студије (143). Трајање симптома не мора директно корелирати са прогнозом, и неки симптоми, као ректално крварење, могу бити повезани са бољим преживљавањем (144). Опструкција или перфорација цријева повезани су са лошијим исходом. Ти пацијенти често нису кандидати за куративну хирургију, и повезани су са већим интраоперативним морталитетом. Локација примарног тумора такође може утицати на преживљавање. Студије показују да је преживљавање након хирургије лијевог колона нешто веће у односу на туморе десног колона (145).

Око 3% колоректалних карцинома јавља се прије 30 година живота и само 11 % таквих пацијената има ФАП или инфламаторну болест цријева. Прогноза је код њих лошија него код старијих, нарочито у педијатријској доби. То се објашњава већим процентом

узнапредовалих тумора и муцинозних аденокарцинома у овој групи пацијената (146). Преоперативни ниво СЕА у серуму такође може указивати на исход. Стопа рецидива је већа и вријеме до појаве рецидива је краће код пацијената у каснијим стадијумима болести, који су имали висок ниво СЕА прије операције. (147).

Око четвртина пацијената са колоректалним карциномом испољава клиничке знаке хематогеног ширења при постављању дијагнозе, а једна половина може развити метастазе на удаљеним мјестима, обично јетри, током болести. Те метастазе подразумевају лошију прогнозу током цијелог клиничког тока болести. Најзначајнија детерминанта преживљавања пацијената са метастазама у јетри је степен захваћеност јетре туморским метастазама(146).

### 2.2.6.2. Лијечење

*Хирушки третман* је третман избора пацијената са колоректалним карциномом. Преоперативна колоноскопија је неопходна да би се искључиле синхроне лезије (постојање тумора и на другој локацији у колону). Такође, преоперативно се одређује СЕА у циљу постоперативног праћења и ради СТ абдомена и мале карлице у циљу процјене стадијума и доказивања метастаза, првенствено у јетри. У преоперативној приреми и процјени локорегионалног стадијума карцинома ректума користи се трансректални ултразвук. (148)

Циљ хирургије је ресекција инволвираног сегмента цријева са припадајућим лимфним чворовима кроз које се тај дио цријева дренира. Екстензивност ресекције одређује прокрвљеност и дистрибуција регионалних лимфних чворова. Ресекција укључује сегмент колоне најмање по 5 цм проксимално и дистално од тумора. Усаглашен је став да екстензивнија ресекција од сегменталне не повећава преживљавање али повећава морбидитет (149). Минимално инвазивна лапараскопска хирургија све чешће се примјењује умјесто класичне хирургије у лијечењу ове болести(150).

Третман карцинома ректума зависи од локализације лезије. За туморе ректосигмоидног прелаза и горњег ректума, операција избора је доња предња ресекција. Хирургија ректалних тумора подразумева тоталну мезоректалну ексцизију. Чак и у случају ниско лоцираних лезија, сфинктер ануса може бити сачуван уколико се може ресецирати 2 цм здравог ткива дистално од тумора. У случају још ниже постављених лезија, или јако великих тумора са захватањем карлице, операција избора је проктектомија са перинеалном екстирпацијом и

постављањем дефинитивне колостоме. Већ више од деценију, код селекционисаних пацијената са карциномом ректума, спроводи се неoadјувантна радиотерапија (151).

Код свих пацијената са колоректалним карциномом, примарни тумор треба бити ресециран, чак и када је у питању дисеминована метастаска болест, у циљу превенције опструкције и крварења. Као палијативне методе код пацијената са коморбидитетима који нису кандидати за оперативни третман, користе се ласер фотоаблација или аргон плазма коагулација. Старосна доб није лимитирајући фактор за извођење оперативног захвата (149).

Најчешће мјесто метастазирања колоректалног карцинома је јетра. На иницијалној презентацији, јетра је захваћена метастазама у 10% до 25% случајева, док се 70 до 80% метастаза у јетри појави унутар двије године након примарне ресекције. Без адекватног третмана, прогноза таквих пацијената је лоша (152). Кандидати за ресекцију хепатичких метастаза су пацијенти са примарним тумором који је радикално одстрањен, и код којих нема доказа екстрахепатичне болести. Сви такви пацијенти, код којих могу бити поштеђена макар 2 сегмента односно макар 20% функционалног јетриног ткива, могу бити кандидати за овај третман. Петогодишње преживљавање код тако третираних пацијената (уз адјувантну хемиотерапију) износи 58% у односу на 20 % код нетретираних (153). Код оних који нису погодни за оперативни третман, метастазе се могу третирати радиофреквентном аблацијом или криотерапијом (154)

Упркос оптималном примарном третману, 30% до 50 % пацијената са колоректалним карцином ће имати релапс и умријети због основне болести и поред адекватног третмана. Детектовање релапса је стога главни циљ постоперативног праћења ових пацијената. Садашње званичне препоруке подразумијевају клиничке прегледе и одређивање СЕА сваких 3 до 6 мјесеци током три године након хирургије и евентуалне адјувантне терапије, и сваких 6 до 12 мјесеци током четврте и пете године праћења. Колоноскопија се након годину дана од хируршког третмана, чак и уколико је налаз уредан, понавља сваких три до пет година. СТ преглед грудног коша и абдомена препоручује се сваких 6 до 12 мјесеци током прве три године праћења код пацијената који су у високом ризику од рецидива болести (155).

**Хемотерапија** представља обавезан третман код пацијената чији је тумор, без обзира на радикалну ресекцију, пенетрирао серозу и/или захватио регионалне лимфне чворове. Релапс се код таквих пацијената јавља у 20% до 80% у зависности од стадијума болести. Пацијенти

који су подвргнути хируршком третману јетриних метастаза такође имају висок проценат рецидива. Поменута група пацијената је стога индикована за адјувантну (постоперативну) хемотерапију различитим протоколима цитостатика (155).

Адјувантну хемотерапију која се заснива на 5 флуороурацилу (5-FU), треба размотрити код пацијената са високим ризиком од рецидива у стадијуму II и III. Садашње препоруке за карцином колона у стадијуму II и III подразумевају или капецитабин као монотерапију, или оксиплатин у комбинацији са 5-FU и фолном киселином (FOLFOX). Узнапредовала метастатска болест подразумева употребу разних протокола као што је FOLFOX или FOLFIRI (фолна киселина + 5 FU + иринотекан), као и XELOX (капецитабин + оксиплатин), или њихове комбинације. Код пацијената који не толеришу интравенску примјену цитостатика, користе се капецитабин или тегафур у комбинацији са урацилом оралним путем. За третман узнапредовалог колоректалног карцинома користе се и биолошки агенси бевацизумаб (моноклонско антителијело против *VEGF-vascular endothelial growth factor*), и цетуксимаб (анти *epidermal growth factor receptor* антителијело) (156).

Радиотерапија (РТ) се користи у третману тумора ректума који су пенетрирали зид цријева или су захватили регионалне лимфне чворове. Може се користити преоперативно, постоперативно или комбиновано. Преоперативно (неoadјувантно) спроведена радиотерапија може конвертовати нересектабилне карциноме ове регије у ресектабилну форму. Повремено се радиотерапија користи као палијативни третман у крварењу из иноперабилних ректалних карцинома. Проспективне студије показале су значајну редуцију постоперативног рецидива код оних који су третирани постоперативном РТ у односу на оне који је нису добили након операције (151).

### 2.2.6.3. Скрининг

Превенција карцинома може бити примарна или секундарна. *Примарна* се односи на идентификацију генетских, биолошких и фактора околине који могу бити етиолошки и патогенетски повезани са развојем тумора. Расположиви подаци и поред бројних студија не омогућавају чврсту основу за примјену примарних превентивних мјера. Циљ *секундарне* превенције је идентификација постојећих пренеопластичних и раних неопластичних лезија у циљу њиховог правовременог третмана.



**Скрининг** (енгл. screening) представља процес идентификације наизглед здравих људи који имају евидентне факторе ризика за настанак и оболијевање од одређене болести. На тај начин, када се болест идентификује и третира у раној фази, смањује се стопа морбидитета и mortalитета и врши значајна уштеда средстава која су потребна за лијечење пацијената у одмаклим фазама болести. С обзиром да се колоректални карцином налази у самом врху по учесталости широм свијета, његово рано откривање је од изузетног клиничког и социоекономског значаја. Сврха скрининга колоректалног карцинома је откривање раних асимптоматских карцинома као и аденома, прије свега узнапредовале хистологије, чијим би се уклањањем превенирао настанак колоректалног карцинома. Постоје три начина на који се може вршити скрининг карцинома колона и ректума.

**Тестови столице** подразумевају *тестове на окултно крварење* (енгл. Fecal occult blood test-FOBT), и *тестове ДНК у столицу*.

Неколико рандомизованих студија оправдало је улогу FOBT у редукцији mortalитета од колоректалног карцинома (157,158). По једној студији, након тринаест година праћења, mortalитет у групи која је била подвргнута годишњим FOBT контролама, била је за 33% мања у односу на контролну групу (157). FOBT су подијељени на оне базирание на гуајак (gFOBT) и имунохемијске (iFOBT). Тестови базирани на гуајак-у детектују активност псеудопероксидазе хемоглобина или хема, док имунохемијски тестови користе антителијела на компоненте крви. При *cut off* вриједностима од 100 нг/мл, сензитивност и специфичност износиле су 88,2% тј 89,7% за карциноме, и 61,5% тј 91,5% за било коју клинички значајну неоплазију (159). Поред ниже сензитивности за откривање преканцерских лезија, мора се имати на уму и да се ова метода мора спроводити једном годишње.

Тестови ДНК у столицу подразумевају испитивање столице на познате ДНК алтерације у аденом-карцином секвенци. Потенцијални бенефит ових тестова била би чињеница да су за разлику од окултног крварења, ДНК алтерације перманентне. И поред чињенице да ова метода обећава, потребне су даље студије да би она заживјела у широј клиничкој пракси (160).

**Радиолошке методе** које су разматране у контексту скрининга подразумевају употребу СТ колонографије и иригографије са двојним контрастом. О њима је раније већ било ријечи, и садашње препоруке не укључују радиолошке методе као методе избора у скринингу колоректалног карцинома (161).

*Ендоскопске методе* у скринингу колоректалног карцинома подразумевају сигмоидоскопију и колоноскопију. *Флексибилна сигмоидоскопија* подразумева ендоскопску претрагу дисталног колона, тј ректума и сигме. Не захтијева седацију и потребна је само лимитирана припрема. У поређењу са колоноскопијом, сензитивност ове методе износи 60%-70% у откривању узнапредовалих аденома и карцинома, уз ограничење да се на овај начин не може дијагностиковати аденом или карцином у проксималнијим партијама колона (162).

*Колоноскопија* представља ендоскопску претрагу цијелог колона до цекума, и захтијева комплетно чишћење током 24 сата прије процедуре одговарајућим лаксативима. Обично се изводи у благој седацији. На овај начин могу се открити асимптоматски карциноми у било којем дијелу колона, као и аденоми који се у истом акту могу одстранити одговарајућим ендоскопским техникама. Колоноскопија представља најпоузданију технику скрининга колоректалног карцинома. Редукција морталитета од ових тумора у студијама о FOBT управо се приписује ефикасности колоноскопских процедура урађеним у циљу евалуације позитивних FOBT (163). Садашње процјене су да је ефекат скрининг колоноскопија на инциденцу колоректалног карцинома редукција за 76%-90% (164).

Важеће смјернице препоручују рутински скрининг за адултну популацију са просјечним ризиком у доби од 50 до 75 година старости. Препоруке укључују годишњи високо сензитивни FOBT, сигмоидоскопију сваких пет година уз периодични високо сензитивни FOBT сваке три године, или колоноскопију сваких десет година (165). Америчко удружење гастроентеролога препоручује управо колоноскопију као најпожељнији метод скрининга у популацији која је у *просјечном ризику* (старији од 50 година без личне и породичне анамнезе за аденоме и колоректални карцином) за настанак овог тумора (166). Осим тога, код пацијената са *умјереним ризиком* (који имају једног најближег рођака са узнапредовалим аденомом или колоректалним карциномом млађим од 60 година, или два најближа рођака са описаним промјенама у било којој старосној доби, лична историја аденома или карцинома), препоручује се колоноскопија са навршених 40 година или 10 година раније од доби у којој је дијагностикован најмлађи родјак (10). Пацијентима са *високим ризиком* (хередитарни неполипозни колоректални карцином, фамилијарна аденоматозна полипоза-ФАП, анамнеза инфламаторних болести цријева-ИБЦ)

колоноскопије се у циљу скрининга изводе много чешће и у ранијем животном добу у односу на оне са просјечним и умјереним ризиком.

### **2.2.7.Биомаркери колоректалног карцинома**

Велики напредак биомедицинских наука у другој половини прошлог и почетком овог вијека омогућио је откриће бројних нових туморских маркера. Нобелова награда је 1960 год. додијељена за откриће радиоимуноесеја, захваљујући чему је могуће одређивање специфичних и осјетљиво малих количина супстанци у биолошким течностима. За примјену моноклонских антитијела је петнаест година касније (1975год) такође додијељена Нобелова награда. Све ово је иницирало откриће бројних туморских маркера, укључујући и угљенохидрантне антигене (167).

Све супстанце које продукује сам тумор или било који производ метаболичког процеса удруженог са тумором у организму, називају се туморским маркерима. Данас је познато преко неколико стотина туморских маркера који могу имати прогностички и предиктивни значај, али ипак већина њих се првенствено користи за праћење антитуморске терапије. За сада ограничен број маркера може бити користан у раној дијагностици малигног тумора или у праћењу еволуције преканцерозних лезија (136)

Туморски маркери се дијеле на продукте тумора (она једињења која стварају сами тумори) и продукте који прате тумор (једињења која прате малигне процесе). Туморски маркери се даље дијеле на пролиферационе и диференцијационе (167).

Код бројних неоплазми је потребно одредити пролиферативни потенцијал самих туморских ћелија. Најчешће коришћени пролиферациони маркери су Ki67 и PCNA и скорије уведени антифосфоистон H3 (PHH3), митосин и MCM4 (168,169).

#### **2.2.7.1.Лептин и лептин рецептори**

Лептин (16кDa) је продукт *LEP* гена (*Ob* ген) који је локализован на дужем дијелу хромозома 7n(7q31) и припада фамилији цитокина. Име му потиче од грчке речи „*leptos*“ што значи витак, танак (170,171). Откривен је 1994год, када су Zhang и сар. радећи генетске анализе на сорти гојазних мишева (познатих као об/об мишеви) показали да код њих недостаје ген (об-ген) чији продукт учествује у регулацији телесне масе (13,171)

Лептин је протеин од 167 аминокиселина а главно мјесто његове продукције у одраслих особа је бијело масно ткиво. Поред тога, он је присутан и у бројним не-адипозним ткивима, укључујући желудачну мукозу(13,14,15), плућа (16), плаценту (17), епителне ћелије дојке (18), мозак, миоците, кост и хрскавицу (19). Лептин је пронађен и у амнионској течности и феталној плазми у 18 недељи гестације, а његова експресија је примijeђена и у простати, тестисима, јајницима,ендометријуму и у фоликулима длаке. Количина лептина који продукују ова не-адипозна ткива је мала и он дјелује углавном аутокринно или паракринно и мисли се да нема значаја у ендокриној регулацији енергетске потрошње (13,172).

Лептин циркулише у плазми у слободној форми или везан за лептин-везујући протеин. Код велике већине мршавих лептин циркулише у везаној форми, док је код гојазних особа углавном присутан у слободној форми. Ниво лептина се повећава ноћу. Током старења ниво лептина полако опада и ова редукција лептина је већа код жена него код мушкараца и не зависи од индекса тјелесне масе и других ендокриних промјена које су повезане са старењем (173). У хуманој патологији је нађена позитивна корелација нивоа лептина у циркулацији са масом поткожног масног ткива и индексом тјелесне масе. Запажено је да када дође до повећања броја и величине адипоцита, Об ген почиње са продукцијом лептина који бива секретован у циркулацију (174). Лептин се ослобађа циклично, обично 2-3 сата после оброка, а његов полуживот износи 30 минута. Ниво лептина је повишен у серуму гојазних људи, а недавни извјештаји указују да висок ниво лептина у серуму представља независан фактор ризика за настанак колоректалног карцинома (23).

Главна функција лептина је да регулише тјелесну масу путем негативне повратне спреге између адипозног ткива и центра за ситост у хипоталамусу (7,9). Лептин дјелује на метаболизам директно, тако што повећава интензитет метаболизма у адипоцитима и неадипозном ткиву, повећаном оксидацијом масних киселина и индиректно - смањењем нивоа инсулина у плазми и смањењем осјетљивости периферних ткива (прије свега адипоцита) на инсулин (14,172). Поред тога лептин учествује у регулацији утрошка енергије, у пролиферацији многих нормалних и неопластичних ткива, у ангиогенези, а има улогу и у хематопоези и репродукцији (14,16,7,20-22). Експериментално је показано да администрација лептина женкама мишева резултује овулацијом, трудноћом и лактацијом (170). Такође је запажено да је за вријеме репродуктивних година ниво лептина виши у

средици лутеинске фазе и да естрогени хормони повећавају ниво лептина, док је у менопаузи запажено смањење нивоа лептина (170, 175).

Лепин испољава своје дјеловање кроз специфичан рецептор *LEPR* (ObR), који је кодиран од стране *LEPR* гена. Лептин рецептори припадају првој класи рецептора цитокинске фамилије, који су идентификовани као протеини са мултиплим изоформама од *LEPRa* до *LEPRf*, које су спојене алтернативним спајањем, гдје се дуга изоформа *LEPRb* појављује као функционална сигнално-трансдуктивна изоформа јер активира интрацитоплазматске трансдукционе путеве и одговорна је за акције лептина. Улога краћих изоформи још увијек није прецизно дефинисана. (24,25).

Експресија лептин рецептора је откривена у многим ткивима при чему је запажено да лептин има стимулативни ефекат на пролиферацију малигних ћелија тумора различитих локализација, укључујући карцином желуца, плућа, дојке, карцином простате, карцином колоне, карцином ендометријума, штитасте жлијезде и др (7,9,15-23,26,27,32). У култури ткива је показано да лептин индукује пролиферацију хуманог аденокарцинома желуца на дозно зависан начин, преко активације путева сигналне трансдукције митоген-активирани протеин киназе (MAPK) кроз *LEPRb* рецепторе (176,177,178). Бројне студије истичу позитивну корелацију између експресије лептин рецептора и HIF-1 (хипоксија индуцибилни фактор 1). Добро је познато да је HIF-1 маркер недостатка кисеоника у сваком ткиву укључујући и неопластична ткива. Овај фактор подстиче прогрес тумора индукцијом бројних регулатора хомеостазе кисеоника, различитих фактора раста и њихових рецептора. Доказано је да хипоксија која се развија у туморском ткиву, вјероватно регулише и експресију лептин рецептора аналогно индукцији VEGF од стране HIF-1 (33,179,180). Са друге стране, фактори раста могу посредовати у индукцији различитих сигналних путева од стране HIF-1 (180,181). Неколико студија су, користећи различите ћелијске линије колоректалног карцинома, показале да лептин преко својих рецептора (*LEPR*) може активирати различите сигналне путеве за раст и пролиферацију ћелија рака, укључујући JAK/STAT, PI3K/AKT и MAP-киназни пут (182,183). Други истраживачи су показали да лептин стимулише фосфорилацију и активацију STAT3 протеина на JAK2 зависан начин, при чему је активирани STAT3 умјешан у пролиферацију, инхибицију апоптозе и ћелијску трансформацију (206 184,185,207). У прилог овога иду резултати Abubaker и сар. (186) који су утврдили да се инхибицијом JAK2 активности прекида активација STAT3 сигналног

пута. Такође је показано да се активација PI3K/AKT уз помоћ лептина дешава путем активације JAK2 (28,184,187,188). На основу извјештаја Wang и сар. (28), може се претпоставити да лептин модулира опстанак ћелија колоректалног карцинома путем активације PI3K/AKT/mTOR сигналних путева.

#### **2.2.7.2.Епителни муцини**

Мукус (слуз) је вискозна, колоидна материја коју стварају специјализоване пехарасте ћелије мукозних или мјешовитих серомукозних жлијезда.У виду танког слоја гела нерастворљивог у води прекрива епител цјевастих органа (трахеобронхијално стабло, гастроинтестинални и репродуктивни тракт) и неких специјализованих органа (јетра, панкреас, жучна кеса, бубрег, пљувачне и сузне жлијезде) и одваја га од садржаја у лумену. Мукус покрива слузокоже које непосредно или посредно долазе у контакт са спољашњом средином гдје, прије свега, има протективну улогу (189). Садржи воду, антисептичке ензиме, имуноглобулине, неорганске соли, протеине, гликопротеинске макромолекуле – муцине (190).Састав мукуса зависи од локализације и патофизиолошких услова, али у основи мукус чине немучинске компоненте и муцини. Немучински дио чини вода,неорганске соли,,имуноглобулини, десквамиране епителне ћелије и др. (191)

Муцини су најзаступљенија компонента одговорна за биохемијска и биофизичка својства мукуса (192). Дијеле се у двије велике групе: мембрански и секреторни муцини. Специфична грађа ових макромолекула доприноси специјализованим улогама. Муцини представљају селективну молекуларну баријеру на епителној површини, обезбјеђују заштиту ћелијске површине и учествују у морфогенетској ћелијској трансдукцији (193,194). То су сложена макромолекулска једињења састављена од протеина и полисахарида везаних међу собом чврстим ковалентним везама. Протеинску компоненту чини полипептидни ланац, а преко 70% молекулске тежине чине полисахариди у форми угљенохидратних бочних ланаца који су припојени за протеинску компоненту.(34,194,195).

Муцини су најприје подијељени на епителне и мезенхимне муцине у зависности од тога да ли их секретују епителне или мезенхимне ћелије. Даље постоје различите биохемијске и хистохемијске подјеле муцина, на основу састава угљених хидрата. По Мајеровој класификацији из 1945 год муцини се, на основу хистохемијских карактеристика, дијеле на неутралне-фукомуцине, слабо киселе или сијаломуцине и јако киселе-сулфомуцине.

Фукомуцини садрже Н-ацетил деривате хексозамина, Д-галактозу, Д-манозу и Л-фукозу. Фукомуцини немају кисјеле групе па се боје PAS методом (Periodic Acid Schiff).Сијаломуцини садрже хексозамин, глукуронску и сијалинску киселину, а сулфомуцини поред хексозамина и уронске киселине садрже и сулфатне групе (34,196,197).

У односу на структуру и физиолошке функције муцини су подијељени на секреторне и мембранске муцине (198,199) Секреторним муцинима припадају MUC 2, MUC5AC, MUC5B,MUC6,MUC7, MUC8, MUC9 и MUC19. Они формирају физиолошку баријеру која штити епителне ћелије респираторног, дигестивног и репродуктивног система и облажу дукталне површине у дојци, панкреасу, јетри и бубрезима. MUC7,MUC8 и MUC 9, из ове групе су искључиво секреторни и солубилни муцини који не учествују у формирању заштитног гела на слузокожама. Мембрански муцини су MUC1,MUC3, MUC3A, MUC3B,MUC4,MUC12,MUC13,MUC15,MUC16,MUC17,MUC20 и MUC21. Они доприносе физиолошкој баријери и спроводе сигнале за раст и преживљавање у унутрашњост ћелије (36,199-205).

Синтеза мукусних гликопротеина почиње у гранулираном ендоплазматском ретикулуму у коме се синтетише протеинско језгро. Након тога настаје гликозилација вишеетапним додавањем појединачних молекула шећера чиме се формирају бочне угљенохидратне гране. Гликозилација се највећим дијелом дешава у глатком ендоплазматском ретикулуму и Голџи апарату, после чега се преформирани мукус пакује и депонује у цитоплазматске везикуле тако да је спреман за секрецију.Секреција мукусних гликопротеина је спор али континуиран процес чиме се одржава танак слој на површини слузокоже. Убрзана секреција се одвија под дејством различитих стимулуса, физичких или хемијских фактора.Муцини ослобођени из цитоплазматских везикула се везују за воду и у виду гела облажу слузокожу (206).

Најзначајније особине муцина су адхезивност, кохезивност, вискозност и способност адсорпције. *Адхезивност* је мјера силе којом је једна супстанца припојена за другу.Захваљујући снажној адхезивности муцини остају чврсто припојени за покровни епител. *Кохезивност* је сила којом су молекули у једној супстанци међусобно припојени. Захваљујући овој особини мукус ствара слој на површини слузокоже који комплетно покрива и премошћује зјапове крипти. *Вискозност* представља својство љепљивости, па

изражена вискозност мукуса условљава отпорност на цурење и спречава десквамацију и одвајање од површине и мукусног слоја. *Адсорптивно својство* муцина се огледа у томе што је мукусни слој на површини у стању да апсорбује многе супстанце па и бактерије из лумена (34,206).

Промјене у муцинској експресији или гликозилацији праћене су развојем карцинома и утичу на ћелијски раст, диференцијацију, трансформацију, адхезију, инвазивност и имунолошку контролу. Муцини се зато користе као дијагностички маркер, а истражује се и могућност њихове примјене као терапијских мета код многих тумора. (36,190)

Механизам на који муцини учествују у патогенези канцера није сасвим расвијетљен, али подручје туморског раста је хипоксично, кисело и пуно протеаза и других биолошки активних супстанци, па туморско ткиво вјероватно користи муцине за конфигурацију микроокружења за вријеме инвазије, метастазирања и раста у неповољним условима (196). Повећане концентрације муцинских гликопротеина у серуму корелирају са повећањем ризика за настанак тумора и лошом прогнозом, а сматра се да прекомјерна експресија, неадекватна експресија или експресија аберантних форми муцина доприноси патогенези карцинома (190,207).

### **2.2.7.3. Пролиферативни Ki67 антиген**

Ki67 је нехистонски протеин код кога су идентификоване две изоформе са различитим молекулским масама: од 345kD и 395kD. Сматра се да игра примарну улогу у стабилизацији хроматинског материјала једра јер је везан за густе фибрилари региони једарца. Експресија протеина Ki67 је строго контролисана, он подлеже фосфорализацији и дефосфорализацији током митозе, а његова количина се регулише протеолитичким путевима, вјероватно укључивањем комплекса протеаза, што резултује његовим кратким полуживотом од 60-90 минута (208). Сигурно је доказано да је овај протеин важан за пролиферацију ћелија, будући да његово уклањање помоћу *antisense nucleotides* спречава ћелијску пролиферацију. На основу локализације протеина Ki67 унутар екстрануклеоларних мјеста током ране G1 фазе се истиче и његова улога у организацији ДНК (209)

Прво моноклонско антитијело на нуклеарни антиген пролиферишућих ћелија је названо Ki67 антитијело и направљено је имунизацијом миша са ћелијском линијом L428 Hodgkin-



овог лимфома. Име је добио по граду свог поријекла-Kiel (Њемачка) и броју оригиналних клонова. MIB-1 је најчешће коришћено моноклонско антителијело које открива Ki67 антиген. Ki67 се налази у ћелијама само у пролиферативној фази циклуса (210). Он се визуализује у једрима ћелија током касне G<sub>1</sub>, S, G<sub>2</sub> и M фазе ћелијског циклуса. Антиген се не може детектовати у G<sub>0</sub> фази (211).

Постоји запажање да експресија Ki67 варира током ћелијског циклуса, при чему овај антиген постаје детектибилан током средње-касне G<sub>1</sub> фазе, а затим његова експресија расте кроз S, G<sub>2</sub> до M фазе. Исти аутори истичу да је имунохистохемијска детекција Ki67 унутар ћелијског циклуса строго мјера “стања пролиферације”, прије него “степен пролиферације” (пролиферативне активности). Уколико се узме ово ограничење маркери стања пролиферације би могли да имају прогностички значај код одређених типова неоплазми (212)

Имунохистохемијско маркирање ћелија на Ki67 показало се корисним код многих патолошких стања укључујући и туморе. Ki67 се може користити за процјену пролиферативне активности тумора, али и за диферентовање бенигну од малигну тумора. Наиме, митотска активност код бенигну тумора обично изостаје или је врло ниска, док је код малигну она врло висока и у корелацији је са степеном прогресије тумора (211).

Недостатак у примјени Ki67 антителијела на хумани Ki67 протеин је често присутна унакрсна реакција, па је данас доступан читав спектар еквивалената означених као MIB (Molecular Immunology Borstel) и TuBB (Tumor Biology Borstel) да би се стекао бољи увид у функцију нуклеарног Ki67 молекула. MIB-1 се може користити за маркирање Ki67 еквивалената код различитих сисара (коњи, овце, пси), док MIB-5, реагује са Ki67 еквивалентима само код пацова (169,213)

#### **2.2.7.4. Ендоглин (CD105) и неоангиогенеза**

Неоангиогенеза подразумијева формирање нових крвних судова пролиферацијом нових капилара од већ постојећих крвних судова и тако заузима значајну улогу у неконтролисаној пролиферацији ћелија, преживљавању малигну ћелија и помаже како локалне тако и удаљене процесе туморске инвазије. Сматра се да значајно повећава ризик од рецидива и удаљених метастаза (214).

Познато је да нормална ткивна васкуларизација не може подржати раст тумора више од 2 мм у пречнику. Формирање нових крвних судова је неопходно за развој тумора као и за инвазију и метастазирање. Неоваскуларизација тумора је интересантна мета за хемотерапију, зато што су, уопштено гледано, зреле ендотелне ћелије неактивне изузев у менструалном циклусу (215).

Неоваскуларизација тумора се може дешавати помоћу различитих механизма, зависно од типа тумора, стадијума развоја тумора и од анатомске локализације. Индукција ангиогенезе се догађа када се поремети баланс између проангиогенетских и антиангиогенетских фактора. Поремећај ове равнотеже у туморима може бити изазван хипоксијом или генетском алтерацијом која активира онкогенезу и/или инактивира тумор-супресорне гене. Ендотелне ћелије које формирају зид постојећих малих крвних судова су активирани, деградирају екстрацелуларни матрикс, мигрирају кроз матрикс и пролиферишу. Нове ендотелне ћелије се организују у шупље цијеве које напосљетку праве анастомозе у циљу формирања нових капилара (216).

Folkman је 1971 год. изнио теорију о значају крвних судова за туморски раст, односно да је раст тумора зависан од ангиогенезе. Наиме, једном кад је тумор настао, сваком даљем повећању туморске масе мора да предходи повећање броја капилара који конвергирају ка тумору и који обезбјеђују нутрицију и кисеоник тумору и одводе катаболите. Истовремено ендотелне ћелије продукују факторе раста са паракриним стимулишућим ефектом на туморске ћелије (214).

Користећи кисеоник који дифундује из постојећих крвних судова, тумор расте све док потражња за кисеоником не надмаши залихе кисеоника. Следствена хипоксија индуковаће туморске ћелије да стварају, посредством повећане транскрипције (која је регулисана од стране транскрипционог фактора индукованог хипоксијом HIF1 $\alpha$ ) и повећане стабилизације mRNA, серију проангиогенетских фактора који функционишу као високо специфични фактори раста/фактори преживљавања за ендотелијалне ћелије (217). Међу овим факторима се налазе VEGF, FGF (*fibroblast growth factor*), трансформишући фактор раста  $\beta$  и фактор некрозе тумора  $\alpha$ . Сматра се да су VEGF и FGF најважнији медијатори у процесу туморске ангиогенезе. VEGF (VEGF-A) индукује пролиферацију васкуларних ендотелних ћелија, подржава њихов опстанак у новоформираним крвним судовима и повећава пермеабилност крвних судова (215,217,218). Иако повећава пермеабилност крвних судова, VEGF омогућава

формирање екстраваскуларног фибринског гела који помаже раст ендотелних ћелија. Ови процеси омогућују убрзан раст тумора који тако долази у стање хипоксије, која заузврат доводи до продукције VEGF-a, најпотентнијег члана фамилије фактора раста ендотелних ћелија (216,217,218).

У литератури се за процјену степена ангиогенезе користе различита антитијела (219,220). У овој студији је коришћено антитијело CD105, прије свега због тога што ендоглинска антитела маркирају активирани ендотелне ћелије које учествују у туморској ангиогенези. Доказано је да се анти CD105 антитијела везују за све новостворене ендотелне ћелије и крвне судове и да се везују само на око 20% претходно формираних не-неопластичних крвних судова (221). Такође је запажено да се CD105 не везује за запаљенске и стромалне ћелије што смањује број лажно позитивних резултата (222).

Ендоглин је трансмембрански гликопротеин молекуларне масе 180kD (223). Протеин CD105 је рецептор за TGF-бета (*transforming growth factor*). Након што се CD105 веже за рецепторе TGF-бета 1 и 3 (224,225), долази до активације SMAD протеина (224) и преноса сигнала даље према једру (225). Ген за CD105 је лоциран на хромозому 9q34 (226).

Различите студије су показале да је CD105 много осјетљивији и специфичнији од панендотелних маркера (227,228). Показало се да CD105 може бити важан прогностички параметер за многе туморе (плућа, дојке, желуца, мозга, ендометријума, главе и врата.). MVD (*microvascular density*) одређен употребом CD105 антитијела може да укаже на повећан ризик за развој локорегионалне рекурентне болести. Према садашњим сазнањима CD105 представља одличну мету (229) за примјену антиангиогене терапије и добар је показатељ туморске прогнозе (222,226,229).

### 3.ЦИЉ ИСТРАЖИВАЊА

Основни циљ овог истраживања је испитивање повезаности експресије лептинских рецептора са експресијом маркера пролиферације (Ki67), неоангиогенезе (CD105) и секрецијом муцина у аденокарциному колона. У складу са овим основним циљем постављени су следећи задаци:

- 1.Анализа експресије лептин рецептора (LEPR) у исјечцима ткива аденокарцинома колона и корелација те експресије са класичним прогностичким параметрима (пол, старост, локализација и величина тумора, степен хистолошке диференцијације, стадијум по Astler-Coller-у, лимфоцитни инфилтрат, дезмоплазија, некроза).
- 2.Квалитативна и семиквантитативна хистохемијска анализа секреције неутралних-фукомуцина, слабо кисјелих сијаломуцина и јако кисјелих сулфомуцина, и корелација ових вриједности са експресијом лептинских рецептора (LEPR)
- 3.Анализа експресије маркера пролиферације Ki67 у туморском ткиву, анализа маркера неоангиогенезе ендоглина (CD105) у туморском ткиву и перитуморској строми и корелација ових вриједности са експресијом лептинских рецептора

## 4. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

Истраживање је спроведено као ретроспективна клиничко-експериментална студија. У студију су укључени испитаници са колоректалним карциномом који је верификован колоноскопским и потврђен патохистолошким прегледом. Из студије су били искључени испитаници са колоректалним карциномом код којих је спроведена зрачна и хемиотерапија.

За истраживање је коришћен биопсијски, оперативни материјал Хируршке клинике Клиничког Центра Црне Горе (КЦЦГ) добијен ресекцијом колоректалног тумора у периоду од јануара 2010. до децембра 2012. године. У Институту за патологију КЦЦГ је, према устаљеном протоколу, од сваког оперативног препарата, у зависности од величине тумора, узимано од 5 до 15 биопсија, укључујући и по 2-3 биопсије околног здравог ткива колона. Након класичне фиксације у 4% неутралном пуферизованом раствору формалдехида, биопсијски материјал је рутински обрађиван у аутотехнику, калупљен у парафинске блокове и архивиран по припадности свом патохистолошком случају.

На основу стандардних патохистолошких извјештаја, из тог периода, формирана је експериментална група коју су чиниле оперативне биопсије колоректалног аденокарцинома ( $n=75$ ). Контролну групу ( $n=75$ ) су чиниле оперативне биопсије не-туморског ткива колона (из околине тумора) које се према протоколу узимају из оперативног препарата достављеног Институту за патологију.

Ово истраживање је обављено у складу са Хелсиншком декларацијом и препорукама Светске Здравствене Организације (СЗО) за експерименте на хуманом материјалу. За истраживање постоји сагласност надлежног Етичког комитета (бр. одлуке 03/01-15221/2)

### 4.1. Ткивни узорци

Са парафинских блокова 75 оперисаних болесника, су на микротомому *LeicaRM 2135, (Austria)*, прављени резови дебљине 3-4 $\mu$ m, који су затим адхерирани на предметна стакла. За рутинску *Hematoxilin-Eosin (H&E)* методу и за хистохемијске технике бојења су коришћене обичне *Isolab (Germany)* плочице, док су пресеци за имунохистохемијска

бојења монтирани на посебним високо адхерентним *StarFrost, Waldemar Knittel* предметним стаклима.

## 4.2. Методе

На ткивним пресецима, добијеним са парафинских блокова, су након депарафинисања у ксилолу и хидратације у опадајућим алкохолима примијењене сљедеће хистопатолошке методе:

- Рутинска Н&Е метода, на основу које смо добили информације о хистопатолошком типу тумора, хистолошком градусу тумора, дубини инвазије, инвазији лимфних судова, ангиоинвазији, перинеуралној инвазији, инфламацијском инфилтрату, дезмоплазији и некрози.
- Хистохемијска АВ-PAS (Alcian Blue-Periodic Acid Schiff) метода за диференцијацију неутралних од киселих муцина, при чему се неутрални муцини боје пурпурно црвено, а кисели тиркизно плаво.
- Хистохемијска НID-AB (пХ 2,5) (High Iron Diamine Alcian Blue) метода за диференцијацију слабо киселих, интестиналних-сијаломуцина, од јако киселих, колонских сулфомуцина. Сијаломуцине АВ рН 2,5 боји тиркизно плаво, док НID боји сулфатирани муцине браон до црно.
- Имунохистохемијска ABC метода са анти- LEPR (анти- лептин рецептор), анти-Ki67 и анти- CD105 антитијелима.

### 4.2.1. Имунохистохемијски метод

Имунохистохемијске методе се користе за имунотипизацију ћелијских молекула. Базирају се на реакцији између антигена и антитијела. Примјеном одговарајућих антитијела специфичних за одређене врсте рецептора у једру, цитоплазми или на ћелијској мембрани, могућа је визуализација дефинисаних антигена, у ткивним пресецима, везивањем антитијела за мале специфичне регионе антигена ткз. *enitome* ,уз помоћ ткивног ензима, најчешће пероксидазе.

За имунохистохемијско одређивање нивоа експресије LEPR, Ki67 и CD105 је коришћена комплексна авидин-биотин (ABC) метода (230) са примарним антитијелима чије су карактеристике приказане у табели 6.

**Табела 6.** Примарна антитијела коришћена у истраживању

Антитијело	Произвођач	Кат.бр	Клон	Разблажење
Rabbit anti-LEPR antibody	Abcam	Ab 60042	Polyclonal	1:80
Rabbit monoclonal Ki67 antibody	Abcam	Ab16667	SP6	1:100
Mouse monoclonal anti-CD105 antibody	DAKO	M3527	SN6h	1:40

#### 4.2.1.1. Извођење имуноензимске реакције

Ткивни исјечци пренијети на Superfrost+ предметна стакла су најприје депарафинисани кроз серију ксилола (4 пута по 5 мин), рехидратисани у серији алкохола (3 пута по 5 мин.). Затим се приступило демаскирању антигена у цитратном пуферу (pH 6,00), у микроталасној пећници. Након испирања у фосфатном пуферу (PBS pH 7.4), уследило је блокирање ендogene пероксидазе у трајању од 20 минута у 3% метанолском раствору водоник пероксида (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Затим је уследило испирање у PBS-у, а потом инкубација преко ноћи на +4<sup>0</sup>Ц са примарним антитијелима (анти-Лептин рецептор, анти-Ki67 и анти-CD105). Обиљежени антигени су, након испирања, инкубирани са биотинисаним секундарним антитијелом (Vectastain Elite ABC кит, Vector Laboratories, Burlingame, CA) 1 сат на собној температури. Ово биотинисано антитијело реагује са авидинским молекулима коњугованим са пероксидазом. Након испирања у PBS-у, уследила је визуализација помоћу диаминобензидин-тетрахидрохлорид-а (DAB), којом су маркирана мјеста антиген-антитијело реакције браон бојом, а затим се радило контрастно бојење Mayer-овим хематоксилином. Након испирања у дестилованој води, рађена је дехидрирација кроз растуће концентрације алкохола (70,95,100%) и испирање три пута у ксилолу. Поступак се завршавао апликацијум канада-балзама и прекривањем ткивних узорака покровним стаклом.

#### 4.2.1.2. Вриједновање резултата ткивне експресије

Секреција епителних муцина је скорована по следећој скали: - (минус) асекреција муцина; + /-(плус,минус) секреција муцина у трагу; + (један плус) умјерена секреција ; ++ (два плуса) хиперсекреција муцина (196).

Експресија лептин рецептора је одређивана на 10 видних поља (средња вриједност добијена бројањем у десет видних поља је коначан резултат за случај) и класификована на следећи начин: 0, <10% позитивних ћелија (негативан налаз); 1+, 10-50% позитивних ћелија; 2+, >50% позитивних ћелија (179)

За евалуацију експресије Ki67 се узимала у обзир само пребојеност једара, а за одређивање густине Ki67 позитивних ћелија по ареи површине у  $\text{mm}^2$  је коришћен многонамјенски тестни систем M42 по Weibel-у. Објективним микрометром (Reichert Wien 2мм/200) калибрисан је тестни систем на микроскопу Olympus BH-2, на увећању 400 (10 окулар x 40 објектив), при чему је одређено мјерно поље од  $0,016\text{mm}^2$ . За испитивање густине Ki67 позитивних ћелија/ $\text{mm}^2$  је бројано сукцесивно по 10 „врхних тачака“. Апсолутна вриједност густине позитивних ћелија у „врхној тачки“ је одређивана стереометријски (231). Аритметичка средина добијених вриједности „врхних тачака“ представља коначан број Ki67 позитивних ћелија у  $\text{mm}^2$  за случај. Затим је одређена медијана и испитаници су подијељени у двије групе: они са ниским степеном експресије (вриједности мање или једнаке вриједностима медијане) и они са високим степеном експресије (вриједности веће од вриједности медијане). Из апсолутно одређених вриједности пролиферативног антигена Ki67 у односу на одступање од медијане добијен је индекс пролиферације.

Густина микроциркулације (MVD), се рачунала бројањем микроваскуларних CD105 позитивних структура, тако што су на микроскопском увећању x400 најприје селектована мјеста највеће микроваскуларне густине („врхне тачке“). Свака појединачна ћелија или поље обојено имунохистохемијским маркером је рачунато као микроваскуларна структура. За одређивање микроваскуларне густине је такође коришћен многонамјенски тестни систем M42 по Weibel-у и мјерно поље од  $0,016\text{mm}^2$  на микроскопу Olympus BH-2. За испитивање густине микроциркулације по  $\text{mm}^2$  је бројано сукцесивно по 10 „врхних тачака“.



Апсолутна вриједност густине позитивних васкуларних структура у „врхој тачци“ је одређивана такође стереометријски (231)

Средња вриједност добијена бројањем у десет видних поља је коначан резултат за испитаника. Након добијених података о броју микроваскуларних структура, за сваког пацијента је израчуната медијана, у односу на коју су пацијенти подијељени у двије групе: они са ниским степеном ангиогенезе (MVD у тумору мања од вриједности медијане) и они са високим степеном ангиогенезе (MVD у тумору већа од вриједности медијане). Из апсолутно одређених вриједности густине микроциркулације у односу на одступање од медијане добијен је индекс MVD.

Репрезентативна поља, за фотографије приложене у овој студији, су снимана коришћењем три микроскопска увеличања (x10, x20 и x40) помоћу микроскопа *Nikon Eclipse Ni (MBP 99 400)*, опремљеног камером.

#### **4.2.1.3. Контрола квалитета и специфичности имунохистохемијског бојења**

Сва имунохистохемијска бојења су изведена уз контролу квалитета и специфичности бојења, примјеном позитивних и негативних контрола према пропозицијама UK NEQAS (UK National External Quality Assessment Service for Immunohistochemistry )

Као позитивне контроле су се користили узорци инвазивног карцинома дојке, који су раније вишеструко тестирани и сигурно садрже испитиване антигене. Као негативна контрола за имунохистохемијско бојење користити су се узорци ткива третирани не имуним серумом умјесто примарног антитијела.

Експресија испитиваних маркера је евалуирана од стране два независна истраживача (патолога).

#### **4.2.2. Статистичка обрада података**

За статистичку обраду добијених резултата коришћен је комерцијални програмски пакет SPSS(верзија 13.0). На почетку истраживања све варијабле описане су класичним дескриптивним методама статистике. Атрибутивна обиљежја описана су апсолутним и релативним бројевима, а нумеричка мјерама централне тенденције (аритметичка средина и

медијана) и мјерама варијабилитета (стандардна девијација, минимална и максимална вриједност). Приказ добијених резултата дат је табеларно и графички.

Нормалност расподеле евалуирана је Kolmogorov-Smirnov тестом. Поред униваријантне статистичке анализе, рађена је и анализа сигнификантности разлика параметарских и непараметарских обиљежја, између и унутар група, примјеном  $\chi^2$ - теста (Хи-квадрат тест)), Mann-Whitney U- теста, Kruskal Wallis– теста и , Student-овог t- теста. Зависност између двије нумеричке промјенљиве испитивана је помоћу Spearman-овог коефицијента корелације ранга и Pearson-овог коефицијента корелације за параметарска обиљежја. Помоћу ROC (Receiver Operating Characteristic) анализе је испитивана могућност да нека промјенљива буде маркер и одређена гранична вриједност за испитиване маркере.

Тестирање значајности извршено је на нивоу вјероватноће  $p < 0.05$  и  $p < 0.1$ .

## 5. РЕЗУЛТАТИ ИСТРАЖИВАЊА

### 5.1. Демографске карактеристике испитаника

У испитиваном узорку пацијената којима је оперативно одстрањен колоректални карцином било је 45 особа мушког пола (60%) и 30 жена(40%). (График 1.). Разлика у заступљености испитаника по полу није статистички значајна, на усвојеном нивоу поузданости  $p < 0.05$ . ( $\chi^2$ -тест=3.000,  $p=0.083 > 0.05$ )

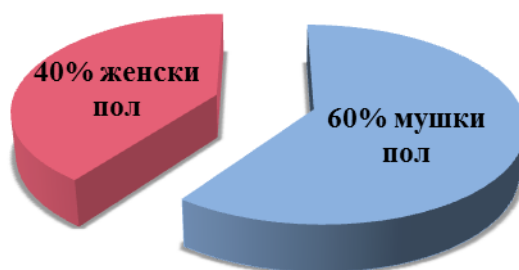


График 1. Расподјела испитаника по полу

Расподјела пацијената по годинама старости показује да се групе по полу не разликују значајно. Сличност расподјела доказује се тестирањем значајности између група. (Табела 7.,График 2., Mann-Whitney U-тест=569.500,  $p=0.232$ ).

Табела 7. Расподјела пацијената по полу и годинама старости

Године старости	ПОЛ			
	Мушки		Женски	
	n	%	N	%
<51	3	6.7	8	26.7
51-60	10	22.2	3	10.0
61-70	15	33.3	10	33.3
>70	17	37.8	9	30.0
УКУПНО	45	100.0	30	100.0

Доказана сличност у расподјелама по интервалима година старости између мушкараца и жена, потврђује се упоређењем просјечне старосне доби. Мушки пацијенти су имали у просјеку  $65.9 \pm 10.8$  година а жене  $60.8 \pm 14.5$  година, што није значајна разлика (Student-ov T-тест=1.622,  $p=0.111$ ).

Најмлађи оперисани мушкарац имао је 34 година а најстарији 89, најмлађа жена имала је 27 а најстарија 83 године.

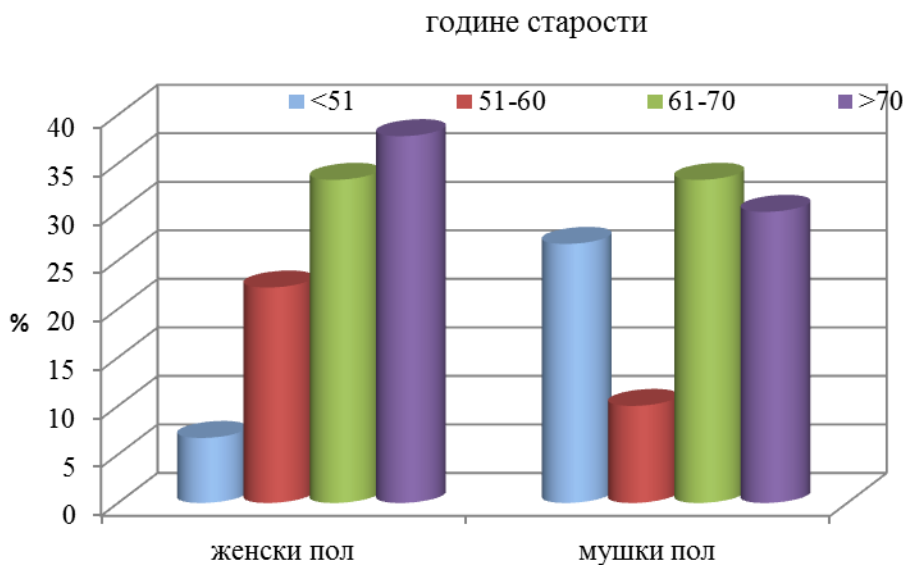


График 2. Расподјела пацијената по полу и годинама старости

## 5.2. Експресија лептин рецептора и муцинске секреције у испитиваној и контролној групи

Карактеристике ткива колоректалног карцинома у односу на експресију лептин рецептора и муцинску секрецију, процијењене су упоређењем са околним здравим ткивом. Случајеви ткива колоректалног карцинома анализирани након оперативне биопсије, чинили су испитивану групу а случајеви оперативне биопсије здравог ткива били су контролна група.

Упоређење расподјела поменутих ткива по интервалима заступљености позитивних ћелија лептин рецептора, што је приказано на Табели 8 и Графику 3., показује да се групе значајно разликују. (Mann –Whitney U-тест=1337.5.,  $p < 0.0001$ ).

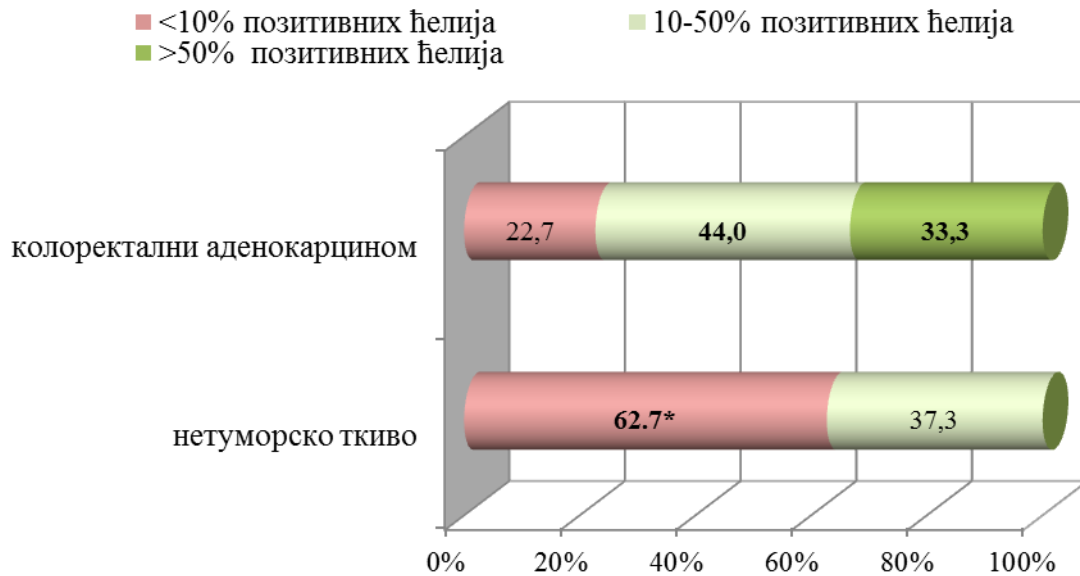
У ткиву нормалне колоректалне мукозе нема експресије лептин рецептора (мање од 10% позитивних ћелија) у сигнификантном броју случајева (62.7 %,  $\chi^2$ -тест=4.813,  $p=0.028$ ). Умјерена експресија лептин рецептора (10% до 50 % позитивних ћелија) нађена је код 28 случајева (37.3%,  $\chi^2$ -тест=4.813,  $p=0.028$ ).

Насупрот тога, у ткиву колоректалног аденокарцинома знатно је мањи број случајева без експресије лептин рецептора (22.7%). У овој групи је најчешће (44 %) заступљена умјерена експресија лептин рецептора (10-50%, позитивних ћелија). Код једне трећине случајева (33.3 %) је нађена изражена експресија лептин рецептора (изнад 50% позитивних ћелија), тако да је појава експресије лептин рецептора верификована у сигнификантном броју случајева (77.3%) колоректалног аденокарцинома.

Табела 8. Експресија лептин рецептора у колоректалном аденокарциному и нетуморском околном ткиву

Експресија <b>LEPR</b>	Групе – ткиво			
	Колоректални аденокарцином		Нетуморско ткиво	
	п	%	п	%
<10% позитивних ћелија	17	22.7	47	<b>62.7</b>
10-50% позитивних ћелија	33	<b>44.0</b>	28	37.3
>50% позитивних ћелија	25	<b>33.3</b>	-	-
УКУПНО	75	100.0	75	100.0

### Експресија лептинских рецептора -LEPR



*c - сигнификантна разлика*

График 3. Експресија лептин рецептора у колоректалном аденокарциному и нетуморском околном ткиву

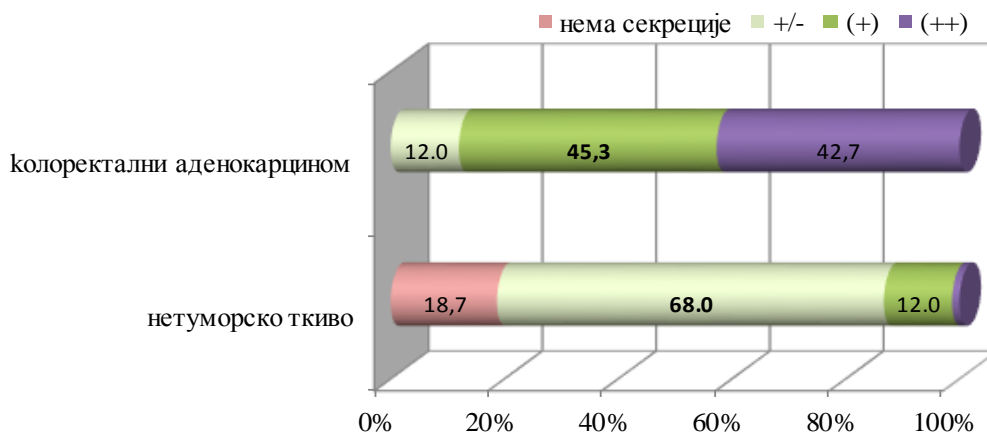
У нетуморском ткиву нема секреције неутралних или фукомуцина у 97.3% случајева, што је очигледна сигнификантност коју није потребно статистички доказивати (Табела 9. График 4.)

У ткиву колоректалног аденокарцинома повећава се шанса за присуство неутралних муцина, тако да је код 6.7% испитаника нађена умјерена секреција, код 45.3% случајева секреција у трагу, док је код 48% случајева колоректалног карцинома верификована асекретија фукомуцина.

Табела 9. Расподјела ФУКОМУЦИНА у колоректалном аденокарциному и нетуморском околном ткиву

ФУКОМУЦИНИ - неутрални	Групе – ткиво			
	Колоректални аденокарцином		Нетуморско ткиво	
	n	%	n	%
Нема секреције	36	48.0	73	97.3
+/-	34	45.3	2	2.7
(+)	5	6.7	-	-
УКУПНО	75	100.0	75	100.0

## СИЈАЛОМУЦИНИ



*Сиг.-значајна разлика*

График 4. Расподјела фукомуцина у колоректалном аденокарциному и нетуморском околном ткиву

У контролној групи, у сигнификантном броју случајева у односу на остале категорије, најчесталији налаз је секреција сијаломуцина у трагу (68%,  $\chi^2$ -тест=9.720,  $p=0.002$ ). Учесталост асекреције (18.7%) или умјерена секреција (12%) сијаломуцина, у овој групи, заступљена је знатно ређе и без значајне статистичке разлике. Појава хиперсекреције сијаломуцина код нетуморског околног ткива је изузетно је ријетка појава (1.3%).

Насупрот овакве расподјеле секреције сијаломуцина, код колоректалног аденокарцинома није нађена асекреција ни у једном, а секреција у трагу је заступљена у 12% случајева. Ово је знатно мање у односу на учесталост умјерене секреције (45.3%) и хиперсекреције (42.7%), без веће статистичке разлике. (Табела 10., График 5.).

Табела 10. Расподјела СИЈАЛОМУЦИНА у колоректалном аденокарциному и здравом колоректалном ткиву

СИЈАЛОМУЦИНИ - слабо кисјели	Групе – ткиво			
	Колоректални аденокарцином		Нетуморско ткиво	
	n	%	n	%
Нема секреције	-	-	14	18.7
+/-	9	12.0	51	<b>68.0</b>
(+)	34	<b>45.3</b>	9	12.0
(++)	32	<b>42.7</b>	1	1.3
УКУПНО	75	100.0	75	100.0

## СИЈАЛОМУЦИНИ

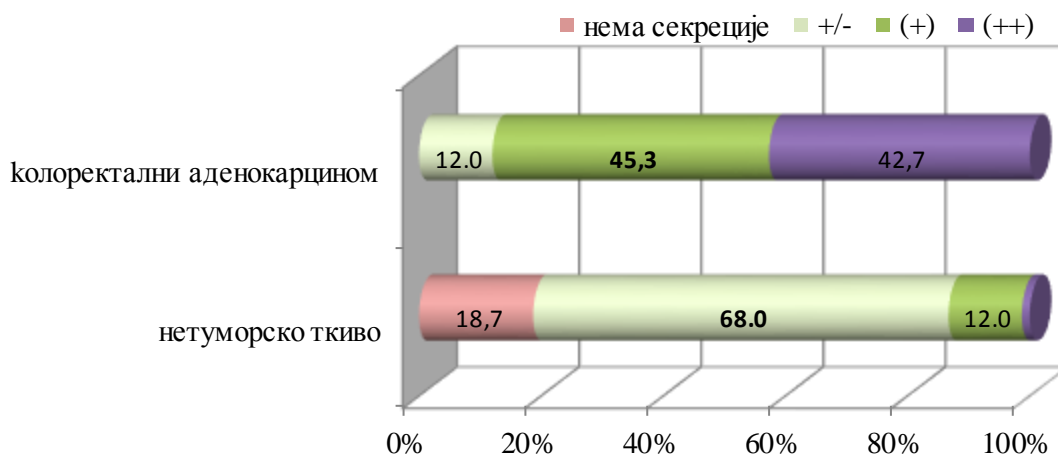


График 5. Расподјела сијаломуцина у колоректалном аденокарциному и нетуморском околном ткиву

Анализа нетуморског околног ткива показује сигнификантну хиперсекрецију (74.7%) јако киселих сулфомуцина муцина, што је статистичка значајност коју не треба посебно доказивати. Само око једне четвртине узорака (25.3%), имало је умјерену секрецију, док секреција у трагу и асекреција сулфомуцина нису утврђене.

Насупрот овог налаза, у групи колоректалних аденокарцинома, хиперсекреција сулфомуцина није идентификована ни у једном случају, а умјерена секреција је знатно ређа појава у односу на преостале случајеве. У већини преосталих случајева нађена је асекреција сулфомуцина (53.3% случајева), или секреција у трагу (33.3% случајева). (Табела 11., График 6.).

Табела 11. Расподјела СУЛФОМУЦИНА у колоректалном аденокарциному и околном нетуморском ткиву

СУЛФОМУЦИНИ - јако кисјели	Групе – ткиво			
	Колоректални аденокарцином		Нетуморско ткиво	
	п	%	п	%
Нема секреције	25	<b>33.3</b>	-	-
+/-	40	<b>53.3</b>	-	-
(+)	10	13.3	19	25.3
(++)	-	-	56	<b>74.7</b>
УКУПНО	75	100.0	75	100.0



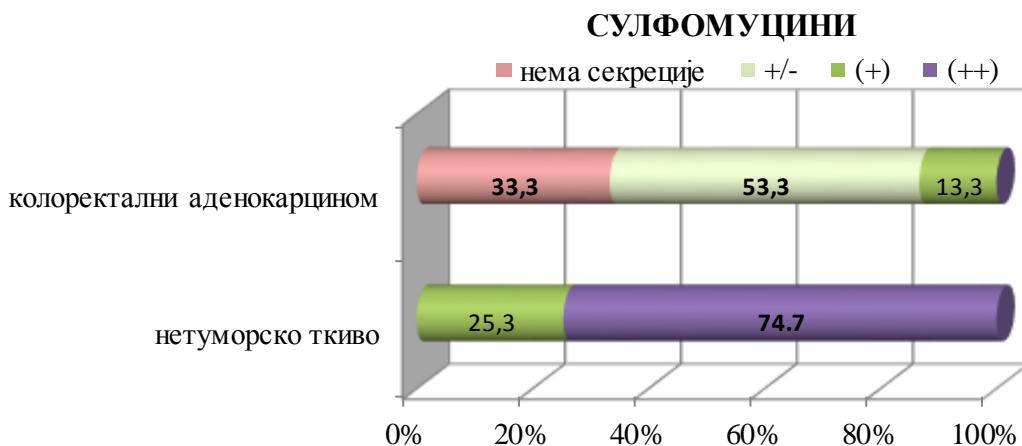


График 6. Расподјела сулфомуцина у колоректалном аденокарциному и околном нетуморском ткиву

У наставку анализе разматрана је зависност експресије лептин рецептора у односу на тип и интензитет експресије муцина.

Одсуство експресије лептин рецептора (до 10% позитивних ћелија) у колоректалном аденокарциному корелира са високо сигнификантном учесталošћу (94.1%) асекреције фукомуцина.

Када је експресија лептин рецептора умјерена (10% до 50%) или изражена (преко 50%), тада нема секреције у 32% односно 36.4% случајева, или је секреција заступљена у трагу у 54.5% односно 60% случајева. У оба случаја је присуство изражене секреције фукомуцина врло ријетка појава (8% односно 9.1% случајева). Сличност расподјела секреције фукомуцина при умјереној и израженој експресији лептин рецептора је очигледна. (Табела 12. График 7.).

Табела 12. Расподјела фукомуцина у односу на експресију лептин рецептора у ткиву колоректалног аденокарцинома

ФУКОМУЦИНИ - неутрални	Експресија <b>LEPR</b> у колоректалном аденокарциному					
	<10% позитивних ћелија		10-50% позитивних ћелија		>50% позитивних ћелија	
	n	%	n	%	n	%
Нема секреције	16	<b>94.1</b>	12	<b>36.4</b>	8	<b>32.0</b>
+/-	1	5.9	18	<b>54.5</b>	15	<b>60.0</b>
(+)	0	0.0	3	9.1	2	8.0
УКУПНО	17	100.0	33	100.0	25	100.0

На Табели 13. и Графику 7. се види да је у здравој колоректалној мукози секреција фукомуцина изузетно ретка појава. Са високом сигнификантношћу ово ткиво не секретује неутралне муцине, како у одсуству експресије, тако и код умјерене експресије лептин рецептора. (у 97.9% односно 96.4% случајева).

Табела 13. Расподјела фукомуцина у односу на експресију лептинских рецептора у околном нетуморском ткиву

ФУКОМУЦИНИ- неутрални	Експресија <b>LEPR</b> у нетуморском ткиву			
	<10% позитивних ћелија		10-50% позитивних ћелија	
	n	%	n	%
Нема секреције	46	<b>97.9</b>	27	<b>96.4</b>
+/-	1	2.1	1	3.6
<b>УКУПНО</b>	47	100.0	28	100.0

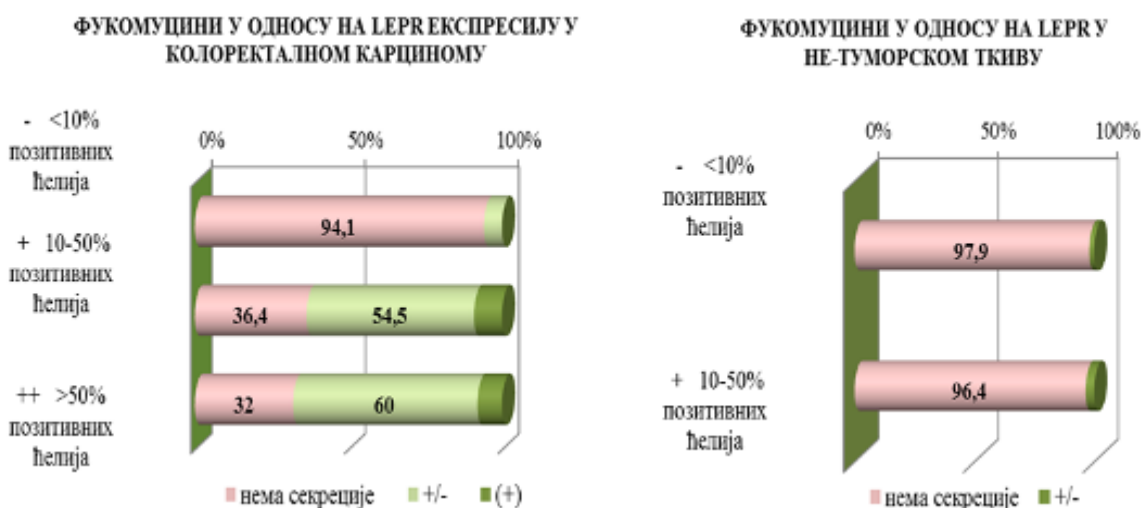


График 7. Расподјела фукомуцина у односу на експресију лептин рецептора у ткиву колоректалног аденокарцинома и нетуморског ткива

Расподјела секреције сијаломуцина код одсуства експресије лептин рецептора показује да се у значајно великом броју случајева (82.4%) ови муцини умјерено секретују. Са повећањем експресије лептин рецептора расте и секреција сијаломуцина, тако да је код умјерене експресије нађена хиперсекреција сијаломуцина у 33% случајева.

Код изражене експресије лептин рецептора, нађена је сигнификантно велика учесталост (84%) хиперсекреције сијаломуцина у случајевима колоректалног карцинома. (Табела 14. График 8).

Табела 14. Расподјела сијаломуцина у односу на експресију лептин рецептора у ткиву колоректалног аденокарцинома

СИЈАЛОМУЦИНИ - слабо кисјели	Експресија LEPR у колоректалном аденокарциному					
	<10% позитивних ћелија		10-50% позитивних ћелија		>50% позитивних ћелија	
	n	%	n	%	n	%
+/-	3	17.6	5	15.2	1	4.0
(+)	14	<b>82.4</b>	17	<b>51.5</b>	3	12.0
(++)	0	0.0	11	<b>33.3</b>	21	<b>84.0</b>
УКУПНО	17	100.0	33	100.0	25	100.0

У одсуству експресије лептин рецептора, у нетуморском ткиву, значајно је највећа учесталост слабо киселих муцина у трагу (68.1% случајева). По учесталости слиједи случајеви без секреције овог муцина, док су јака секреција или хиперсекреција изузетно ријетке.

Код умјерене експресије лептин рецептора, у нетуморском ткиву се појачава секреција слабо киселих муцина, тако да у сигнификантно мањем броју случајева нема секреције (10.7%), и даље је сигнификантан број секреције у трагу (67.9%), а расте учесталост умјерене секреције (21.4%) (Табела 15., График 8.).

Табела 15. Расподјела сијаломуцина у односу на експресију лептин рецептора у здравом колоректалном ткиву

СИЈАЛОМУЦИНИ - слабо кисјели	Експресија LEPR у нетуморском ткиву			
	<10% позитивних ћелија		10-50% позитивних ћелија	
	n	%	N	%
Нема секреције	11	<b>23.4</b>	3	10.7
+/-	32	<b>68.1</b>	19	<b>67.9</b>
(+)	3	6.4	6	<b>21.4</b>
(++)	1	2.1	0	0.0
УКУПНО	47	100.0	28	100.0

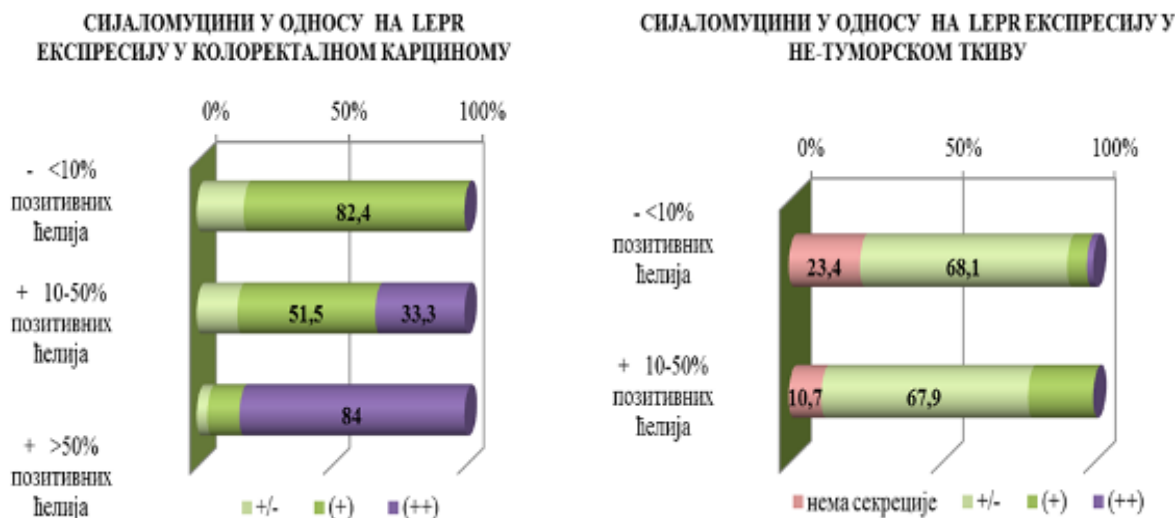


График 8. Расподјела сијаломуцина у односу на експресију лептин рецептора у ткиву колоректалног аденокарцинома и околног нетуморског ткива

Код изражене експресије лептин рецептора у колоректалном карциному у сигнификантном броју случајева нађена је асекреција јако киселих-сулфомуцина (60%,  $\chi^2$ -тест=10.160,  $p=0.006$ ). (Табела 16., График 9.).

У случајевима са умјереном или одсутном експресијом лептин рецептора, јако кисели муцини су присутни у трагу у знатном броју случајева (60.6% односно 70.6%)

Табела 16. Расподјела сулфомуцина у односу на експресију лептин рецептора у ткиву колоректалног аденокарцинома

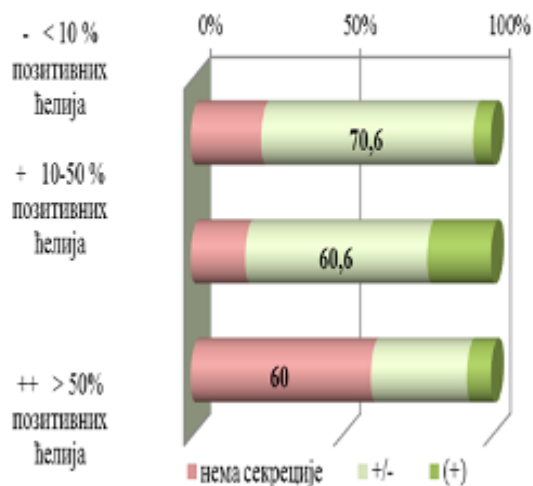
СУЛФОМУЦИН - јако кисјели	Експресија LEPR у колоректалном аденокарциному					
	<10% позитивних ћелија		10-50% позитивних ћелија		>50% позитивних ћелија	
	n	%	n	%	n	%
Нема секреције	4	23.5	6	18.2	15	<b>60.0</b>
+/-	12	<b>70.6</b>	20	<b>60.6</b>	8	32.0
(+)	1	5.9	7	21.2	2	8.0
УКУПНО	17	100.0	33	100.0	25	100.0

У случајевима без и са умјереном експресијом лептин рецептора у нетуморском ткиву, хиперсекреција сулфомуцина је сигнификантна појава са вјероватноћом која је очигледно значајна (72.3% односно 78.6 %). Умјерена секреција је знатно ређе заступљена у овој групи анализираниог ткива (27.7 односно 21.4% случајева). (Табела 17., График 9.).

Табела 17. Расподјела сулфомуцина у односу на експресију лептинских рецептора у нетуморском ткиву

СУЛФОМУЦИНИ – јако кисјели	Експресија LEPR у нетуморском ткиву			
	<10% позитивних ћелија		10-50% позитивних ћелија	
	n	%	N	%
(+)	13	27.7	6	21.4
(++)	34	<b>72.3</b>	22	<b>78.6</b>
УКУПНО	47	100.0	28	100.0

СУЛФОМУЦИНИ У ОДНОСУ НА ЕКСПРЕСИЈУ LEPR У КОЛОРЕКТАЛНОМ КАРЦИНОМУ



СУЛФОМУЦИНИ У ОДНОСУ НА ЕКСПРЕСИЈУ LEPR У НЕ-ТУМОРСКОМ ТКИВУ

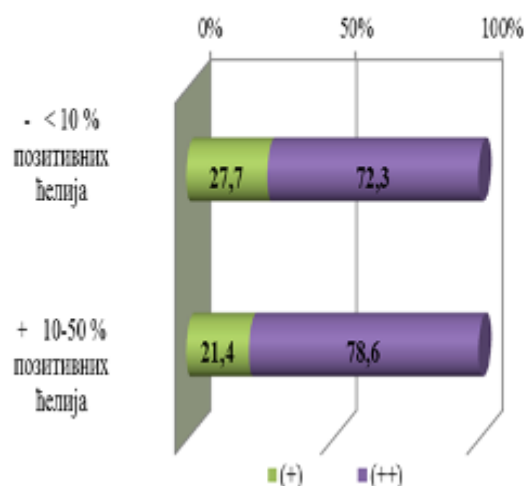


График 9. Расподјела сулфомуцина у односу на експресију лептин рецептора у ткиву колоректалног аденокарцинома и околног нетуморског ткива

Имунохистохемијским испитивањем експресије нуклеарног пролиферативног антигена (Ki67) и одређивањем густине микроциркулације испитивањем експресије ендоглина (CD105), добијене су апсолутне величине распрострањености позитивних ћелија у мм<sup>2</sup>.

Основне карактеристике ових величина (медијан, минималне и максималне вриједности, одступања), приказују box-plot дијаграми, за све анализирание групе, на Графику 10. и Графику 11.



График 10. Карактеристике нуклеарног пролиферативног антигена Ki67–распрострањеност позитивних ћелија у мм<sup>2</sup> по групама испитиваног ткива.

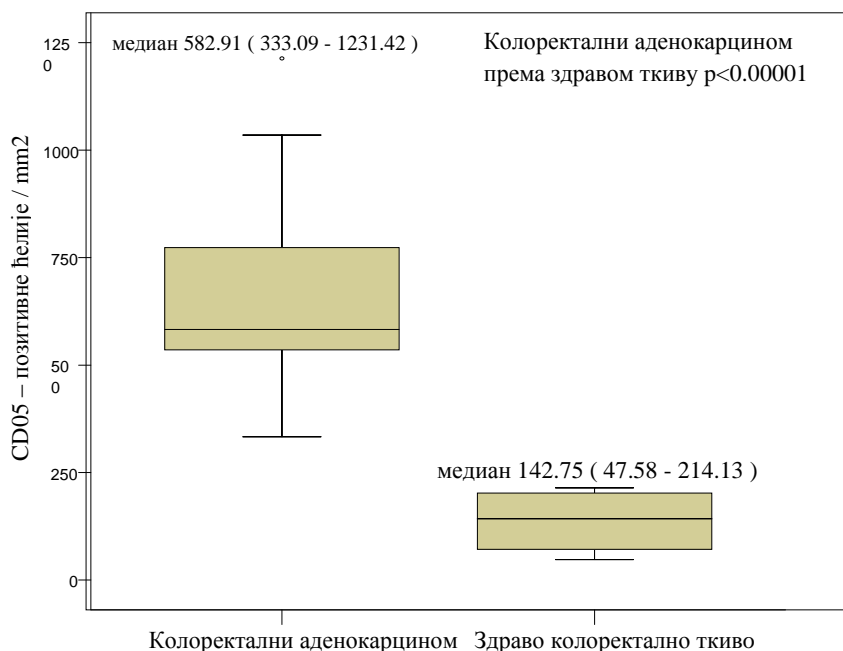


График 11. Карактеристике ендоглина(CD105) –распрострањеност позитивних ћелија у мм<sup>2</sup> по групама испитиваног ткива.

У циљу потврђивања зависности степена пролиферације у односу на експресију лептин рецептора, однос расподеле ових параметара у групи са колоректалним карциномом приказан је на Табели 18. и Графику 12. Индекс пролиферације је добијен из апсолутно одређених вриједности пролиферативног антигена Ki67 у односу на одступање од медијане.

Значајна повезаност степена пролиферације, израженог преко индекса пролиферације и броја имунореактивних ћелија лептин рецептора је очигледна. Низак степен пролиферације корелира са одсуством експресије лептин рецептора у високо сигнификантном броју случајева (94.1%). Високом индексу пролиферације одговара значајних 92% случајева са израженом експресијом лептин рецептора.

Кад умјерене експресије лептин рецептора већа је заступљеност ниског индекса пролиферације (63.6%), а висок индекс пролиферације је присутан у 36.4% случајева. Између ових учесталости нема статистички значајне разлике ( $\chi^2$ -тест=1.328,  $p=0.117$ ).

Табела 18. Расподјела индекса пролиферације према експресији лептинских рецептора

Индекс пролиферације	Експресија LEPR у колоректалном аденокарциному					
	<10% позитивних ћелија		10-50% позитивних ћелија		>50% позитивних ћелија	
	n	%	n	%	n	%
низак	16	<b>94.1</b>	21	63.6	2	8.0
висок	1	5.9	12	36.4	23	<b>92.0</b>
УКУПНО	17	100.0	33	100.0	25	100.0

**ИНДЕКС ПРОЛИФЕРАЦИЈЕ у односу на експресију LEPR у колоректалном аденокарциному**

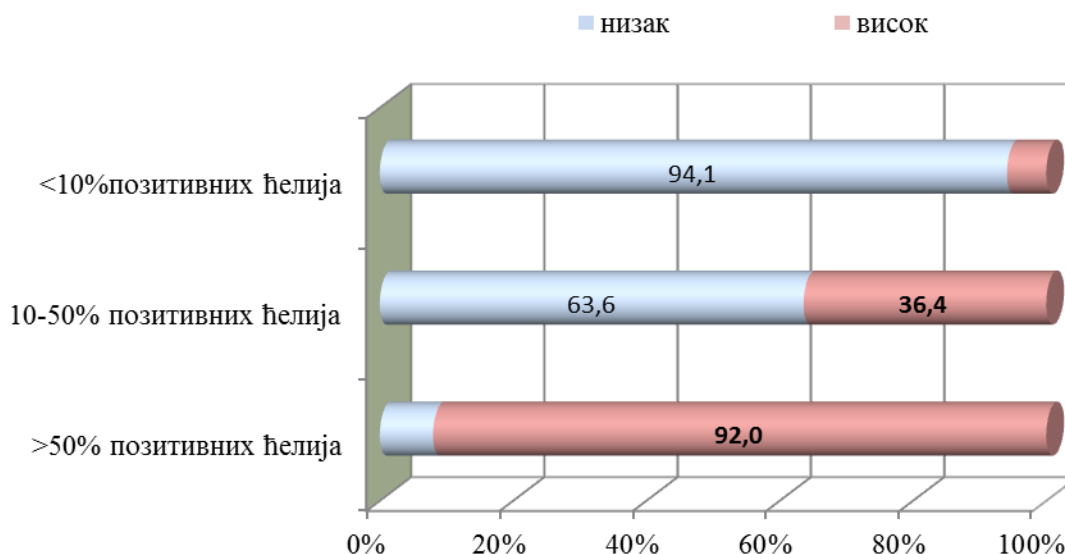


График 12. Расподјела индекса пролиферације према експресији лептинских рецептора

Повезаност густине микроциркулације, изражене преко индекса неоангиогенезе у односу на број имунореактивних ћелија лептин рецептора је такође високо сигнификантна. Низак степен неоангиогенезе корелира са одсуством експресије лептин рецептора у сигнификантном броју случајева од 88.2% , а високом индексу неоангиогенезе одговара значајних 92% случајева са израженом експресијом лептин рецептора. Код умјерене експресије лептин рецептора је чешћа заступљеност ниског индекса неоангиогенезе (66.7%), од високог (33.3% случајева), али између ових учесталости нема статистички значајне разлике ( $\chi^2$ -тест=3.667,  $p=0.056>0.05$ ).



Табела 19. Расподјела индекса неоангиогенезе према експресији лептин рецептора

Индекс неоангиогенезе	Експресија LEPR у колоректалном аденокарциному					
	<10% позитивних ћелија		10-50% позитивних ћелија		>50% позитивних ћелија	
	n	%	n	%	n	%
низак	15	<b>88.2</b>	22	66.7	2	8.0
висок	2	11.8	11	33.3	23	<b>92.0</b>
УКУПНО	17	100.0	33	100.0	25	100.0

**ИНДЕКС НЕОАНГИОГЕНЕЗЕ у односу на експресију LEPR у колоректалном аденокарциному**

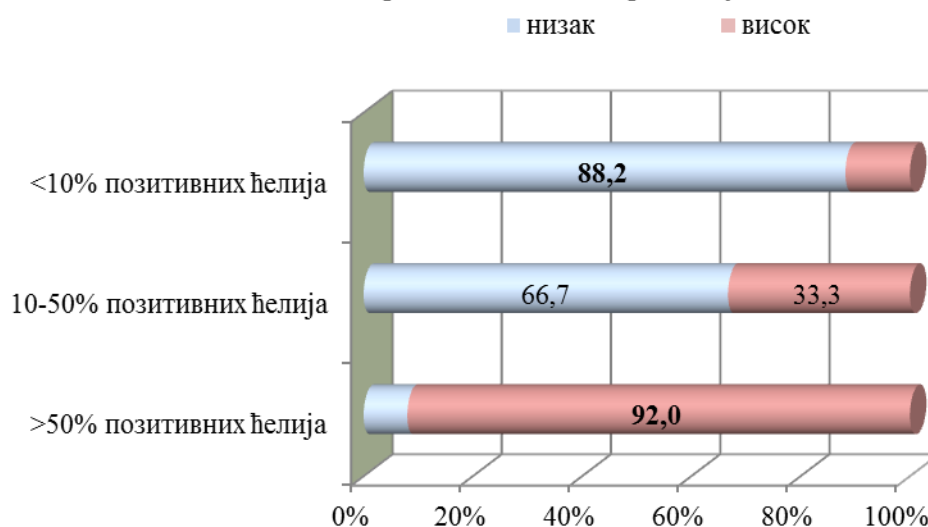


График 13. Расподјела индекса неоангиогенезе према експресији лептин рецептора

### 5.2.1. Расподјела експресије лептин рецептора, индекса пролиферације и неоангиогенезе и муцинске секреције према демографским параметрима

На Табели 20. приказана је расподјела експресије лептин рецептора, индекса пролиферације и неоангиогенезе и параметара муцинске секреције по полу пацијената. Тестирањем значајности разлика у расподјелама упоређиваних параметара између група доказује се да значајне разлике између полова не постоје ни у једном параметру. (Mann-Whitney U-тест).

Табела 20. Расподјела лептин рецептора, индекса пролиферације и неоангиогенезе и параметара муцинске секреције по полу пацијената

Параметри:	ПОЛ				p
	Мушки		Женски		
	n	%	n	%	
Експресија LEPR					
<10% позитивних ћелија	10	22.2	7	23.3	0.341
10-50 % позитивних ћелија	23	51.1	10	33.3	
>50% позитивних ћелија	12	26.7	13	43.3	
Индекс пролиферације	n	%	n	%	0.453
Низак	25	55.6	14	46.7	
Висок	20	44.4	16	53.3	
Индекс неоангиогенезе	n	%	n	%	0.851
Низак	23	51.1	16	53.3	
Висок	22	48.9	14	46.7	
ФУКОМУЦИНИ	n	%	n	%	0.406
Нема секреције	23	51.1	13	43.3	
+/-	20	44.4	14	46.7	
(+)	2	4.4	3	10.0	
СИЈАЛОМУЦИНИ	n	%	n	%	0.231
+/-	5	11.1	4	13.3	
(+)	18	40.0	16	53.3	
(++)	22	48.9	10	33.3	
СУЛФОМУЦИНИ	n	%	n	%	0.434
Нема секреције	13	28.9	12	40.0	
+/-	26	57.8	14	46.7	
(+)	6	13.3	4	13.3	

На Табели 21. приказана је расподјела експресије лептин рецептора, индекса пролиферације и неоангиогенезе и параметара муцинске секреције по годинама старости пацијената (до 60 и преко 60 година). Тестирањем значајности разлика у расподјелама упоређиваних параметара између група доказује се да значајне разлике између упоређиваних старосних група не постоји ни у једном параметру. (Mann-Whitney U-тест).

Табела 21. Расподјела лептин рецептора, индекса пролиферације и неоангиогенезе и параметара муцинске секреције по годинама старости пацијената

Параметри:	ГОДИНЕ СТАРОСТИ				P
	≤60		>60		
Експресија LEPR	n	%	n	%	0.373
<10% позитивних ћелија	6	25.0	11	21.6	
10-50% позитивних ћелија	7	29.2	26	51.0	
>50% позитивних ћелија	11	45.8	14	27.5	
Индекс пролиферације	n	%	n	%	0.813
Низак	12	50.0	27	52.9	
Висок	12	50.0	24	47.1	
Индекс неоангиогенезе	n	%	n	%	0.222
Низак	10	41.7	29	56.9	
Висок	14	58.3	22	43.1	
ФУКОМУЦИНИ	n	%	n	%	0.211
Нема секреције	14	58.3	22	43.1	
+/-	9	37.5	25	49.0	
(+)	1	4.2	4	7.8	
СИЈАЛОМУЦИНИ	n	%	n	%	
+/-	4	16.7	5	9.8	0.417
(+)	11	45.8	23	45.1	
(++)	9	37.5	23	45.1	
СУЛФОМУЦИНИ	n	%	n	%	0.705
Нема секреције	8	33.3	17	33.3	
+/-	14	58.3	26	51.0	
(+)	2	8.3	8	15.7	

Закључује се да експресија лептин рецептора, индекса пролиферације и неоангиогенезе и параметара муцинске секреције не зависе од демографских карактеристика пацијената (пола и старосне доби).

### 5.3. Макроскопски тип и локализација колоректалног аденокарцинома

Међугрупном анализом у односу на пол, доказано је да постоји разлика једино по учесталости улцероинфилтративног типа карцинома. (Mann-Whitney U-тест =492.5, p=0.037) (Табеле 22 и 23).

Значајно већа заступљеност улцероинфилтративног типа тумора код женског пола није од значаја у дефинисаним циљевима студије, нарочито када се узму у обзир претходно констатоване сличности група по полу. Из тог разлога, као и мале учесталости појединих категорија, макроскопски изглед представљен је у три групе, без обзира на пол, које ће бити разматране у наставку анализе. Ову расподелу приказује Табела 17. и График 14.

Табела 22. Макроскопски тип тумора у односу на пол пацијената

Макроскопски изглед тумора	ПОЛ			
	Мушки		Женски	
	n	%	N	%
Улцероинфилтративни	12	26.7	16	<b>53.3</b>
Инфилтративни	19	42.2	8	26.7
Веgetантни	2	4.4	1	3.3
Веgetантно-инфилтративни	11	24.4	5	16.7
Улцеровеgetантни	1	2.2	0	0.0
УКУПНО	45	100.0	30	100.0

Груписањем пацијената према преовлађујућем макроскопском типу карцинома заступљеност броја пацијената се не разликује значајно између група (од 26.7 до 37.3 %) (Табела 23).

Табела 23. Расподјела пацијената по преовлађујућем макроскопском изгледу тумора

Макроскопски изглед тумора	n	%
Улцероинфилтративни	28	37.3
Инфилтративни	27	36.0
Веgetантни (инфилтративни)*	20	26.7
УКУПНО	75	100.0

\*16/20 ( 80%) веgetантно-инфилтративни 4/20 (20%) веgetантни и улцеровеgetантни)

### МАКРОСКОПСКИ ТИП тумора

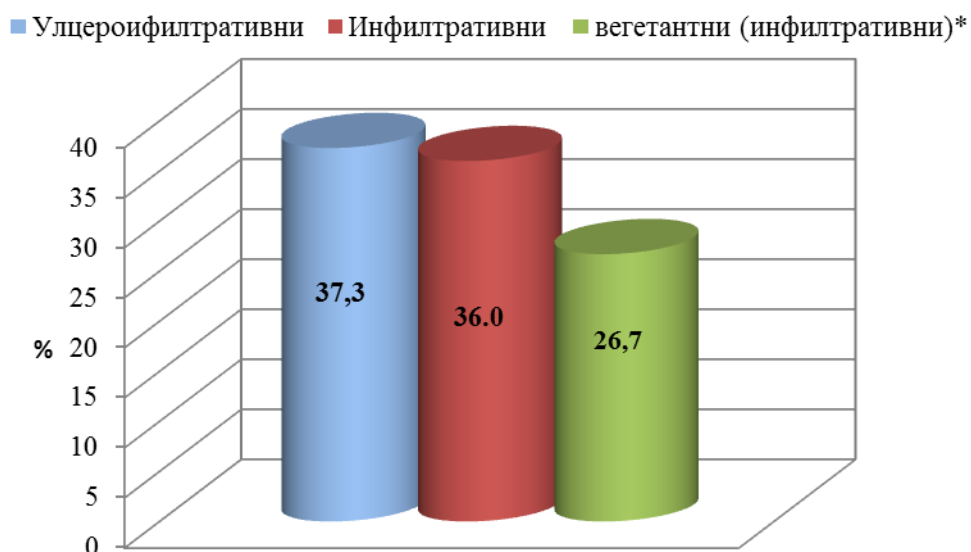


График 14. Макроскопски тип тумора у испитиваном узорку

У испитиваном узорку пацијената најчешћа локализација карцинома била је на ректуму. Учесталост ове локализације са 65.3 % случајева је високо статистички значајна у односу на све остале приказане на табели ( $\chi^2$ -тест=7.053,  $p=0.008$ ). (Табела 24.График 15.).

Табела 24. Расподјела пацијената по локализацији тумора

Локализација	n	%
Ректум	49	<b>65.3</b>
Сигма	9	12.0
Десцедентни колон	2	2.7
Трансверзални колон	1	1.3
Асцедентни колон	11	14.7
Цекум	3	4.0
УКУПНО	75	100.0

### ЛОКАЛИЗАЦИЈА карцинома

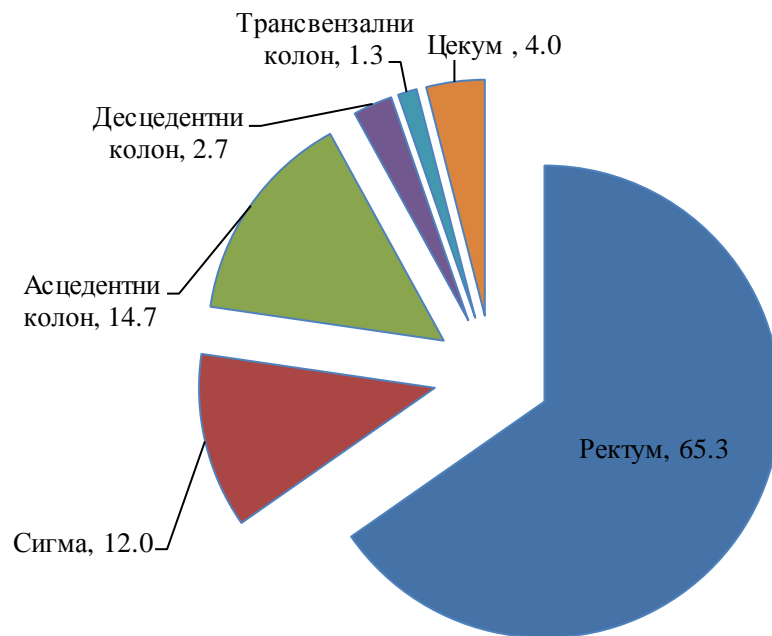


График 15. Локализација колоректалног карцинома у испитиваном узорку

#### **5.3.1. Расподјела експресије лептин рецептора, индекса пролиферације и неоангиогенезе и муцинске секреције према макроскопском типу и локализацији колоректалног карцинома**

Примјена статистичког поступка за тестирање значајности разлика расподјела експресије лептин рецептора, индекса пролиферације, неоангиогенезе и параметара муцинске секреције код различитих макроскопских типова тумора показује да нема значајних разлика, на усвојеном нивоу поузданости. (Kruskal Wallis Test, Табела 25. ).

Табела 25. Расподјела експресије лептин рецептора, индекса пролиферације, неоангиогенезе и муцинске секреције по макроскопском типу карцинома

Параметри:	Макроскопски тип карцинома						p
	Улцероинфилтративни		Инфилтративни		Вегетантни (инфилтративни)*		
	n	%	n	%	n	%	
Експресија LEPR							0.461
<10% позитивних ћелија	5	17.9	7	25.9	5	25.0	
10-50 позитивних ћелија	12	42.9	10	37.0	11	55.0	
>50% позитивних ћелија	11	39.3	10	37.0	4	20.0	
Индекс пролиферације	n	%	n	%	n	%	0.196
Низак	11	39.3	15	55.6	13	65.0	
Нисок	17	60.7	12	44.4	7	35.0	
Индекс неоангиогенезе	n	%	n	%	n	%	0.326
Низак	12	42.9	17	63.0	10	50.0	
Висок	16	57.1	10	37.0	10	50.0	
ФУКОМУЦИНИ	n	%	n	%	n	%	0.214
Нема секреције	12	42.9	16	59.3	8	40.0	
+/-	13	46.4	11	40.7	10	50.0	
(+)	3	10.7	0	0.0	2	10.0	
СИЈАЛОМУЦИНИ	n	%	n	%	n	%	0.485
+/-	3	10.7	2	7.4	4	20.0	
(+)	11	39.3	14	51.9	9	45.0	
(++)	14	50.0	11	40.7	7	35.0	
СУЛФОМУЦИНИ	n	%	n	%	n	%	0.659
Нема секреције	10	35.7	8	29.6	7	35.0	
+/-	16	57.1	14	51.9	10	50.0	
(+)	2	7.1	5	18.5	3	15.0	

Претходно разматрана расподјела локализација у цјелокупном испитиваном узорку показала је сигнификантност преовлађујуће локализације на ректуму. Врло мала учесталост појаве осталих локализација (Табела 26), нарочито десцендентног, транверзалног колона и цекума, ограничила је могућност упоређења расподјела, па су оне приказане информативно.

Експресија лептин рецептора и муцинска секреција у односу на локализацију карцинома на ректуму, сигми и асцедентном колону не показују статистички значајне разлике.( Kruskal Wallis Test, p=0.212 до p=0.833).

Tabela 26. Расподјела експресије лептин рецептора, индекса пролиферације и неоангиогенезе и параметара муцинске секреције у односу на локализацију карцинома

Параметри:	Локализација тумора											
	Ректум		Сигма		Асцедентни колон		Десцедент. колон		Трансвер. колон		Цекум	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	N	%
Експресија LEPR												
<10% позитивних ћелија	14	28.6	2	22.2	1	9.1	0	0.0	0	0.0	0	0.0
10-50% позитивних ћелија	16	32.7	5	55.6	9	81.8	0	0.0	1	100.0	2	66.7
>50% позитивних ћелија	19	38.8	2	22.2	1	9.1	2	100.0	0	0.0	1	33.3
Индекс пролиферације	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	N	%
Низак	26	53.1	6	66.7	5	45.5	0	0.0	1	100.0	1	33.3
Висок	23	46.9	3	33.3	6	54.5	2	100.0	0	0.0	2	66.7
Индекс неоангиогенезе	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	N	%
Низак	24	49.0	6	66.7	8	72.7	0	0.0	0	0	1	33.3
Висок	25	51.0	3	33.3	3	27.3	2	100.0	1	100	2	66.7
ФУКОМУЦИНИ	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	N	%
Нема секреције	27	55.1	2	22.2	6	54.5	1	50.0	0	0.0	0	0.0
+/-	19	38.8	6	66.7	4	36.4	1	50.0	1	100.0	3	100.0
(+)	3	6.1	1	11.1	1	9.1	0	0.0	0	0.0	0	0.0
СИЈАЛОМУЦИНИ	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	N	%
+/-	7	14.3	2	22.2	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
(+)	24	49.0	4	44.4	6	54.5	0	0.0	0	0.0	0	0.0
(++)	18	36.7	3	33.3	5	45.5	2	100.0	1	100.0	3	100.0
СУЛФОМУЦИНИ	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Нема секреције	16	32.7	4	44.4	2	18.2	1	50.0	0	0.0	2	66.7
+/-	25	51.0	5	55.6	7	63.6	1	50.0	1	100.0	1	33.3
(+)	8	16.3	0	0.0	2	18.2	0	0.0	0	0.0	0	0.0



## 5.4. Astler-Coller стадијум тумора и метастазе

Расподјела стадијума испитиваних колоректалних карцинома у односу на *Astler-Coller* класификацију (Табела 27.и График 16.) показује најмању учесталост пацијената у стадијуму C1 (један случај,1.3%) и стадијуму D (7 пацијената, 9.3%). По учесталости слиједи стадијум B1 (11 случајева, 14.7%). Највећа је учесталост пацијената у стадијума B2 (25 пацијената,33.3%) и C2 (31 случај, 41.3%).

Табела 27. Расподјела колоректалног карцинома по Astler-Coller класификацији

Astler Coller стадијум тумора	n	%
<b>B1</b>	11	14.7
<b>B2</b>	25	33.3
<b>C1</b>	1	1.3
<b>C2</b>	31	41.3
<b>D</b>	7	9.3
УКУПНО	75	100.0

Расподјела колоректалног карцинома по Astler-Coller класификацији

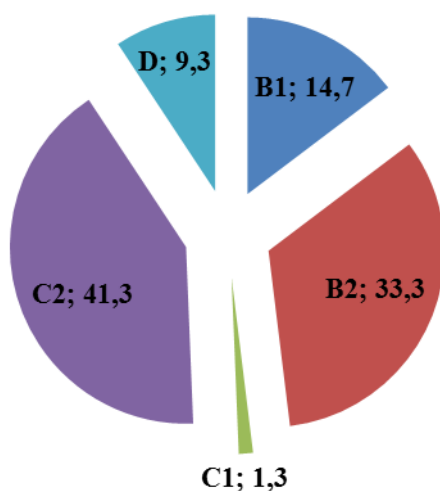


График 16.

Метастазе у лимфним чворовима су нађене код 39 пацијената (52%), док код 36 пацијента(48%) нису нађене метастазе у лимфним чворовима (Табели 28. и График 17.)

Скоро једна трећина, 22 пацијента (29.3%), је имала депозите у 1-3 лимфна чвора, док су депозити у 4-6 лимфних чворова нађени код 8 пацијената (10.7%), а у 7 и више чворова код 9 пацијената (12%).

Табела 28. Метастазе у лимфним чворовима

Метастазе у лимфним чворовима		
	n	%
Нема депозита	36	48.0
Депозити у 1-3 лим.чвора	22	29.3
Депозити у 4-6 лим.чвора	8	10.7
Депозити у 7 и више лим.чвора	9	12.0
УКУПНО	75	100.0

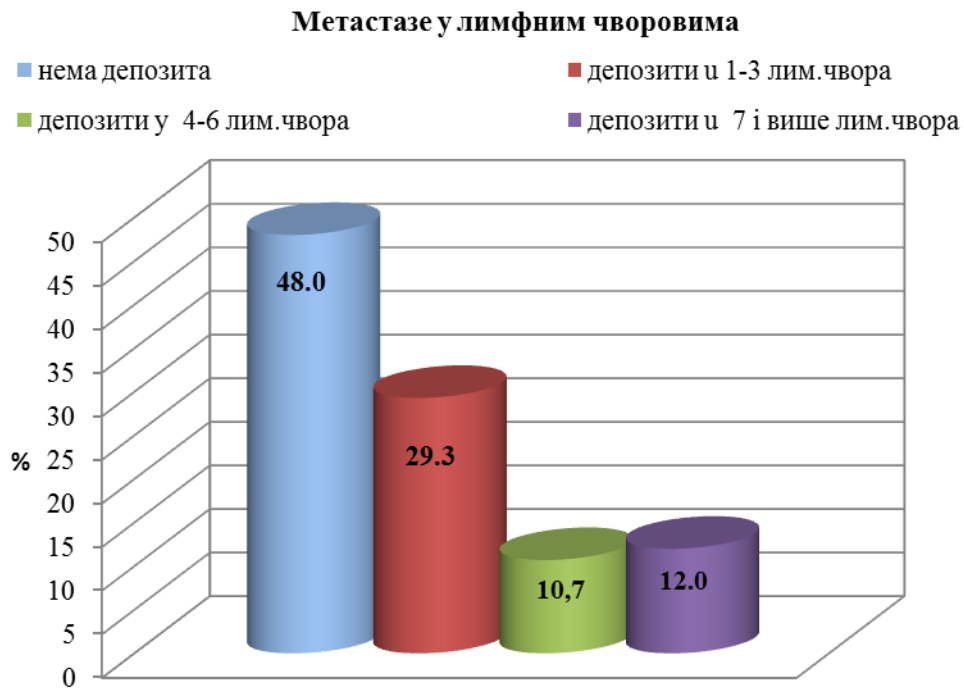


График 17.

Код 67 пацијената (89.3%) нису нађене удаљене метастазе (Табела 28а, График 17а)

Табела 28а. Удаљене метастазе

Удаљене метастазе:		
	N	%
НЕ	67	89.3
ДА	8	10.7
УКУПНО	75	100.0

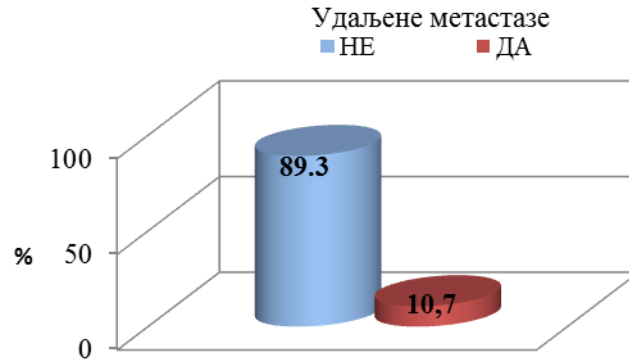


График 17.а

#### 5.4.1. Расподјела експресије лептин рецептора, индекса пролиферације неоангиогенезе и муцинске секреције у односу на Astler Coller стадијум тумора и метастазе

Расподјеле параметара експресије лептин рецептора, индекса пролиферације и неоангиогенезе и муцинске секреције, сликовито дијеле стадијуме по Astler Coller класификацији на два дијела. Као што је у претходној анализи наговјештено, припадност већег броја параметара који се распоређују на сличан начин у стадијумима В1 и В2 наспрот стадијумима С1 до D је очигледна.

Упоређењем било којег од параметара приказаних на Табели 29 примјеном теста за утврђивање сигнификантности разлика у расподјелама између група, утврђује се да се расподјеле унутар група В1 и В2, али и унутар група стадијума С1 до D, статистички не разликују. (Mann –Whitney U –тест за В1-В2,  $p=0.074$  до  $p=0.839$  и С1 до D,  $p=0.053$  до  $p=0.658$  ). Међутим, када се цијела група В1-В2 упореди са групом С1 до D, добија се високо сигнификантна разлика по свим упоређиваним параметрима ( $p<0.0001$ ).

Расподјела случајева без експресије и са умјереном експресијом лептин рецептора у стадијуму В1 и В2 је уједначена (90.9 %, односно 84%). Изражена експресија лептин рецептора у стадијуму В1 и В2 је ријетка појава (9.1%, односно 16%)

У стадијумима С2 и D изражена експресија лептин рецептора нађена је код 51.6% односно 57.1% случајева. Умјерена експресија лептин рецептора нађена је код 35.5% код С2, односно 42.9% код D стадијума, што је значајно више него у стадијумима В1-В2 ( Fisher exact test=7.2, p=0.007 )

Одсуство експресије лептин рецептора у стадијумима С2 и D је ријетка појава (12.9 % односно 0%), за разлику од стадијума В1 и В2 гдје је учесталост одсуства експресије лептин рецептора била 36.4% ( $\chi^2$ -тест=4.765, p=0.029<0.05).

Индекси пролиферације и неоангиогенезе аналогно расподјелама експресије лептин рецептора, корелирају са стадијумима по Astler Coller класификацији. У статистички значајном броју случајева низак индекс неоангиогенезе (72.7% односно 80%) и низак индекс пролиферације (81.8% односно 88%) присутни су у стадијуму В1 односно В2. Код стадијума С2 и D оба индекса су у сигнификантно већем броју случајева високи (пролиферација 77.4% односно 100% и неоангиогенеза 67.7% односно 100%).

Тренд расподјеле неутралних фукомуцина је такав да се у стадијуму В1 и В2 повећава учесталост случајева са појачаном секрецијом али је она и даље слична. Од високе учесталости случајева без секреције овог муцина у стадијуму В1 ( 81.8%) до 64% у стадијуму В2, нема значајне разлике.

Значајно повећање фукомуцина у трагу дешава се у стадијуму С2 (67.7%) и наставља се у стадијуму D са појавом случајева умјерене секреције овог муцина (42.9%). Тренд повећања секреције неутралних муцина прати повећање стадијума по Astler Coller ( $\chi^2$ -тест=5.444, p=0.020).

Секреције сијаломуцина у односу на Astler Coller стадијуме показују највише сличности са експресијом лептинских рецептора. Присуство овог муцина у трагу код стадијума В1 и В2 (36.4 односно 12%), линеарно се повећава по интензитету секреције све до хиперсекреције која преовладава у стадијуму С2 а нарочито у стадијуму D (61.3%-односно 71.4% случајева), док је секреција у трагу у стадијуму С2 и D изузетно ријетка појава (6.5% односно 0%).

Асекреција јако киселих сулфомуцина је ријетка појава у стадијумима В1 и В2 (0% односно 16%), за разлику од стадијума С2 и D, гдје нема секреције овог муцина у 58.1% односно 42.9% случајева. Секреција сулфомуцина у трагу се не разликује значајно у односу на стадијум тумора ( $\chi^2$ -тест=0.900,  $p=0.343$ ). Умјерена секреција јако киселих муцина значајно је учесталија појава у стадијуму В1 (45.5%), док је знатно ријеђа у вишим стадијумима (16% у В2, 0% у С2 и 14.3% у D). ( $\chi^2$ -тест=11.560,  $p=0.001$ ).

Значајан пораст експресије лептин рецептора, пораст пролиферативне активности и неоангиогенезе, као и промјене у продукцији муцина у стадијумима С и D у односу на стадијуме В1 и В2, упућује на закључак да је метастатско ширење болести значајан фактор ових сигнификантних промјена.

Табела 29. Расподјела експресије лептин рецептора, индекса пролиферације, неоангиогенезе и муцинске секреције према Astler-Coller класификацији тумора

Параметри:	Astler-Coller стадијум тумора									
	В1		В2		С1		С2		D	
Експресија LEPR	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
<10% позитивних ћелија	4	<b>36.4</b>	9	<b>36.0</b>	0	0.0	4	12.9	0	0.0
10-50% позитивних ћел.	6	<b>54.5</b>	12	<b>48.0</b>	1	100.0	11	<b>35.5</b>	3	<b>42.9</b>
>50% позитивних ћелија	1	9.1	4	16.0	0	0.0	16	<b>51.6</b>	4	<b>57.1</b>
Индекс пролиферације	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Низак	9	<b>81.8</b>	22	<b>88.0</b>	1	100.0	7	22.6	0	0.0
Висок	2	18.2	3	12.0	0	0.0	24	<b>77.4</b>	7	<b>100.0</b>
Индекс неоангиогенезе	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Низак	8	<b>72.7</b>	20	<b>80.0</b>	1	100.0	10	32.3	0	0.0
Висок	3	27.3	5	20.0	0	0.0	21	<b>67.7</b>	7	<b>100.0</b>
ФУКОМУЦИНИ	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Нема секреције	9	<b>81.8</b>	16	<b>64.0</b>	0	0.0	10	32.3	1	14.3
+/-	1	9.1	8	32.0	1	100.0	21	<b>67.7</b>	3	<b>42.9</b>
(+)	1	9.1	1	4.0	0	0.0	0	0.0	3	<b>42.9</b>
СИЈАЛОМУЦИНИ	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
+/-	4	<b>36.4</b>	3	<b>12.0</b>	0	0.0	2	6.5	0	0.0
(+)	6	<b>54.5</b>	16	<b>64.0</b>	0	0.0	10	<b>32.3</b>	2	<b>28.6</b>
(++)	1	9.1	6	24.0	1	100.0	19	<b>61.3</b>	5	<b>71.4</b>
СУЛФОМУЦИНИ	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Нема секреције	0	0.0	4	16.0	0	0.0	18	<b>58.1</b>	3	<b>42.9</b>
+/-	6	<b>54.5</b>	17	<b>68.0</b>	1	100.0	13	<b>41.9</b>	3	<b>42.9</b>
(+)	5	<b>45.5</b>	4	<b>16.0</b>	0	0.0	0	0.0	1	14.3

Расподјела свих параметара који су од интереса ове студије (LEPR експресија, индекси пролиферације и неоангиогенезе и муцинска секреција) разврстани су у односу на појаву метастаза у лимфним чворовима као и број захваћених лимфних чворова (Табела 30).

Примјена поменутог поступка за упоређење расподјела између група, показује да се групе разврстане по метастазама у лимфним чворовима сигнификантно разликују једино у односу на случајеве без метастаза. Група случајева без депозита сигнификантно је различита по расподјели свих параметара и то у односу на сваку појединачну групу са депозитом у лимфним чворовима. (Kruskal Wallis Test,  $p < 0.001$  до  $p < 0.007$ ).

Међутим, групе са депозитима у различитом броју лимфних чворова не разликују се значајно међусобно, по расподјелама одређених категорија параметара. (Kruskal Wallis Test,  $p = 0.119$  до  $p = 0.755$ ).

Када се расподјела категорија параметара разматра унутар група без метастаза, примјетно је да одсуство метастатског потенцијала приближава расподјеле параметара по карактеристикама нормалном колоректалном ткиву. Одсутна или умјерена експресија лептин рецептора је идентификована у највећем броју случајева (86.1%) без метастатских депозита. Високо сигнификантно је присуство ниског индекса пролиферације (86.1%) и неоангиогенезе (77.8%), а расподјела муцина не одступа много од нормалног ткива.

Појава метастаза у лимфним чворовима сигнификантно мијења расподјеле параметара, тако да се са повећањем броја захваћених лимфних чворова повећава и заступљеност изражене експресије лептин рецептора (45.5 %, 50 % и 66.7%).

Овај тренд праћен је и повећањем индекса пролиферације и неоангиогенезе, затим и интензитетом секреције фукомуцина и сијаломуцина, док је тренд сулфомуцина у паду.

Као што је напоменуто, овај тренд промјене параметара није значајан између група.

На основу закључака о расподјели истих параметара по Astler-Coller стадијуму тумора и расподјели по метастазама у лимфним чворовима, може се закључити да појава метастаза условљава сигнификантну промјену, како у експресији лептин рецептора, тако и осталих анализираних параметара, који више или мање изражено прате тренд прогресије болести.

Табела 30. Расподјела лептин рецептора, индекса пролиферације и неоангиогенезе и муцинске секреције према метастазама у лимфним чворовима

Параметри:	МЕТАСТАЗЕ у лимфним чворовима							
	Нема депозита		Депозити у 1-3 лим. чвора		Депозити у 4-6 лим. чвора		Депозити у више од 7 лим. чвора	
Експресија LEPR	n	%	n	%	n	%	n	%
<10% позитивних ћелија	13	<b>36.1</b>	3	13.6	0	0.0	1	11.1
10-50% позитивних ћелија	18	<b>50.0</b>	9	<b>40.9</b>	4	<b>50.0</b>	2	<b>22.2</b>
>50% позитивних ћелија	5	13.9	10	<b>45.5</b>	4	<b>50.0</b>	6	<b>66.7</b>
Индекс пролиферације	n	%	n	%	n	%	n	%
Низак	31	<b>86.1</b>	7	31.8	1	12.5	0	0.0
Висок	5	13.9	15	<b>68.2</b>	7	<b>87.5</b>	9	<b>100.0</b>
Индекс неоангиогенезе	n	%	n	%	n	%	n	%
Низак	28	<b>77.8</b>	5	22.7	3	37.5	3	33.3
Висок	8	22.2	17	<b>77.3</b>	5	<b>62.5</b>	6	<b>66.7</b>
ФУКОМУЦИНИ	n	%	n	%	n	%	n	%
Нема секреције	25	<b>69.4</b>	8	36.4	1	12.5	2	22.2
+/-	9	25.0	12	<b>54.5</b>	6	<b>75.0</b>	7	<b>77.8</b>
(+)	2	5.6	2	9.1	1	12.5	0	0.0
СИЈАЛОМУЦИНИ	n	%	n	%	n	%	n	%
+/-	7	19.4	2	9.1	0	0.0	0	0.0
(+)	22	<b>61.1</b>	5	22.7	4	50.0	3	33.3
(++)	7	19.4	15	<b>68.2</b>	4	<b>50.0</b>	6	<b>66.7</b>
СУЛФОМУЦИНИ	n	%	n	%	n	%	n	%
Нема секреције	4	11.1	11	50.0	3	37.5	7	<b>77.8</b>
+/-	23	<b>63.9</b>	11	50.0	4	50.0	2	22.2
(+)	9	25.0	0	0.0	1	12.5	0	0.0

Удаљене метастазе су верификоване у 8 случајева (10.7%) (Табела 28а, График 17а)

Код случајева са удаљеним метастазама експресија лептин рецептора се сигнификантно повећава, а индекси пролиферације и неоангиогенезе су високи у свим случајевима (Табела 31).

Табела 31. Расподјела лептинских рецептора и индекса пролиферације и неоангиогенезе према удаљеним метастазама

Параметри:	УДАЉЕНЕ МЕТАСТАЗЕ			
	НЕ		ДА	
Експресија LEPR	n	%	n	%
<10% позитивних ћелија	17	<b>25.4</b>	0	0.0
10-50% позитивних ћелија	30	<b>44.8</b>	3	<b>37.5</b>
>50% позитивних ћелија	20	29.9	5	<b>62.5</b>
Индекс пролиферације	n	%	n	%
Низак	39	58.2	0	0.0
Висок	28	41.8	8	<b>100.0</b>
Индекс неоангиогенезе	n	%	n	%
Низак	39	58.2	0	0.0
Висок	28	41.8	8	<b>100.0</b>

## 5.5. Хистопатолошке карактеристике колоректалног аденокарцинома

Већина испитиваних колоректалних карцинома (86.7%) била је хистолошки градус 2. Веома мали број случајева нижег и вишег градуса, представља ограничавајући услов у упоредним анализама, али представља учесталост која је типична за појаву овог типа карцинома и зато је информативна.

Табела 32. Расподјела према хистолошком градусу тумора

Хистолошки градус тумора	n	%
Добро диферентован – градус 1	4	5.3
Умјерено диферентован- градус 2	65	<b>86.7</b>
Лоше диферентован – градус 3	6	8.0
УКУПНО	75	100.0



### Расподјела по хистолошком градусу тумора

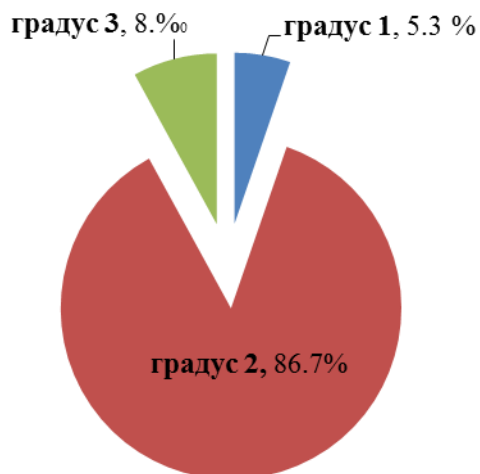


График 18.

Највећи број испитиваних случајева (74.7%) колоректалних аденокарцинома су дијагностиковани у трећем стадијуму по TNM класификацији, што се значајно разликује у односу на број случајева (16%) дијагностикованих као стадијум 2.

Може се закључити да је ријетка појава дијагнозе колоректалног аденокарцинома у најнижем и највишем pT стадијуму (2.7% и 6.7% случајева).

Табела 33. Расподјела према патолошком стадијуму тумора (pT)

Патолошки стадијум тумора	n	%
Стадијум 1	2	2.7
Стадијум 2	12	16.0
Стадијум 3	56	<b>74.7</b>
Стадијум 4	5	6.7
УКУПНО	75	100.0

### Расподјела по патолошком стадијуму тумора

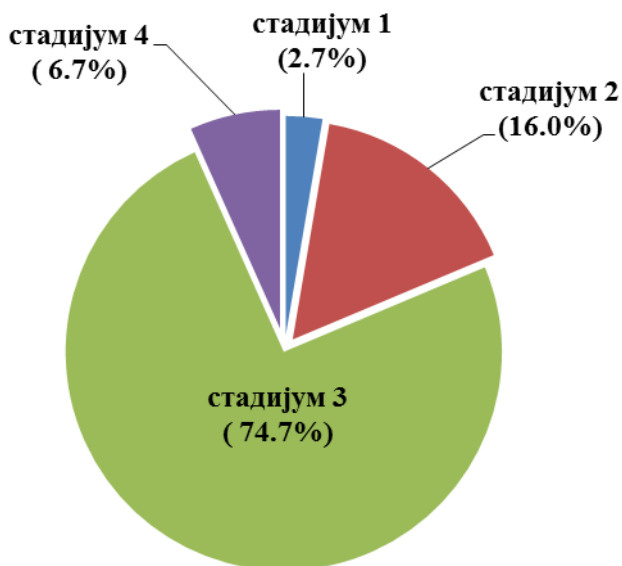


График 19.

Сигнификантна је појава одсуства инвазије крвних судова и нерава код испитиваних колоректалних карцинома ( 84% односно 81.3% случајева) (Табела 34).

Инвазија лимфних судова постоји у више од половине оперисаних пацијената код овог карцинома (54.7%). Овај број није значајно већи од оних код којих није утврђена инвазија лимфних судова. ( $\chi^2$ -тест=0.653, p=0.419).

Табела 34. Инвазија лимфних судова, крвних судова и нерава у колоректалном аденокарциному

Инвазија	Лимфних судова		Крвних судова		Нерава	
	n	%	n	%	n	%
Није идентификована	34	45.3	63	<b>84.0</b>	61	<b>81.3</b>
Присутна	41	54.7	12	16.0	14	18.7
УКУПНО	75	100.0	75	100.0	75	100.0

**Инвазија лимфних судова, крвних судова и нерава у колоректалном аденокарциному**

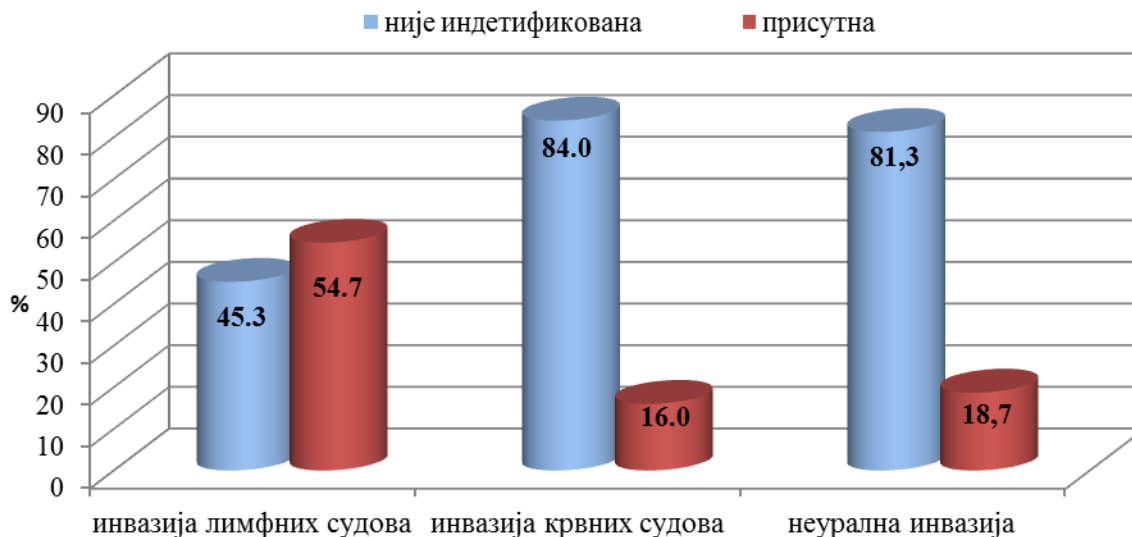


График 20.

Расподјела осталих разматраних хистопатолошких карактеристика показује да су случајеви без или са слабо израженом дезмоплазијом заступљени са сличном учесталошћу (46.7% односно 42.7%), док је умјерено изражена дезмоплазија знатно рјеђа појава (10.7%).

У значајном броју случајева (74.7 %) идентификована је слабо изражена некроза у туморском ткиву.

Запаљенски инфилтрат био је слабо или умјерено изражен са сличном учесталошћу (36% односно 41.3%), а код једне петине пацијената (21.3%), био је присутан наглашен запаљенски инфилтрат.

Табела 35. Расподјела осталих хистопатолошких карактеристика тумора

Остале хистопатолошке карактеристике	Дезмоплазија		Некроза		Запаљенски инфилтрат	
	n	%	n	%	n	%
Није идентификована	35	<b>46.7</b>	11	14.7	1	1.3
Слаба	32	<b>42.7</b>	56	<b>74.7</b>	27	<b>36.0</b>
Умјерено изражена	8	10.7	5	6.7	31	<b>41.3</b>
Наглашена	-	-	3	4.0	16	21.3
УКУПНО	75	100.0	75	100.0	75	100.0

### **5.5.1. Расподјела лептин рецептора, индекса пролиферације и неоангиогенезе и муцинске секреције према хистопатолошким параметрима тумора**

У испитиваном узорку преовладавају умјерено диферентовани (хистопатолошки градус 2) карциноми што представља ограничавајућу околност за анализу и упоређење са осталим.

Изражена експресија лептин рецептора је научесталија (66.7%) унутар групе лоше диферентованих карцинома.

Индекс пролиферације обрнуто корелира са степеном диферентованости, тако да највећи проценат високог индекса пролиферације (83.3% случајева) налазимо у групи слабо диферентованих карцинома

Индекс неоангиогенезе је уједначен у свим испитиваним групама

Фукомуцина нема или их има у трагу, са сличном вјероватноћом. Умјерена и изражена секреција сијаломуцина представљају значајну појаву (преко 80%) у свим степенима диференцијације, док се степен секреције сулфомуцина смањује са порастом хистолошког градуса односно са смањењем степена диференцијације.

Расподјела случајева у групи лоше диферентованих карцинома показује сигнификантан тренд пораста експресије лептин рецептора, индекса пролиферације и неоангиогенезе, пораст секреције фукомуцина и сијаломуцина и пораст учесталости асекретије сулфомуцина. Међутим због врло малог броја података у овој групи, резултати нису предмет посебне анализе.

Табела 36. Расподјела лептинских рецептора, индекса пролиферације и неоангиогенезе и муцинске секреције према хистолошком градусу тумора

Параметри:	ХИСТОЛОШКИ градус тумора					
	Градус 1		Градус 2		Градус 3	
	n	%	n	%	n	%
Експресија LEPR						
<10% позитивних ћелија	1	25.0	15	23.1	1	16.7
10-50% позитивних ћелија	2	50.0	30	46.2	1	16.7
>50% позитивних ћелија	1	25.0	20	30.8	4	<b>66.7</b>
Индекс пролиферације	n	%	n	%	n	%
Низак	4	100.0	34	52.3	1	16.7
Висок	0	0.0	31	47.7	5	<b>83.3</b>
Индекс неоангиогенезе	n	%	n	%	n	%
Низак	2	50.0	34	52.3	3	50.0
Висок	2	50.0	31	47.7	3	50.0
ФУКОМУЦИНИ	n	%	n	%	n	%
Нема секреције	1	25.0	35	53.8	0	0.0
+/-	2	50.0	26	40.0	6	<b>100.0</b>
(+)	1	25.0	4	6.2	0	0.0
СИЈАЛОМУЦИНИ	n	%	n	%	n	%
+/-	0	0.0	8	12.3	1	16.7
(+)	1	25.0	32	<b>49.2</b>	1	16.7
(++)	3	75.0	25	<b>38.5</b>	4	<b>66.7</b>
СУЛФОМУЦИНИ	n	%	n	%	n	%
Нема секреције	1	25.0	19	29.2	5	<b>83.3</b>
+/-	3	75.0	36	55.4	1	16.7
(+)	0	0.0	10	15.4	0	0.0

У преовлађујућем трећем патолошком стадијуму (pT3) по TNM класификацији, расподјеле параметара показују извјесне сличности са претходно анализираним расподјелама у групи умјерено диферентованих карцинома. У овој групи је најчешћа умјерена експресија лептин рецептора (44.6%), а слиједи изражена експресија (37.5%)

Низак индекс пролиферације и неоангиогенезе су најчешћи у другом стадијуму (75% односно 65.7%), док је дистрибуција ниског и високог индекса пролиферације и неоангиогенезе у трећем стадијуму приближно једнака. У расподјели ових параметара нема статистички значајне разлике између другог и трећег стадијума, иако је повећање присутно. (Kruskal Wallis Test,  $p=0.074$  до  $p=0.249$ ).

Расподјела свих анализираних муцина показује промјену у нивоу секреције од другог до трећег патолошког стадијума; секреција фукомуцина и сијаломуцина се сигнификантно повећава ( $p=0.008$  и  $p=0.001$ ) а сулфомуцина се сигнификантно смањује ( $p=0.003$ ).

Описани тренд расподјеле параметара запажа се у највишем патолошком стадијуму карцинома, али због заступљеног малог броја података (5 случаја), није предмет статистичког упоређења.

Табела 37. Расподјела LEPR, индекса пролиферације и неоангиогенезе и муцинске секреције према патолошком стадијуму тумора

Параметри:	Патолошки стадијум тумора							
	Стадијум I		Стадијум II		Стадијум III		Стадијум IV	
Експресија LEPR	n	%	n	%	n	%	n	%
<10% позитивних ћелија	1	50.0	4	33.3	10	17.9	2	40.0
10-50% позитивних ћелија	1	50.0	6	<b>50.0</b>	25	<b>44.6</b>	1	20.0
>50% позитивних ћелија	0	0.0	2	<b>16.7</b>	21	<b>37.5</b>	2	40.0
Индекс пролиферације	n	%	n	%	n	%	n	%
Низак	2	100.0	9	<b>75.0</b>	26	46.4	2	40.0
Висок	0	0.0	3	25.0	30	53.6	3	60.0
Индекс неоангиогенезе	n	%	n	%	n	%	n	%
Низак	2	100.0	8	<b>66.7</b>	27	48.2	2	40.0
Висок	0	0.0	4	33.3	29	51.8	3	60.0
ФУКОМУЦИНИ	n	%	n	%	n	%	n	%
Нема секреције	1	50.0	10	<b>83.3</b>	23	41.1	2	40.0
+/-	0	0.0	2	16.7	29	51.8	3	60.0
(+)	1	50.0	0	0.0	4	7.1	0	0.0
СИЈАЛОМУЦИНИ	n	%	n	%	n	%	n	%
+/-	0	0.0	4	33.3	5	8.9	0	0.0
(+)	1	50.0	8	<b>66.7</b>	23	41.1	2	40.0
(++)	1	50.0	0	0.0	28	50.0	3	60.0
СУЛФОМУЦИНИ	n	%	n	%	n	%	n	%
Нема секреције	0	0.0	0	0.0	21	37.5	4	80.0
+/-	1	50.0	8	<b>66.7</b>	30	53.6	1	20.0
(+)	1	50.0	4	33.3	5	8.9	0	0.0

Високо сигнификантна разлика између група са појавом инвазије лимфних судова или без инвазије, доказује се статистичким тестирањем за све параметре. (Mann –Whitney U-тест,  $p<0.0001$ ) (Табела 38).

Када код колоректалног аденокарцинома не постоји инвазија лимфних судова, тада су случајеви без експресије и са умјереном експресијом лептин рецептора заступљени са једнаком учесталашћу (41.2% односно 44.1%); индекси пролиферације и неоангиогенезе су

у сигнификантном броју случајева (82.4% односно 79.4%) ниски, нема секреције фукомуцина (70.6%), сијаломуцини су најчешће умјерене секреције (64.7%) а сулфомуцини су у трагу (70.6) или се умјерено секретују (20.6%).

У случајевима са инвазијом лимфних судова, умјерена и изражена експресија лептин рецептора су уједначено заступљене (43.9 односно 48.8%), док је вјероватноћа појаве без експресије лептин рецептора мала (7.3%). Тада су индекси пролиферације и неоангиогенезе у сигнификантном броју случајева високи (73.2 односно 70.7%), фукомуцини су најчешће у трагу (61 %), сијаломуцини су најчешће у хиперсекрецији (63.4%), а сулфомуцина нема или су присутни у трагу (53.7 односно 39%).

Табела 38. Расподјела експресије LEPR, индекса пролиферације и неоангиогенезе и муцинске секреције према присуству инвазије лимфних судова

Параметри:	Инвазија лимфних судова			
	НЕ		ДА	
Експресија LEPR	n	%	n	%
<10% позитивних ћелија	14	41.2	3	7.3
10-50% позитивних ћелија	15	44.1	18	43.9
>50% позитивних ћелија	5	14.7	20	48.8
Индекс пролиферације	n	%	n	%
Низак	28	82.4	11	26.8
Висок	6	17.6	30	73.2
Индекс неоангиогенезе	n	%	n	%
Низак	27	79.4	12	29.3
Висок	7	20.6	29	70.7
ФУКОМУЦИНИ	n	%	n	%
Нема секреције	24	70.6	12	29.3
+/-	9	26.5	25	61.0
(+)	1	2.9	4	9.8
СИЈАЛОМУЦИНИ	n	%	n	%
+/-	6	17.6	3	7.3
(+)	22	64.7	12	29.3
(++)	6	17.6	26	63.4
СУЛФОМУЦИНИ	n	%	n	%
Нема секреције	3	8.8	22	53.7
+/-	24	70.6	16	39.0
(+)	7	20.6	3	7.3

Уочена је статистички значајна разлика у експресији лептин рецептора између случајева без и са инвазијом крвних судова. Умјерена и изражена експресија лептин рецептора је присутна у свим случајевима са инвазијом крвних судова (Mann –Whitney U-тест,  $p=0.049<0.05$ ).

Индекси пролиферације и неоангиогенезе су у сигнификантно великом броју случајева високи (по 91.7 % случајева), а фукомуцини и сијаломуцини се појачано секретују уколико постоји инвазија крвних судова у односу на њено одсуство. (Mann –Whitney U-тест,  $p=0.01$  до 0.025).

Једино се расподјеле јако киселих - сулфомуцина не разликују значајно у односу на присуство инвазије крвних судова. (Mann –Whitney U-тест ,  $p=0.545>0.05$ )

Табела 39. Расподјела експресије LEPR, индекса пролиферације и неоангиогенезе и муцинске секреције према присуству инвазије крвних судова

Параметри:	Инвазија крвних судова			
	НЕ		ДА	
Експресија LEPR	n	%	n	%
<10% позитивних ћелија	17	27.0	0	<b>0.0</b>
10-50% позитивних ћелија	27	42.9	6	50.0
>50% позитивних ћелија	19	30.2	6	50.0
Индекс пролиферације	n	%	n	%
Низак	38	60.3	1	8.3
Висок	25	39.7	11	<b>91.7</b>
Индекс неоангиогенезе	n	%	n	%
Низак	38	60.3	1	8.3
Висок	25	39.7	11	<b>91.7</b>
ФУКОМУЦИНИ	n	%	n	%
Нема секреције	33	<b>52.4</b>	3	25.0
+/-	28	<b>44.4</b>	6	<b>50.0</b>
(+)	2	3.2	3	<b>25.0</b>
СИЈАЛОМУЦИНИ	n	%	n	%
+/-	9	14.3	0	0.0
(+)	30	47.6	4	33.3
(++)	24	38.1	8	<b>66.7</b>
СУЛФОМУЦИНИ	n	%	n	%
Нема секреције	20	31.7	5	41.7
+/-	35	55.6	5	41.7
(+)	8	12.7	2	16.7

Слично заступљености инвазије крвних судова, перинеурална инвазија се код колоректалног аденокарцинома јавља у сигнификантно мањем броју случајева. Расподјела експресије лептин рецептора, индекса пролиферације и неоангиогенезе и муцинске секреције према перинеуралној инвазији приказана је на Табели 40.



Упоређењем расподјела по параметрима у односу на присуство или одсуство перинеуралне инвазије доказано је да се експресија лептин рецептора значајно повећава у присуству инвазије нерава (64.3%, Mann –Whitney U-тест , p=0.003).

Маркери пролиферације и неоангиогенезе су у значајно већем броју случајева високи (92.9% односно 78.6%), при постојању инвазије нерава у колоректалном аденокарциному. (Mann –Whitney U-тест, p<0.0001 и p=0.012).

Упоређење расподјела муцина по јачини секреције показује да се оне не разликују значајно у односу на присуство инвазије нерава у колоректалном аденокарциному, на усвојеном нивоу значајности p<0.05 (Mann –Whitney U-тест, p =0.087 до p=0.545).

Табела 40. Расподјела експресије LEPR, индекса пролиферације и неоангиогенезе и муцинске секреције према перинеуралној инвазији

Параметри:	Неурална инвазија			
	НЕ		ДА	
Експресија LEPR	n	%	n	%
<10% позитивних ћелија	17	27.9	0	0.0
10-50% позитивних ћелија	28	45.9	5	35.7
>50% позитивних ћелија	16	26.2	9	<b>64.3</b>
Индекс пролиферације	61	100.0	14	100.0
Низак	38	62.3	1	7.1
Висок	23	37.7	13	<b>92.9</b>
Индекс неоангиогенезе	n	%	n	%
Низак	36	59.0	3	21.4
Висок	25	41.0	11	<b>78.6</b>
ФУКОМУЦИНИ	n	%	n	%
Нема секреције	31	50.8	5	35.7
+/-	28	45.9	6	42.9
(+)	2	3.3	3	21.4
СИЈАЛОМУЦИНИ	n	%	n	%
+/-	8	13.1	1	7.1
(+)	30	49.2	4	28.6
(++)	23	37.7	9	64.3
СУЛФОМУЦИНИ	n	%	N	%
Нема секреције	19	31.1	6	42.9
+/-	34	55.7	6	42.9
(+)	8	13.1	2	14.3

Дезмоплазија је појава која није изражена или је слаба у ткиву колоректалног аденокарцинома. Зависност осталих параметара - лептин рецептора, индекса пролиферације

и неоангиогенезе и муцинске секреције према присуству дезмоплазије и њеном интензитету, приказана је на Табели 41.

Упоређењем расподеле параметара према појави дезмоплазије или њеном интензитету (углавном слабом), закључује се да зависност ових параметара према њеној појави и интензитету није велика. Наиме, сличност расподела свих параметара у случајевима без дезмоплазије или њеном присуству слабог интензитета је примјетна а статистички се доказује да нема значајне разлике. (Mann –Whitney U-тест,  $p=0.121$  до  $p=0.570$ ).

Умјерени степен дезмоплазије, нађен у знатно мањем броју случајева, показује тренд пада експресије лептин рецептора, индекса пролиферације и неоангиогенезе и пад интензитета секреције муцина, сем сулфомуцина чији се интензитет појачава. Статистички значајан је једино пад секреције неутралних муцина, односно њихово одсуство ( 87.5%), при умјерено израженој дезмоплазији. (Mann –Whitney U-тест,  $p=0.039$ ).

Табела 41. Расподела лептин рецептора, индекса пролиферације и неоангиогенезе и муцинске секреције према присуству дезмоплазије и њеном интензитету

Параметри:	Дезмоплазија					
	Није идентификована		Слаба		Умјерено изражена	
	n	%	n	%	n	%
Експресија LEPR						
<10% позитивних ћелија	4	11.4	9	28.1	4	50.0
10-50% позитивних ћелија	17	48.6	14	43.8	2	25.0
>50% позитивних ћелија	14	40.0	9	28.1	2	25.0
Индекс пролиферације	n	%	n	%	n	%
Низак	16	45.7	18	56.3	5	62.5
Висок	19	54.3	14	43.8	3	37.5
Индекс неоангиогенезе	n	%	n	%	n	%
Низак	15	42.9	18	56.3	6	75.0
Висок	20	57.1	14	43.8	2	25.0
ФУКОМУЦИНИ	n	%	n	%	n	%
Нема секреције	13	37.1	16	50.0	7	<b>87.5</b>
+/-	19	54.3	14	43.8	1	12.5
(+)	3	8.6	2	6.3	0	0.0
СИЈАЛОМУЦИНИ	n	%	n	%	n	%
+/-	4	11.4	5	15.6	0	0.0
(+)	13	37.1	16	50.0	5	62.5
(++)	18	51.4	11	34.4	3	37.5
СУЛФОМУЦИНИ	n	%	n	%	N	%
Нема секреције	13	37.1	11	34.4	1	12.5
+/-	19	54.3	15	46.9	6	75.0
(+)	3	8.6	6	18.8	1	12.5

Као што је претходно утврђено, некроза је у ткиву колоректалног аденокарцинома заступљена у већини случајева као слаба, а Табела 42 показује расподјелу лептин рецептора, индекса пролиферације и неоангиогенезе, и муцинске секреције према присуству некрозе и њеном интензитету. Мали број случајева умјерене и изражене некрозе је ограничавајући фактор у потпуном сагледавању зависности распоређивања осталих параметара у односу на ову појаву.

Упоређење расподјела показује да не постоји статистички значајна разлика у расподјелама параметара у зависности од присуства некрозе и њене изражености, уз уважавање чињенице о малом броју података. (Mann –Whitney U-тест,  $p=0.478$  до  $0.890$ ).

Табела 42. Расподјела експресије LEPR, индекса пролиферације и неоангиогенезе и муцинске секреције према присуству некрозе и њеном интензитету

Параметри:	Некроза							
	Није идентификована		Слаба		Умјерено изражена		Изражена	
	n	%	n	%	n	%	n	%
Експресија LEPR								
<10% позитивних ћелија	3	27.3	12	21.4	2	40.0	0	0.0
10-50% позитивних ћелија	3	27.3	27	48.2	1	20.0	2	66.7
>50% позитивних ћелија	5	45.5	17	30.4	2	40.0	1	33.3
Индекс пролиферације	n	%	n	%	n	%	n	%
Низак	6	54.5	30	53.6	2	40.0	1	33.3
Висок	5	45.5	26	46.4	3	60.0	2	66.7
Индекс неоангиогенезе	n	%	n	%	n	%	n	%
Низак	6	54.5	28	50.0	3	60.0	2	66.7
Висок	5	45.5	28	50.0	2	40.0	1	33.3
ФУКОМУЦИНИ	n	%	n	%	n	%	n	%
Нема секреције	5	45.5	28	50.0	2	40.0	1	33.3
+/-	5	45.5	26	46.4	2	40.0	1	33.3
(+)	1	9.1	2	3.6	1	20.0	1	33.3
СИЈАЛОМУЦИНИ	n	%	n	%	n	%	n	%
+/-	1	9.1	6	10.7	1	20.0	1	33.3
(+)	6	54.5	24	42.9	3	60.0	1	33.3
(++)	4	36.4	26	46.4	1	20.0	1	33.3
СУЛФОМУЦИНИ	n	%	n	%	n	%	N	%
Нема секреције	4	36.4	18	32.1	2	40.0	1	33.3
+/-	5	45.5	32	57.1	1	20.0	2	66.7
(+)	2	18.2	6	10.7	2	40.0	0	0.0

Запаљенски инфилтрат је био заступљен у истраживаном узорку углавном као слаб или умјерено изражен. Расподјела осталих параметара у односу на интензитет запаљенског инфилтрата приказана је на Табели 43.

Упоређење расподјела параметара по јачини запаљенског инфилтрата, показује да се већина параметара не разликује, односно да не зависе од његовог интензитета. (Mann – Whitney U-тест,  $p=0.194$  до  $0.890$ ).

Изузетак представља маркер пролиферације, изражен преко индекса пролиферације. Овај индекс је у случајевима слабо израженог запаљенског инфилтрата у значајном броју случајева (74.1%), био низак, док је при умјереној изражености запаљенског инфилтрата у значајном броју (67.7%) био висок. (Mann –Whitney U-тест,  $p=0.011 < 0.05$ ). Међутим, код интензивног запаљенског инфилтрата није било статистички значајне разлике у учесталости ниског и високог индекса пролиферације (56.3% према 43.8%).

Табела 43. Расподјела експресије LEPR, индекса пролиферације и неоангиогенезе и муцинске секреције према присуству и изражености запаљенског инфилтрата

Параметри:	Запаљенски инфилтрат							
	Није идентификован		Слаб		Умјерено изражен		Изражен	
	n	%	n	%	n	%	n	%
Експресија LEPR								
<10% позитивних ћелија	0	0.0	8	29.6	5	16.1	4	25.0
10-50% позитивних ћелија	1	100.0	13	48.1	11	35.5	8	50.0
>50% позитивних ћелија	0	0.0	6	22.2	15	48.4	4	25.0
Индекс пролиферације								
Низак	0	0.0	20	<b>74.1</b>	10	32.3	9	56.3
Висок	1	100.0	7	25.9	21	<b>67.7</b>	7	43.8
Индекс неоангиогенезе								
Низак	0	0.0	14	51.9	15	48.4	10	62.5
Висок	1	100.0	13	48.1	16	51.6	6	37.5
ФУКОМУЦИНИ								
Нема секреције	0	0.0	10	37.0	16	51.6	10	62.5
+/-	0	0.0	14	51.9	14	45.2	6	37.5
(+)	1	100.0	3	11.1	1	3.2	0	0.0
СИЈАЛОМУЦИНИ								
+/-	0	0.0	5	18.5	3	9.7	1	6.3
(+)	0	0.0	8	29.6	15	48.4	11	68.8
(++)	1	100.0	14	51.9	13	41.9	4	25.0
СУЛФОМУЦИНИ								
Нема секреције	0	0.0	11	40.7	9	29.0	5	31.3
+/-	1	100.0	12	44.4	19	61.3	8	50.0
(+)	0	0.0	4	14.8	3	9.7	3	18.8

## 5.6. Корелациона анализа експресије лептинских рецептора, муцинске секреције, индекса пролиферације и неоангиогенезе и осталих параметара

У претходним анализама унакрсни приказ параметара указивао је на високо значајне везе у појединим узајамним односима. Праву мјеру њихове повезаности показује корелациона анализа, гдје је значајност те везе доказана значајношћу коефицијента корелације а јачина везе његовом величином.

На Табели 44., у корелационој матрици, сви параметри који су били предмет анализе у претходним поглављима приказани су преко коефицијената корелације (cc) уз његову статистичку значајност (p).

Експресија LEPR значајним и високим позитивним коефицијентима корелације (0.63-0.66) повезана је са индексима експресије нуклеарног пролиферативног антигена (proIDX) и индексом неоангиогенезе (mvdIDX). Осим индекса пролиферације и неоангиогенезе, апсолутна величина нуклеарног пролиферативног антигена (Ki67) и ендоглина (CD105) су високо значајним коефицијентима корелације повезани са експресијом лептин рецептора. (Pearson-ov cc=0.514 и 0.548,  $p<0.001$ ). Тиме се доказује да повишеној експресији лептинских рецептора одговара пораст пролиферативне активности и стварање нових крвних и лимфних судова у колоректалном аденокарциному

Следећа по значају је веза лептин рецептора и сијаломуцина .Високо значајан је коефицијент корелације који показује да је повећање експресије лептин рецептора у позитивној корелацији са хиперсекрецијом ембрионалних сијаломуцина у колоректалном аденокарциному. (cc=0.59,  $p<0.001$ )

Као што се види са Табеле 38., умјерено високи и статистички високо значајни позитивни коефицијенти корелације постоје између експресије рецептора лептина и стадијума тумора по Astler Colleger класификацији (AC) према метастатској захваћености лимфних чворова (MET LC), инвазији лимфних судова (ILC), перинеуралној инвазији (N) и према секрецији неутралних муцина ( $p<0.001$ ).

Нешто слабијим и негативним коефицијентима корелације (-0.24 до -0.27), али статистички значајним на усвојеном нивоу поузданости  $p<0.05$ , експресија лептин

рецептора је у вези са продукцијом сулфомуцина (JKM) и дезмоплазијом (DES) колоректалног карцинома. Негативан коефицијент корелације значи да је повећање експресије рецептора праћено падом секреције јако киселих муцина и слабљењем или одсуством дезмоплазије.

Претходно је доказано да стадијуми тумора по Astler Coller класификацији, показују значајне промјене у свим упоређиваним параметрима, у вези са присуством метастатског потенцијала колоректалног карцинома. Ова повезаност потврђена је и врло високим и значајним коефицијентом корелације (0.84), између AC стадијума и присуства метастаза, као и степеном захваћености лимфних чворова. Повезана са овим је високо значајна корелација AC стадијума и инвазије лимфних и крвних судова и нерава, и нарочито удаљених метастаза.

AC стадијум је у доброј и сигнификантној вези са експресијом лептин рецептора (0.43,  $p < 0.001$ ), али је још јача позитивна повезаност индекса пролиферације и неоангиогенезе и ових стадијума (0.64 и 0.51). Фукомуцини и сијаломуцини су у доброј позитивној корелацији са AC стадијумом а сулфомуцини у негативној. Слаба, али значајна, негативна корелација постоји између ових стадијума и појаве дезмоплазије у колоректалном карциному.

Високо је сигнификантна и позитивна корелација стадијума по Astler Coller класификацији и патолошког стадијума тумора ( $cc=0.60$ ,  $p < 0.001$ ).

Муцинска секреција је у доброј и значајној узајамној повезаности (0.37 до 0.44), једино је секреција сулфомуцина у негативној корелацији према осталим муцинима, а тако и према осталим параметрима: расподјели експресије LEPR, пролиферативном и индексу неоангиогенезе, као и инвазији лимфних судова. Продукција сијаломуцина је у јачој вези са пролиферативном активношћу и неоангиогенезом ( $cc=0.44$ ) у односу на фукомуцине ( $cc=0.27$ ), изражено значајним коефицијентима корелације.

Удаљене метастазе најбоље корелирају, осим доказане везе са AC стадијумом, са постојањем инвазије крвних судова и нерава (0.61 и 0.67). Повезаност ових метастаза добра је и статистички значајна са индексима пролиферације и неоангиогенезе ( $cc=0.36$ ), а нешто слабија, али статистички значајна, према експресији лептин рецептора. (0.24,  $p=0.04 < 0.05$ ).

Хистолошки градус тумора је, због поменутих ограничења у расподјели овог параметра, гдје је већина тумора сврстана у умерено диферентоване, показао једину значајну повезаност са индексом пролиферације у ткиву (cc=0.30).

Табела 44. Корелациона матрица – међузависност параметара – значајност и степен зависности

		LEPR	proIDX	mvdIDX	HM	СКМ	JKM	HG. ту	PT.стад	АС.Стад	МЕТ ЛЦ	УМ	ИЛС	ИКС	ИН	ДЕС	НЕК	ЗАП.ИН
LEPR	cc	1.00	<b>0.66*</b>	<b>0.63*</b>	<b>0.40*</b>	<b>0.59*</b>	- <b>0.27*</b>	0.14	0.16	<b>0.43*</b>	<b>0.44*</b>	<b>0.24*</b>	<b>0.45*</b>	0.23	<b>0.35*</b>	- <b>0.24*</b>	-0.03	0.10
	p		0.00	0.00	0.00	0.00	0.02	0.22	0.16	0.00	0.00	0.04	0.00	0.05	0.00	0.04	0.82	0.41
proIDX	cc	<b>0.66*</b>	1.00	<b>0.47*</b>	<b>0.27*</b>	<b>0.44*</b>	- <b>0.32*</b>	<b>0.30*</b>	<b>0.25*</b>	<b>0.64*</b>	<b>0.68*</b>	<b>0.36*</b>	<b>0.55*</b>	<b>0.38*</b>	<b>0.43*</b>	-0.12	0.08	0.18
	p	0.00		0.00	0.02	0.00	0.01	0.01	0.03	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.29	0.52	0.13
mvdIDX	cc	<b>0.63*</b>	<b>0.47*</b>	1.00	0.22	<b>0.44*</b>	- <b>0.33*</b>	0.00	0.19	<b>0.51*</b>	<b>0.43*</b>	<b>0.36*</b>	<b>0.50*</b>	<b>0.38*</b>	<b>0.29*</b>	-0.20	-0.03	-0.08
	p	0.00	0.00		0.05	0.00	0.00	0.98	0.10	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.09	0.80	0.48
NM	cc	<b>0.40*</b>	<b>0.27*</b>	<b>0.22*</b>	1.00	<b>0.37*</b>	- <b>0.34*</b>	0.09	0.22	<b>0.43*</b>	<b>0.39*</b>	<b>0.33*</b>	<b>0.41*</b>	<b>0.26*</b>	0.18	-0.26	0.06	<b>-0.26*</b>
	p	0.00	0.02	0.05		0.00	0.00	0.43	0.06	0.00	0.00	0.00	0.00	0.02	0.13	0.03	0.62	0.02
СКМ	cc	<b>0.59*</b>	<b>0.44*</b>	<b>0.44*</b>	<b>0.37*</b>	1.00	- <b>0.44*</b>	-0.02	0.35	<b>0.47*</b>	<b>0.42*</b>	0.23	<b>0.44*</b>	<b>0.23*</b>	0.20	-0.12	-0.07	-0.13
	p	0.00	0.00	0.00	0.00		0.00	0.87	0.00	0.00	0.00	0.04	0.00	0.04	0.09	0.32	0.56	0.26
JKM	cc	<b>-0.27*</b>	<b>-0.32*</b>	<b>-0.33*</b>	- <b>0.34*</b>	- <b>0.44*</b>	1.00	-0.22	- <b>0.45*</b>	- <b>0.50*</b>	- <b>0.50*</b>	-0.10	- <b>0.46*</b>	-0.04	-0.07	0.14	0.01	0.07
	p	0.02	0.01	0.00	0.00	0.00		0.06	0.00	0.00	0.00	0.39	0.00	0.72	0.55	0.24	0.93	0.56
HG.ту	cc	0.14	<b>0.30*</b>	0.00	0.09	-0.02	-0.22	1.00	0.18	0.14	0.22	-0.03	0.14	0.07	0.06	0.05	0.00	0.11
	p	0.22	0.01	0.98	0.43	0.87	0.06		0.12	0.23	0.06	0.82	0.23	0.57	0.62	0.68	0.98	0.33
PT.стад	cc	0.16	0.25	0.19	0.22	<b>0.35*</b>	- <b>0.45*</b>	0.18	1.00	<b>0.60*</b>	<b>0.44*</b>	0.17	<b>0.44*</b>	0.19	0.12	- <b>0.23*</b>	<b>0.32*</b>	-0.18
	p	0.16	0.03	0.10	0.06	0.00	0.00	0.12		0.00	0.00	0.13	0.00	0.11	0.29	0.04	0.01	0.13
АС.Стад	cc	<b>0.43*</b>	<b>0.64*</b>	<b>0.51*</b>	<b>0.43*</b>	<b>0.47*</b>	- <b>0.50*</b>	0.14	<b>0.60*</b>	1.00	<b>0.84*</b>	<b>0.54*</b>	<b>0.78*</b>	<b>0.51*</b>	<b>0.46*</b>	- <b>0.25*</b>	0.19	-0.15
	p	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.23	0.00		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.03	0.10	0.20
МЕТ ЛЦ	cc	<b>0.44*</b>	<b>0.68*</b>	<b>0.43*</b>	<b>0.39*</b>	<b>0.42*</b>	- <b>0.50*</b>	0.22	<b>0.44*</b>	<b>0.84*</b>	1.00	0.23	<b>0.79*</b>	<b>0.29*</b>	<b>0.34*</b>	-0.17	0.13	0.00
	p	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.06	0.00	0.00		0.05	0.00	0.01	0.00	0.14	0.26	0.99
УМ	cc	<b>0.24*</b>	<b>0.36*</b>	<b>0.36*</b>	<b>0.33*</b>	<b>0.23*</b>	-0.10	-0.03	0.17	<b>0.54*</b>	0.23	1.00	<b>0.31*</b>	<b>0.67*</b>	<b>0.61*</b>	0.02	0.11	-0.12
	p	0.04	0.00	0.00	0.00	0.04	0.39	0.82	0.13	0.00	0.05		0.01	0.00	0.00	0.89	0.34	0.29
ИЛС	cc	<b>0.45*</b>	<b>0.55*</b>	<b>0.50*</b>	<b>0.41*</b>	<b>0.44*</b>	- <b>0.46*</b>	0.14	<b>0.44*</b>	<b>0.78*</b>	<b>0.79*</b>	<b>0.31*</b>	1.00	<b>0.40*</b>	<b>0.37*</b>	-0.10	0.20	-0.13
	p	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.23	0.00	0.00	0.00	0.01		0.00	0.00	0.37	0.09	0.27
ИКС	cc	0.23	<b>0.38*</b>	<b>0.38*</b>	<b>0.26*</b>	<b>0.23*</b>	-0.04	0.07	0.19	<b>0.51*</b>	<b>0.29*</b>	<b>0.67*</b>	<b>0.40*</b>	1.00	<b>0.35*</b>	-0.01	0.11	0.06
	p	0.05	0.00	0.00	0.02	0.04	0.72	0.57	0.11	0.00	0.01	0.00	0.00		0.00	0.93	0.36	0.58
ИН	cc	<b>0.35*</b>	<b>0.43*</b>	<b>0.29*</b>	0.18	0.20	-0.07	0.06	0.12	<b>0.46*</b>	<b>0.34*</b>	<b>0.61*</b>	<b>0.37*</b>	<b>0.35*</b>	1.00	-0.10	0.17	-0.05
	p	0.00	0.00	0.01	0.13	0.09	0.55	0.62	0.29	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00		0.38	0.14	0.69
ДЕС	cc	<b>-0.24*</b>	-0.12	-0.20	- <b>0.26*</b>	-0.12	0.14	0.05	- <b>0.23*</b>	- <b>0.25*</b>	-0.17	0.02	-0.10	-0.01	-0.10	1.00	-0.15	<b>0.25*</b>
	p	0.04	0.29	0.09	0.03	0.32	0.24	0.68	0.04	0.03	0.14	0.89	0.37	0.93	0.38		0.19	0.03
НЕК	cc	-0.03	0.08	-0.03	0.06	-0.07	0.01	0.00	<b>0.32*</b>	0.19	0.13	0.11	0.20	0.11	0.17	-0.15	1.00	-0.14
	p	0.82	0.52	0.80	0.62	0.56	0.93	0.98	0.01	0.10	0.26	0.34	0.09	0.36	0.14	0.19		0.23
ЗАП.ИН.	cc	0.10	0.18	-0.08	- <b>0.26*</b>	-0.13	0.07	0.11	-0.18	-0.15	0.00	-0.12	-0.13	0.06	-0.05	<b>0.25*</b>	-0.14	1.00
	p	0.41	0.13	0.48	0.02	0.26	0.56	0.33	0.13	0.20	0.99	0.29	0.27	0.58	0.69	0.03	0.23	

\* сигнификантно p<0.05, cc – Spearman-ов коефицијент корелације

## 5.7. Гранична вриједност (cut off) нуклеарног пролиферативног антигена (Ki67) и маркера ангиогенезе (CD105) у предикцији прогресивне колоректалне карциногенезе

Сигнификантан пораст експресије LEPR у пацијената са метастатским формама колоректалног карцинома указује да је сензитивност активности лептин рецептора главни индикатор метастаза у ткиву колона и да би експресија рецептора лептина могла бити вриједан дијагностички параметар .

Значајан пораст експресије рецептора лептина, односно пораст пролиферативне активности и неоангиогенезе, између стадијума В1 и В2 насупрот С до D по Astler Collier класификацији, створио је услове да се овај гранични праг преко вриједности нуклеарног пролиферативног антигена (Ki67) и маркера ангиогенезе (CD105), може прецизно одредити као маркер прогресије колоректалног карцинома у метастатску болест.

Примјеном ROC (receiver operating characteristics) анализе одређене су граничне вриједности нуклеарног пролиферативног антигена (Ki67) и маркера ангиогенезе (CD105), изнад којих са високом поузданошћу се може тврдити да ће колоректални аденокарцином бити у прогресији са појавом и увећањем метастатског потенцијала. (График 21)

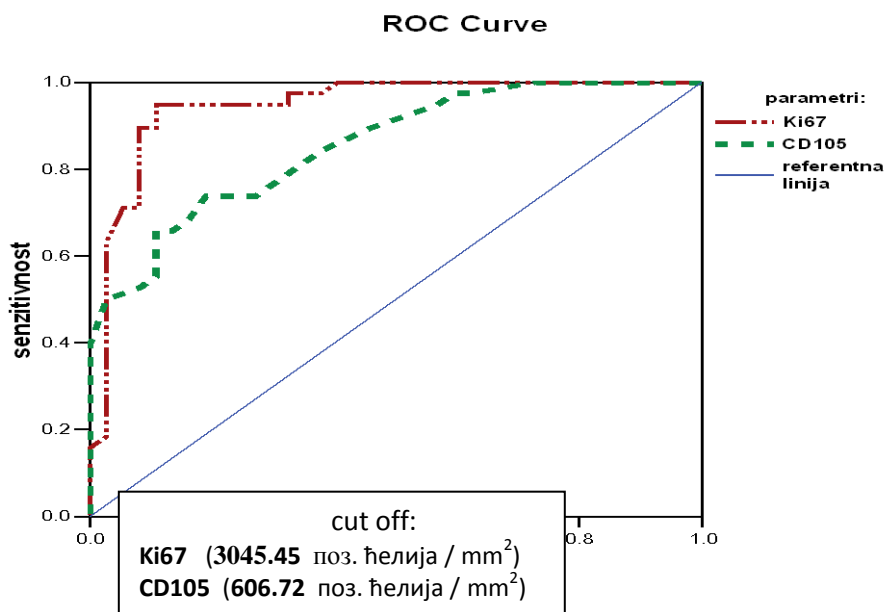


График 21. ROC крива одређује граничну (cut off) вриједност нуклеарног пролиферативног антигена (Ki67) и маркера ангиогенезе (CD105),



Високо сигнификантна вриједност површине испод криве AUC(area under the curve), показује да су добијене cut off вриједности, уз високу сензитивност и специфичност, поуздани дијагностички маркери прогресивне колоректалне карциногенезе. (Табела 45)

Табела 45.

Параметри	AUC	P	CI (95%)	Cut off	Сензитивност	Специфичност
<b>Ki67</b>	0.945	<b>&lt;0.0001</b>	0.891-0.999	<b>3045.45*</b>	89.5%	91.9%
<b>CD105</b>	0.854	<b>&lt;0.0001</b>	0.772-0.936	<b>606.72*</b>	73.7%	81.1%

\*број имунореактивних ћелија у ткиву мм<sup>2</sup> CI- интервал повјерења



Слика 1. Дуплекс карцином ректума



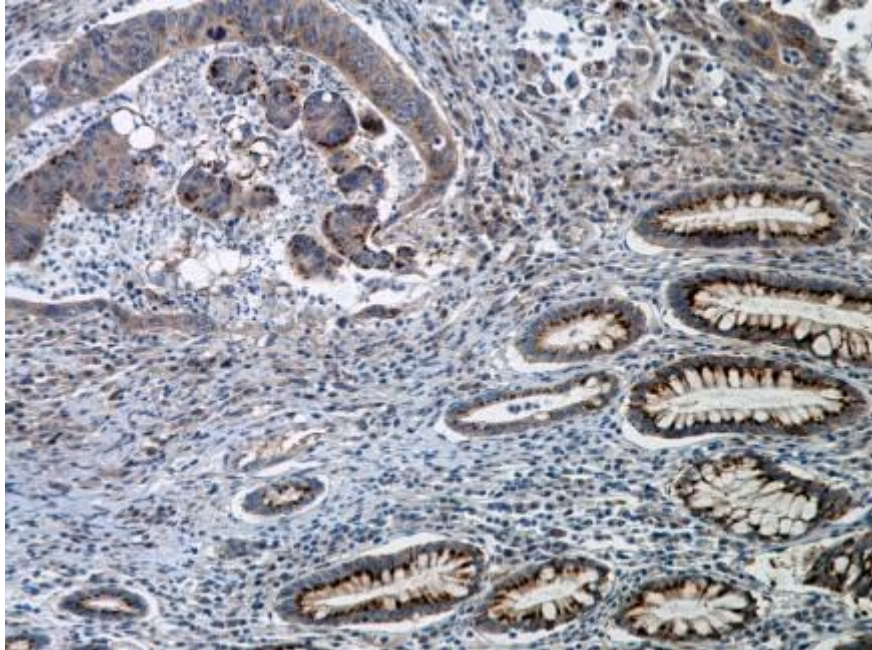
Слика 2. Карцином сигмоидног колона



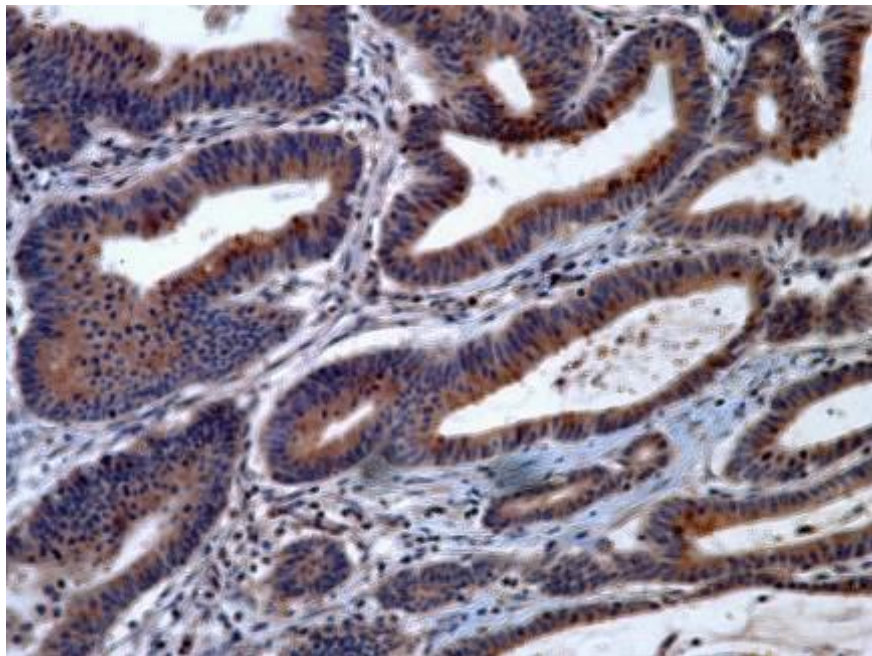
Слика 3. Карцином цекума - десна хемиколектомија



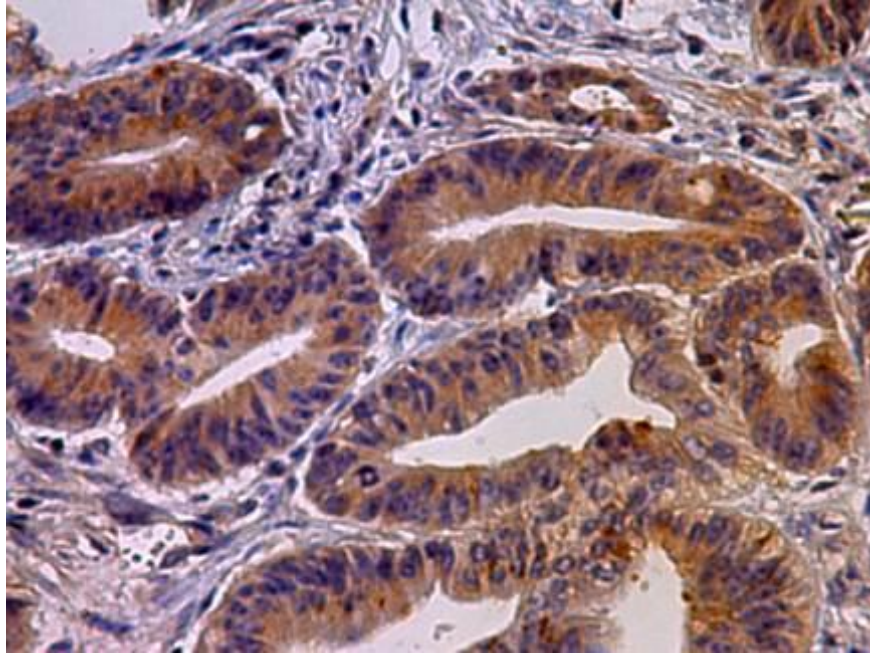
Слика 4. Карцином после зрачења- предња ниска ресекција карцинома ректума



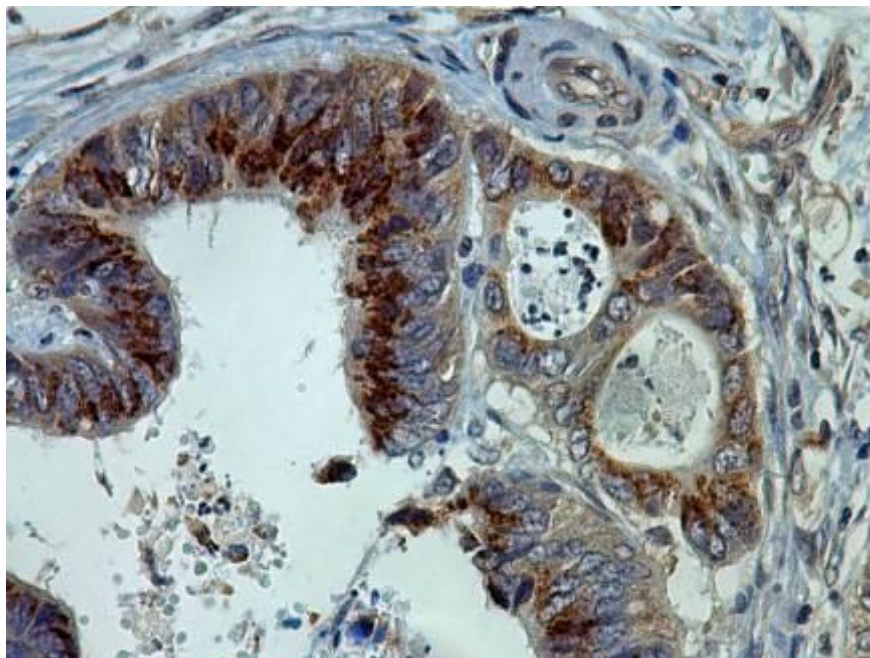
Слика 5: Експресија LEPR у ткиву слабо диферентованог колоректалног карцинома и у околној нетуморској мукози (ABCx100).



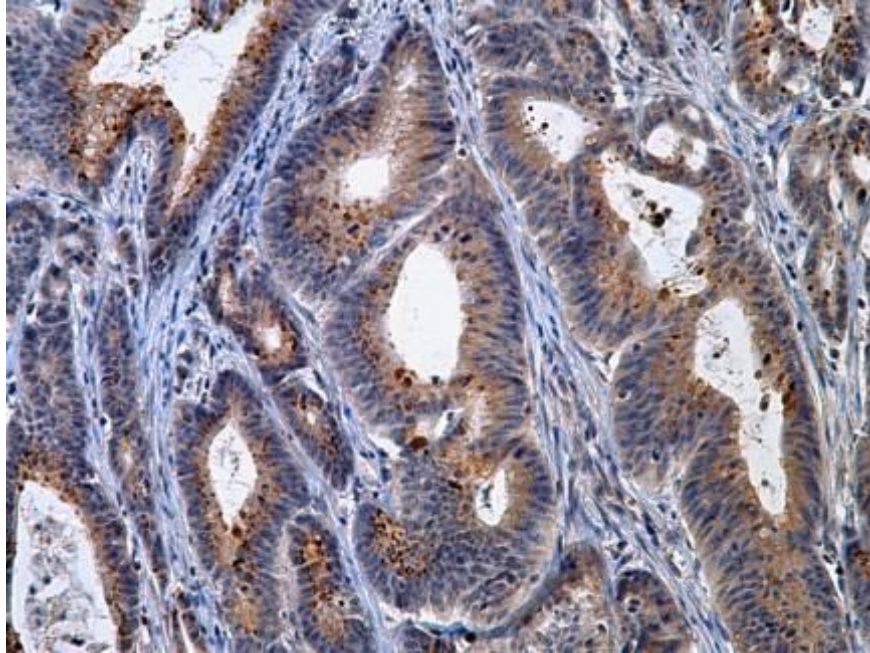
Слика 6. Изражена имунохистохемијска експресија LEPR у умјерено диферентованом колоректалном аденокарциному (ABC x200)



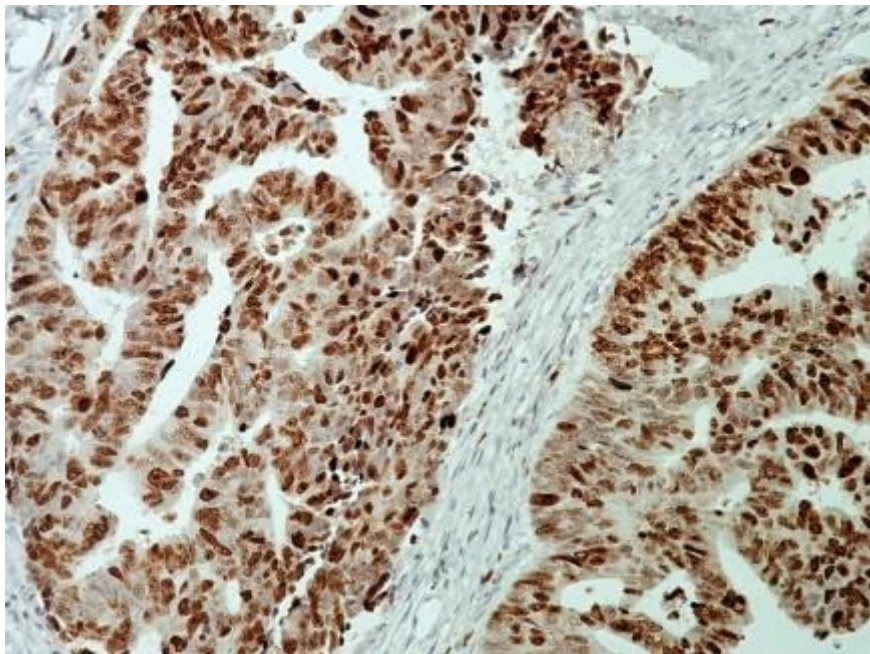
Слика.7.Изражена интрацитоплазматска и интрамембранозна експресија LEPR у добро диферентованом колоректалном аденокарциному (ABC x200)



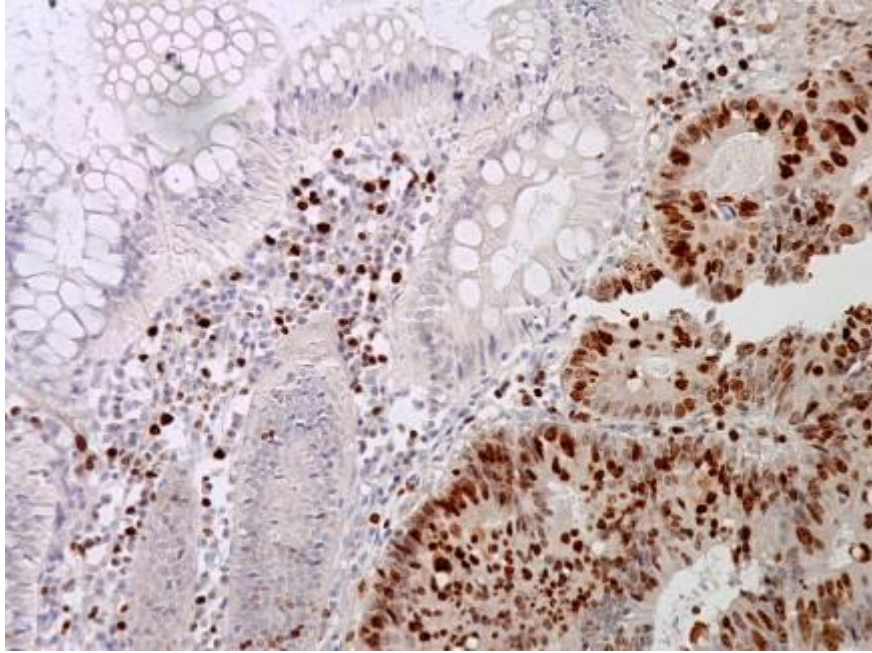
Слика 8. Изражена микрогрануларна експресија LEPR у цитоплазми и ћелијској мембрани канцерских жлијезда (ABC x 400)



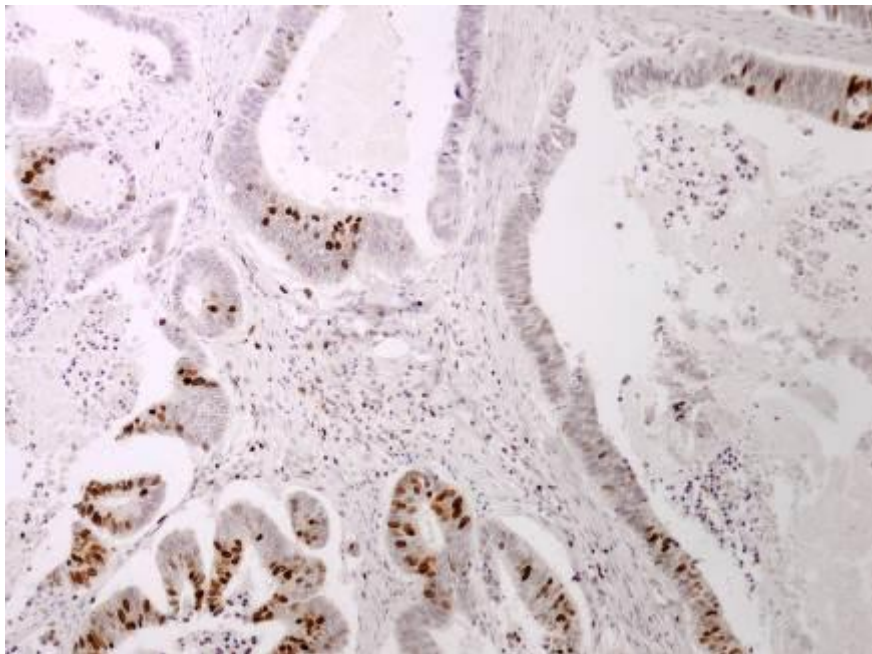
Слика 9. Умјерена и фокално јака експресија LEPR у колоректалном аденокарциному (ABC x 200)



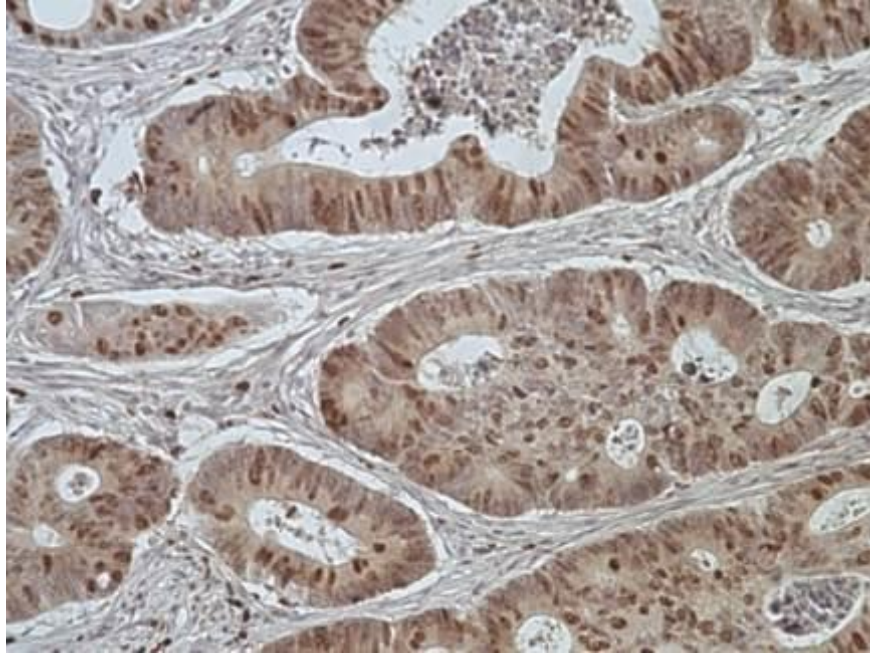
Слика 10. Јака пролиферативна активност у слабо диферентованом колоректалном аденокарциному (ABCx400).



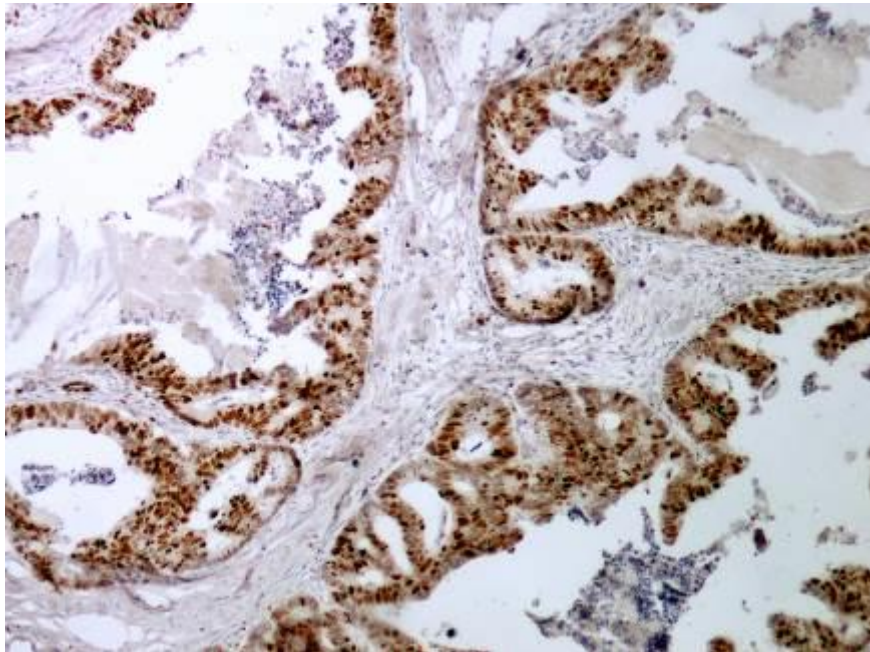
Слика 11. Јака пролиферативна активност у ткиву колоректалног карцинома и изразито слаба пролиферативна активност у околној не-туморској мукози (ABCx200)



Слика 12. Слаба пролиферативна активност у ткиву колоректалног аденокарцинома (ABCx200)

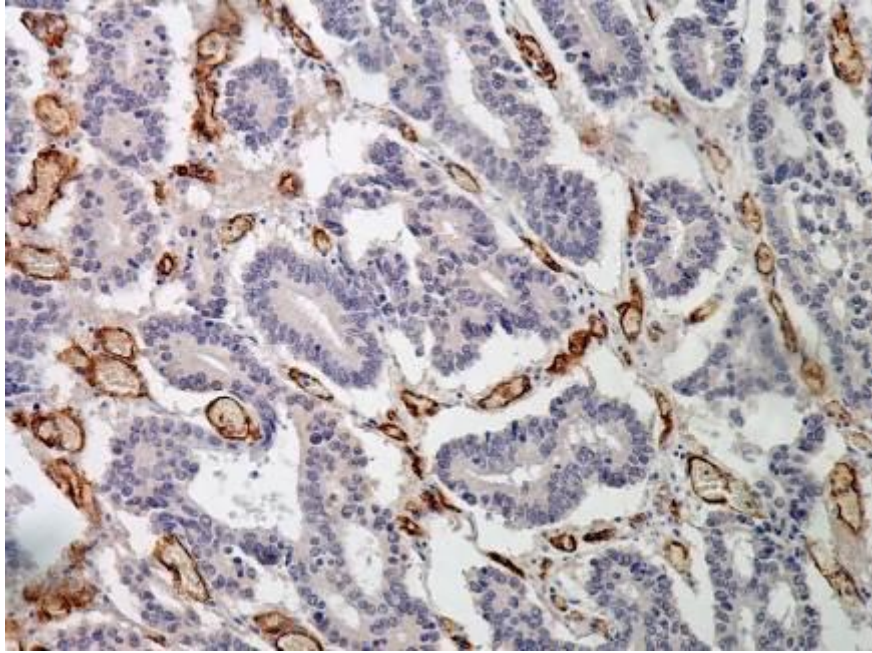


Слика 13. Умјерена пролиферативна активност у добро до средње диферентованом колоректалном аденокарциному (ABCx200)

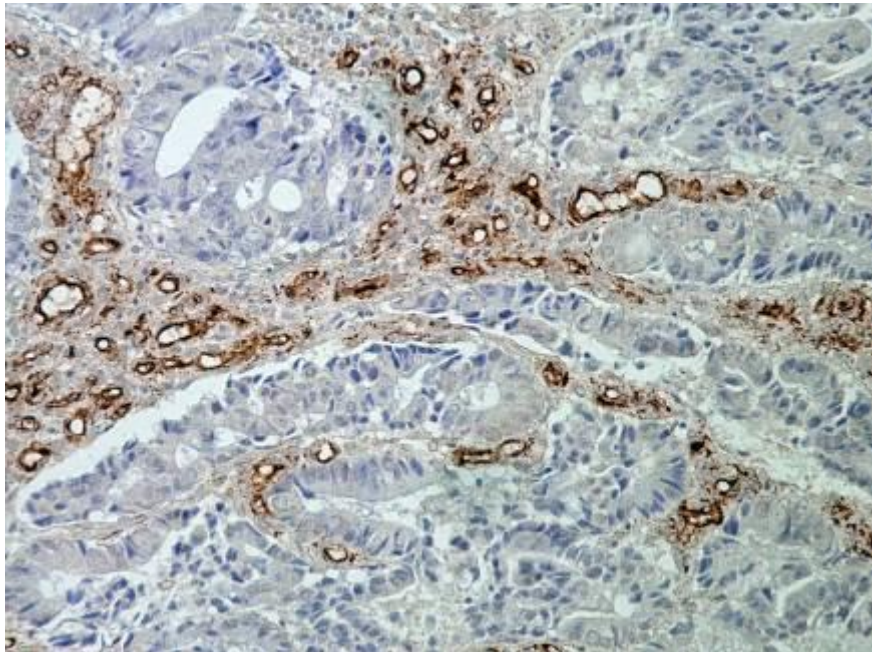


Слика 14. Умјерена пролиферативна активност у слабо диферентованом колоректалном аденокарциному (ABCx100)

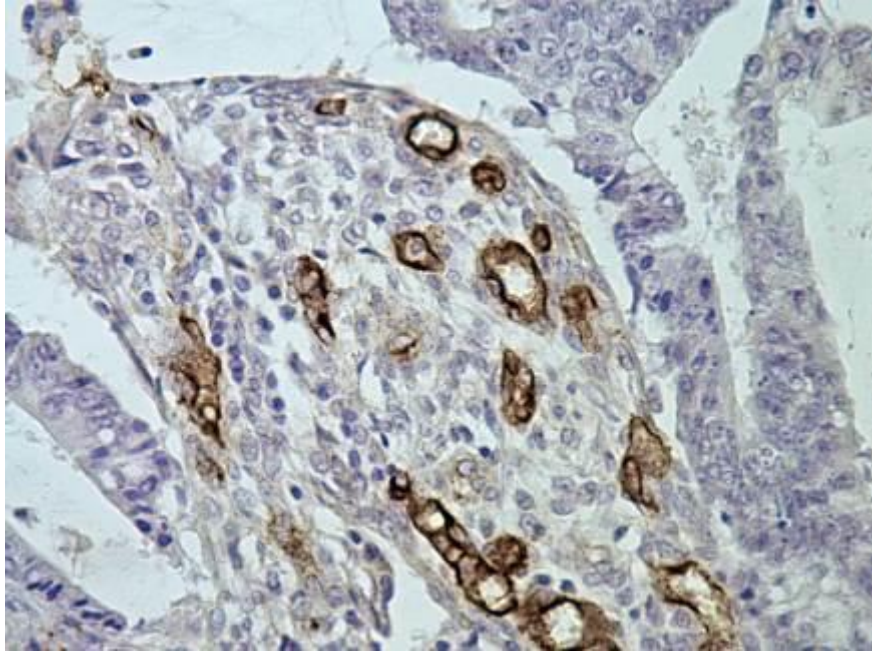




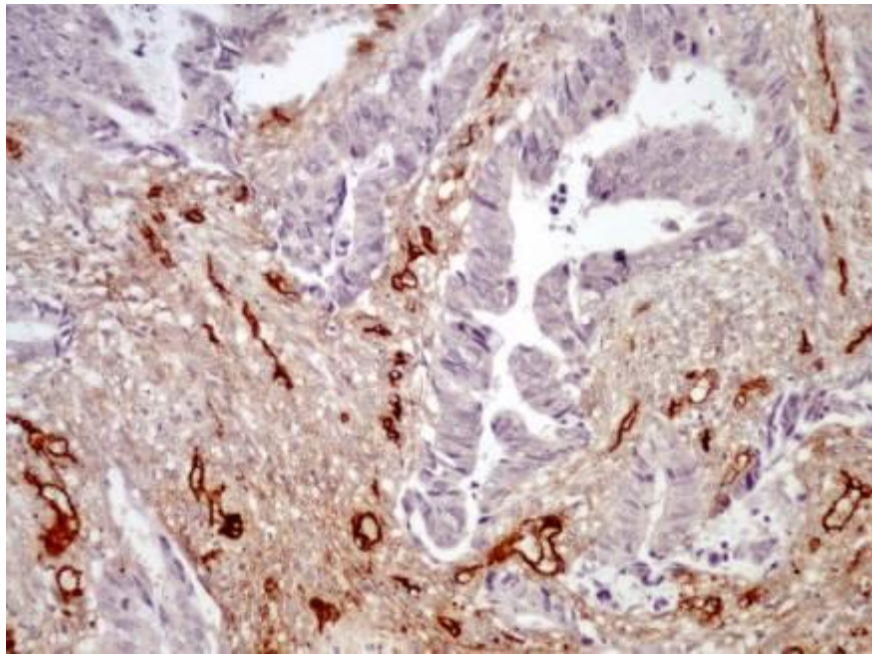
Слика 15. Наглашена микроваскуларна густина у перитуморској строми колоректалног аденокарцинома (АВСx200)



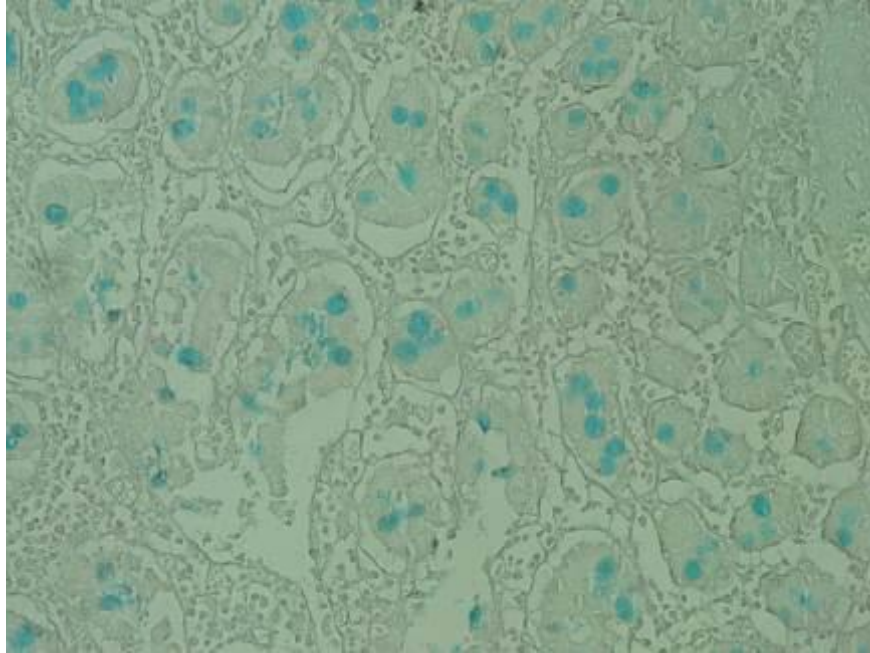
Слика 16. Изражена неоваскуларизација у средње до лоше диферентованом колоректалном аденокарциному (АВСx100)



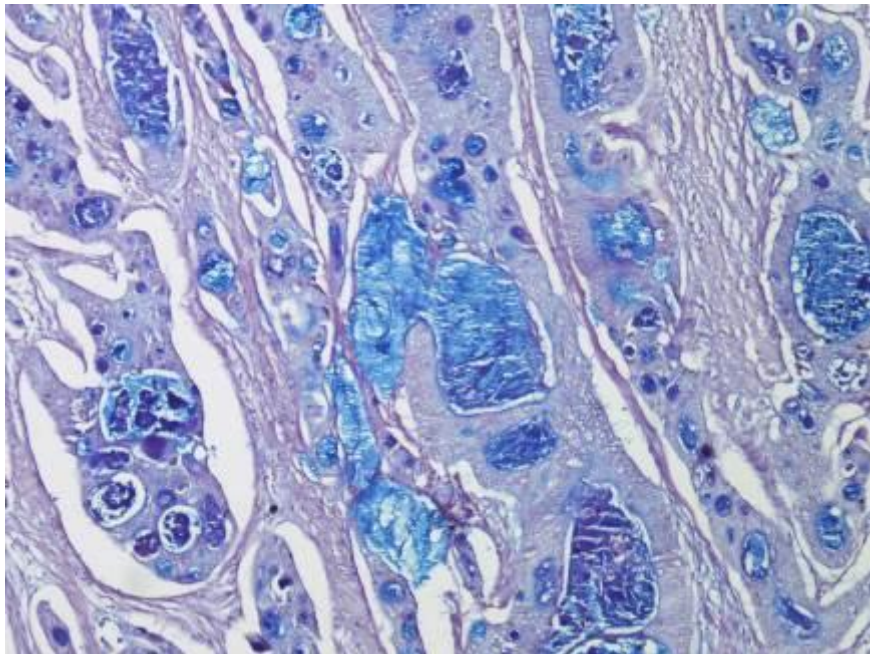
Слика 17. Интратуморска микроваскуларна пролиферација (ABCx400)



Слика 18. Интензивна експресија CD105 у туморском фронту (ABCx200)



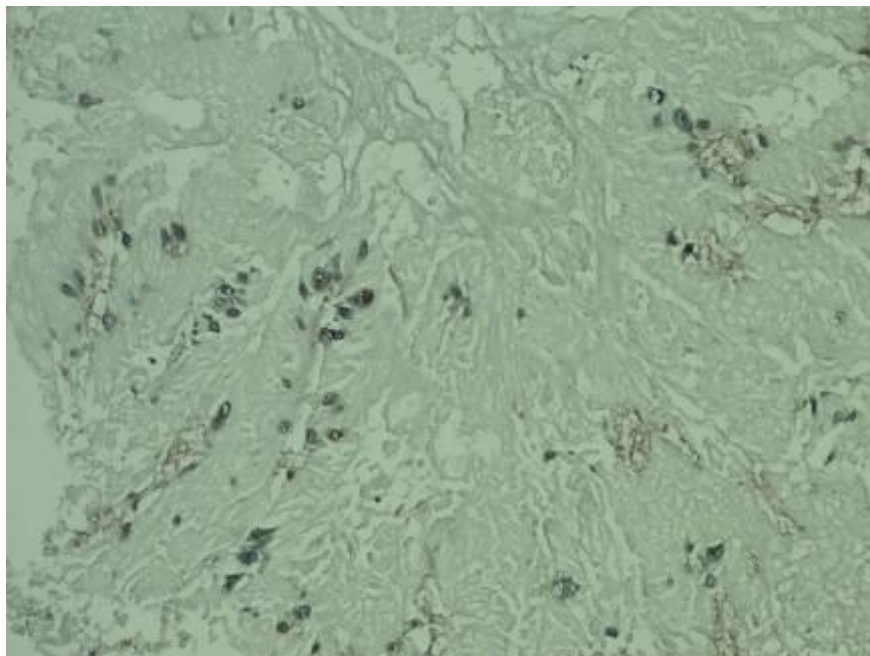
Слика19. Умјерена, фокална интраћелијска експресија сијаломуцина у колоректалном аденокарциному (АВ-РАS рН 2.5х200)



Слика 20. Изражена интраћелијска хистохемијска експресија сијаломуцина у лоше диферентованом колоректалном аденокарциному (АВ-РАS рН 2.5х200).



Слика 21. Дифузна, екстраћелијска хиперсекреција сијаломуцина (HID-AB рН 2.5 x200)



Слика 22.. Изражена редукција сулфомуцина у колоректалном аденокарциному (HID-AB рН 2.5 x200)

## 6. Д И С К У С И Ј А

### 6.1.Клиничко-патолошке карактеристике колоректалног карцинома

И поред тога што је у неким земљама (САД,Француска) стопа морталитета колоректалног карцинома благо редукована (3), прије свега захваљујући адекватним скрининг програмима, ипак се овај тумор,по подацима Интернационалне агенције за истраживање карцинома (IARC),традиционално сврстава међу три најфреквентније малигне неоплазме у хуманој онкологији (51). Саопштено је да колоректални карцином у свијету представља 9,5% свих карцинома код мушке и 8,3% код женске популације. Истовремено је процијењено да 75% пацијената са дијагнозом колоректалног карцинома умре од ове болести (232). Колоректални карцином је по морталитету у развијеним земљама на другом мјесту, а алармантан је податак да су инциденца и морталитет у посљедњих тридесет година у сталном порасту, са просјечном годишњом стопом раста од око 3% или са више од 400.000 новообољелих у току једне године (233), при чему је упадљиво повећање инциденце забиљежено у земљама у транзицији (1,52).У Србији је карцином колоректалне регије други водећи узрок смртности са стопом морталитета која износи 16,6/100.000 за цјелокупну популацију, на основу које се Србија сврстава у земље са високим морталитетом (234). У Црној Гори још увијек не постоје званични подаци, али се сматра да су епидемиолошки подаци слични као у земљама региона.

У свјетским размјерама, највећа стопа преживљавања је забиљежена у Сједињеним Америчким Државама, гдје петогодишње преживљавање, када се болест открије у раном стадијуму, износи 65%, док у источној и централној Европи петогодишње преживљавање износи 34% (56,57). Географске разлике у инциденци, морталитету и преживљавању се могу објаснити различитој изложености утицајима околине, различитим навикама у исхрани и различитим генетским предиспозицијама.

Већина колоректалних карцинома су спорадични, а осим спорадичног, око 10% колоректалних карцинома чини насљедни карцином који се дијагностикује у раним

годинама живота (51,66). Запажено је да приближно 15-30% спорадичних колоректалних карцинома има генетску основу, да су они најчешће локализовани у десном колону, муцинозног су хистолошког типа и по правилу су лоше диферентовани (235). Код болесника са фамилијарном полипозом колона дистални карцином је знатно чешћи од проксималног (236).

Бројне епидемиолошке, генетске и експерименталне студије сугеришу да је за настанак колоректалног карцинома одговорна интеракција гена и окружења (10,60,73). Фактори ризика за настанак колоректалног карцинома се традиционално дијеле на непроменљиве и променљиве, односно факторе ризика који су подложни превенцији. Непромјенљиви фактори ризика су: узраст, позитивна лична анамнеза на присуство полипа, на инфламаторна обољења, на малигну болест колоректума и наследни синдроми.

У литератури је прихваћен став да ризик за настанак колоректалног карцинома расте са годинама и да се око 90% па чак и више колоректалних карцинома јавља у особа старијих од 50 година (62,63). Истовремено се истиче да је ризик за појаву колоректалног карцинома 15 пута већи код особа преко 50 година, него код особа старости између 20 и 49 година (237).

Иако сви неопластични полипи не морају да постану малигни, позитивна лична анамнеза на присуство полипа представља фактор ризика јер су неопластични полипи доказане преинвазивне лезије, а познато је да око 95% колоректалних карцинома настаје из предходно постојећег аденома, при чему процес малигне трансформације може трајати годинама (238,239). Малигна алтерација аденома значајно је већа код аденома већих од 10мм, код аденома вилозне структуре и код аденома са тешкостепеном дисплазијом (240,241).

Опсежне студије су показале да ће се у 18% болесника, који се преко тридесет година лијече од улцерозног колитиса, развити колоректални карцином (242,243).

Позитивна лична анамнеза на присуство колоректалног карцинома код блиских сродника такође представља фактор ризика. Испитивања су показала да око 20% болесника који имају колоректални карцином има блиске сроднике који такође болују од ове болести (244).

У око 5% болесника са колоректалним карциномом су присутни генетски синдроми, од којих су фамилијарна аденоматозна полипоза (ФАП) и Lynch синдром најчешће повезани

са колоректалним карциномом(245).Сматра се да Lynch синдром чини основу 2-4% свих колоректалних карцинома (245, 246). Запажено је да је у Lynch синдромима колоректални карцином у око 70% случајева локализован у проксималном колону и да је најчешће мукус продукујући слабо диферентован тип (247)

У промјенљиве факторе ризика подложне превенцији спадају: исхрана, гојазност, физичка неактивност и конзумација алкохола и цигарета.

Кад је исхрана у питању,бројне студије сугеришу позитивну корелацију између конзумације црвеног меса,месних прерађевина и масти животињског поријекла са развојем колоректалног карцинома (6,51,58).Друге студије су показале да људи који уносе јако мало воћа и поврћа имају повећан ризик за настанак овог тумора (6,51); међутим, постоје и мишљења која негирају значајност везе конзумације воћа, поврћа и непрерађених житарица са колоректалним карциномом (248).

Гојазност или прекомјерна телесна тежина и физичка неактивност су најчешће потенцирани фактори ризика у настанку колоректалног карцинома (8,51,238), а већ је истакнуто да гојазне особе, за разлику од нормално ухрањених, имају чак до 3,5 пута већи ризик за настанак овог тумора (7). Сматра се да висок ниво физичке активности смањује ризик за настанак колоректалног карцинома чак и до 50% (248), а једно од објашњења је да физичка активност утиче на повећање мотилитета цријева (249).

Будући да су метаболити алкохола, попут ацеталдехида, карциногене супстанце, то се алкохол убраја у факторе ризика за развој колоректалног карцинома. Алкохол ремети синтезу ДНК, доводи до стварања кисеоничних радикала и преко свог метаболита ацеталдехида инхибише репаративне ензиме.У алкохолним пићима могу да се нађу и други карциногени попут кротон-алдехида,нитрозамина и полицикличних угљоводоника (250). Истраживања спроведена од стране Ferrari-ја и сар. показују да конзумација 2 до 4 алкохолна пића дневно за око 23% повећавају ризик за настанак колоректалног карцинома (251). Интеракција алкохола са дуваном је од стране више истраживача такође сврстана у важне факторе ризика (252,253). Дуван може индуковати мутације ДНК које се мање ефикасно исправљају у присуству алкохола. Алкохол доприноси и бољој пенетрацији карциногена у ћелије слузнице (60,252). Zisman и сар саопштавају да је око 12% умрлих од карцинома колона у вези са пушењем (253), а Liang и сар.у својој мета-анализи истичу учесталију појаву карцинома у ректуму него у другим дјеловима колона, у пушача (254).

Сви ови фактори учествују у карциногенези карцинома колона, а нова сазнања и савремена методологија су омогућили цитогенетска и молекуларна проучавања на основу којих се зна да је карциногенеза вишеетапни процес са акумулацијом генских алтерација. Попут других малигних тумора и колоректални карцином настаје активацијом онкогена или инактивацијом супресорских гена, као и кроз мутације гена репаратора ДНК. Колоректални карцином настаје једним од два утврђена генска пута. Први је пут хромозомске нестабилности или APC/β катенински пут, познат као „аденом-карцином“ секвенца а други је пут микросателитске нестабилности или поправке погрешно упарене ДНК (61,70).

У путу микросателитске нестабилности наследне мутације настају у једном од 5 гена за поправку погрешно упарене ДНК (MSH2, MSH6, MLH1, PMS1 и PMS2), па настаје херeditарни неполипозни карцином колона. Зна се да ови пацијенти имају повећан ризик од настанка не само колоректалног већ и ендометријалног карцинома и да ови тумори имају бољу прогнозу у односу на случајеве спорадичне форме карцинома. Најчешће оштећени гени су MLH1 и MLH2 (61, 255).

Уобичајени метод за идентификацију мутационог фенотипа је имунохистохемијска идентификација продуката гена репаратора ДНК. Ови тумори са микросателитском нестабилношћу се фенотипски разликују од тумора који су микросателитски стабилни. Наиме, они имају тенденцију да настају проксимално од спленичке флексуре, расту најчешће егзофитично, обично су великих димензија, лоше су диферентовани са екстрацелуларним муцином, са лимфоидном „Crohn-like“ реакцијом и ређе продукују p53 (80).

Најбоље проучен пут колоректалне карциногенезе је пут хромозомске нестабилности односно „аденом-карцином секвенца“ чија се еволуција одвија кроз неколико морфолошки различитих фаза. Најраније идентификована преканцерозна лезија је „аберантни кристални фокус“ (ACF), који представља прелаз између нормалног епитела и аденома. Сматра се да је губитак тумор супресорног APC гена најранији догађај у секвенци настанка аденома (74,75). Микроскопски га чини колекција крипти, које су веће од уобичајених и које су обложене већим бројем епителних ћелија са или без знакова атипичности. Аберантни кристални фокус се може идентификовати и ендоскопски, па се тим путем може и отклонити (70). Мали проценат колоректалних карцинома настаје *de novo* (85,86).



Колоректални карцином је неријетко асимптоматска болест. Некада се симптоми јављају тек у одмаклој фази болести и углавном зависе од локализације и величине тумора (87). Најчешће се јављају крв у столицу, проливи или затвори у трајању дужем од 6 недеља, необјашњив губитак на тежини, необјашњив губитак серумског гвожђа, осјећај непотпуног пражњења цријева после дефекације и болови у трбуху. Преоперативне дијагностичке процедуре обухватају анализу стандардних лабораторијских параметара, испитивање туморских маркера, ендоскопске, радиолошке прегледе и хистопатолошку анализу. За рану дијагностику је корисна анализа крви у столицу - FOBТ тест на окултно крварење (енгл. Fecal occult blood test) (256,257).

Колоноскопија је незамјенљива и доказана метода избора за рану детекцију рака дебелог цријева, а уједно је много прецизнија у односу на радиолошку методу која се изводи са двојним контрастом клизмама кроз ректум којом чак до 50% аденома већих од 1 цм могу бити превиђени (94). За процјену клиничког стадијума болести, тј постојања евентуалних метастаза, користе се конвенционални СТ (компјутеризована томографија) или MR(магнетна резонанца) преглед, као и PET („Positron emission tomography“) scan (95).

Протоколи лијечења колоректалног карцинома се одређују на онколошким конзилијумима, а основни метод лијечења је хируршки са јасно дефинисаним оперативним техникама. Циљ хемо- и радиотерапије је побољшање резултата лијечења јер смањује ризик локалног рецидива за око 30-40% (258) . Хемо и радиотерапија се такође препоручују код узнапредовале болести као преоперативна или постоперативна терапија (ткз неoadјувантна или адјувантна онколошка терапија)(259).

На ресектованом сегменту колоне након хируршке интервенције се поставља дефинитивна хистопатолошка дијагноза болести а истовремено ресекат је најважнији извор података који су од значаја за постоперативни третман и исход болести. Извјештај о рутинском хистопатолошком прегледу садржи класичне хистопатолошке параметре: хистолошки тип тумора, степен диферентованости, лимфну, васкуларну и перинеуралну инвазију, присуство нодалних метастаза, лимфоцитни одговор домаћина и др. Поред ових стандардних параметара, добар хистопатолошки извјештај би требао да садржи и друге предиктивне и прогностичке параметре повезане са преживљавањем и одговором на анти-туморску терапију. У ту сврху се у боље опремљеним здравственим центрима користе различити маркери биолошке агресивности тумора. То су протеини који су производ гена

укључених у процесе карциногенезе. Клинички третман пацијента са колоректалним карциномом некада захтијева и дефинисање промјена на молекуларном нивоу који обухвата идентификацију специфичних генских мутација, промјене гена, губитак гена и др. Протеини кодирани од стране различитих гена могу се идентификовати имунохистохемијским методама (260), док идентификација промјена на генском материјалу захтијева примјену различитих молекуларних метода. Молекуларни маркери имају предиктивну вриједност јер су од помоћи у селекцији пацијената за молекуларну циљну терапију (261,262).

Неопходно је нагласити да нове технике у хистопатолошкој дијагностици представљају саставни, али не и независан и кључни дио дијагностичке процедуре. Микроморфолошки преглед ткивног узорка обојен класичном Н&Е методом представља златни стандард хистопатолошке дијагностике, док све остале методе допуњују коначну дијагнозу и имају допринос у одређивању прогнозе и терапије тумора.

Епидемиолошки подаци до којих смо дошли у нашем истраживању углавном корелирају са расположивим литературним подацима. Наиме, у нашем испитиваном узорку од 75 пацијената је било 45 (60%) особа мушког пола и 30 (40%) жена. Иако ова расподјела по полу показује већу учесталост колоректалних карцинома у мушкараца, ипак није верификована статистички значајна разлика у дистрибуцији карцинома између мушкараца и жена. Мада се на глобалном нивоу сматра да су колоректалним карциномом подједнако захваћена оба пола (43), ипак постоје мета-анализе о већој учесталости овог карцинома код мушкараца него код жена (263)

Кад је у питању узраст, просјечна старост испитаника мушког пола је износила  $65.9 \pm 10.8$  год, док је просјечна старост у женској популацији била  $60.8 \pm 14.5$  год, тако да нема значајне разлике у појави колоректалног карцинома између мушкараца и жена у односу на старост. Највећа учесталост колоректалног карцинома (33.3 %), како у мушкој тако и у женској популацији је забиљежена у седмој деценији живота, односно између 61. и 70-те године живота, што је у складу са извјештајима из литературе по којима се овај карцином у око 80% случајева јавља после 60-е године живота (43,62,63,235). Чини се да је важно напоменути да је у нашем истраживању чак 26.7% жена и 6.7% мушкараца у вријеме операције било млађе од 50 година. Најмлађи испитаник из нашег истраживања је била жена са 27 година у вријеме операције, а намлађи мушкарац је у вријеме операције имао 34 године. Запажа се да су посљедњих година у литератури учестали извјештаји о

колоректалном карциному у популацији испод 40-те године живота, па чак и у веома младих људи (55,64,87,88.238, 264).

Ризик за развој колоректалног карцинома значајно расте након 40-е године живота, а 85% свих карцинома нађе се код особа изнад 50. године живота. Свака особа старија од 50 година носи 5% ризика да ће јој се до старости од 80 година развити карцином колона (264).

## **6.2. Корелација експресије лептин рецептора са клиничко-патолошким параметрима**

### **6.2.1. Експресија лептин рецептора (LEPR)**

Гојазност у комбинацији са физичком неактивношћу је у многим студијама истицан фактор ризика за генезу колоректалног карцинома (8,9,12,51,142,238). Кључни молекул у развоју гојазности је лептин, продукт гена гојазности (Ob-гена), пептид од 16кДа, који примарно секретују адипоцити, али постоје и бројна неадипозна ткива која секретују лептин. Главна функција лептина је регулација утрошка енергије и апетита (6,8). Лептин дјелује преко својих рецептора (LEPR), који припадају првој класи рецептора цитокине фамелије, који су идентификовани као трансмембрански протеини са мултиплим изоформама од LEPRa до LEPRf (24,25,265). Дуга изоформа LEPRb активира интрацитоплазматске трансдукционе путеве и одговорна је за акције лептина (24,25).

У нашем истраживању је микрогрануларна експресија LEPR детектована у цитоплазми и ћелијској мембрани канцерских ћелија колоректалног карцинома у сигнификантном броју случајева (77,3%). При томе је најчешће (44%) заступљена умјерена експресија, а код једне трећине (33,3%) испитаника је верификована изражена експресија LEPR. У 22,7% случајева у ћелијама колоректалног карцинома није забиљежена експресија LEPR, док је у околном нетуморском ткиву изостанак експресије LEPR регистрован у 62,7% случајева. Изражена експресија LEPR у колоректалном карциному, у високом проценту случајева је саопштана и од стране других аутора. Сходно очекивању, подаци о експресији LEPR у колоректалном карциному су прилично хетерогени, Тако је Koda и сар. експресију LEPR открио у 95,5%

(179) , Wang и сар. у 76,5% (28), а Uddin и сар су LEPR експресију регистровали у 87,3% колоректалних карцинома (266).

Бројни извјештаји из литературе указују да лептин игра важну улогу у патогенези и прогресији колоректалног карцинома (26,28).Ниво лептина је повишен у серуму гојазних људи и у директној је корелацији са количином масних наслага, што може бити важна хистолошка карика између гојазности и колоректалног карцинома, а у прилог овога иде и недавно саопштење да висок ниво лептина у серуму представља независан фактор ризика за настанак колоректалног карцинома (23). Запажено је да када дође до повећања броја и величине адипоцита, *Ob* ген почиње са продукцијом лептина који бива секретован у циркулацију (174). Ниво циркулишућег лептина се повећава ноћу и запажено је да је његов циркадијални ритам супротан нивоу циркулишућег кортизола, достижући свој пик у средини ноћних сати, док је пик кортизола током раних јутарњих часова (172). Секретија лептина у адипоцитима и његове циркулацијске вриједности су углавном регулисане од стране инсулина, глукокортикоида и катехоламина. Пост-бета адренергични агонисти и тиазолипидинидиони су повезани са смањеном лептинском експресијом. Егзогена гојазност доводи до повећања масних наслага резултујући повећањем циркулацијских вриједности лептина, што није повезано са очекиваним губитком апетита и смањењем тјелесне масе (14,172)

Такође је запажено да током старења настаје редукција лептина која не зависи од индекса тјелесне масе и других ендокриних промена које су повезане са старењем (173).Лептин даје информације мозгу о масним депоима у тијелу и тиме се понаша као дио повратног механизма који може да функционише као липостат (267,268)

Постоје бројна не-адипозна ткива која синтетишу и секретују лептин укључујући гастричну мукозу, епителне ћелије дојке, миоците и плаценту. Његова експресија је примијећена и у тестисима, јајницима и у фоликулима длаке. Осим у колоректалном карциному, експресија LEPR је регистрована у туморским ћелијама карцинома желуца, плућа, дојке, карцинома простате, карцинома ендометријума, штитасте жлијезде и др (7,9,15-23,26,27,32). Такође је запажено да су карциноми ендометријума, дојке и простате удружени са гојазношћу, па се спекулише да овај феномен може бити удружен са продукцијом биолошки активних супстанци које се секретују у масном ткиву(171,269). У вези са тим је доказано да хипоксија изазива усходну регулацију експресије LEPR која је

тако повећана заједно са акумулацијом HIF-1, који је индуковао лептин ген путем стимулишућег „*hypoxia response element*“ (HRE) (270)

Дејство лептина у енергетском метаболизму је добро познато, али његова улога постаје сложенија од када постоје информације о експресији LEPR у многим нормалним и туморским ткивима. Koda и сар. су у ендометријалном карциному показали позитивну корелацију између лептина, LEPR и HIF-1, што јасно указује на укљученост ткивне хипоксије на стимулацију експресије лептина/лептин рецептора (179). Познато је да HIF-1 позитивни тумори могу бити резистентни на хемо- и радиотерапију због убрзаних процеса транскрипције који се супротстављају процесу апоптозе и фаворизују преживљавање туморских ћелија (271). Ambrosini и сар су показали да хипоксија појачава експресију лептина у културама фибробласта и детектовали су HRE- везујуће мјесто за HIF-1 у структури промотора лептин гена (270).

Експериментално је показано да недостатак лептина, код мишева са мутацијом гена који кодира лептин, или одсуство функционалног лептинског рецептора (db/db мишеви) резултира не само гојазношћу, већ и другим придруженим метаболичким болестима као што је инсулинска резистенција (272).

## **6.2.2. LEPR експресија и хистолошки градус тумора**

Степен хистолошке диференцијације је независан од стадијума тумора и базира се на броју митоза у тумору и на степену сличности туморског ткива са матичним ткивом из кога тумор потиче (61). Већина испитиваних колоректалних карцинома (86.7%) из ове студије припадају умјерено диферентованом типу тумора (хистолошки градус 2- HG2). Веома мали број случајева добро (4 случаја, 5.3%) и лоше (6 случајева, 8%) диферентованих тумора (HG1 и HG3), у овој студији, представља фактор ограничења за упоредне статистичке анализе, али и иначе у саопштењима других аутора смо запазили да су колоректални карциноми у тренутку постављања хистопатолошке дијагнозе најчешће окарактерисани као умјерено диферентовани тумори (273, 274, 275). У вези са тим Fleming и сар. истичу да се практично преко 70% колоректалних карцинома класификују као умјерено диферентовани, док се добро и лоше диферентовани типови срећу у око 10% до 20% (275).

Градирање тумора је рађено према стандардном протоколу на следећи начин: уколико су у преко 95% тумора присутне добро формиране канцерске жлездане формације, тумор је класификован као добро диферентован (HG1), уколико је тај проценат од 50-90% тумор се сврстава у умјерено диферентован (HG2), а ако је мањи од 50% онда је сврстан у лоше диферентован тип (HG3)(99,276). Ткиво добро диферентованог аденокарцинома је сачињено од добро формираних жлезданих формација, обложених атипичним епителним ћелијама које су сачувале свој поларитет. Ове жлијезде веома личе на жлијезде аденома. Слабо диферентовани тумор је сачињени од већином солидних плажа, које су сачињене од ћелија које су изгубиле свој нуклеарни поларитет и имају изражен нуклеарни полиморфизам. Умјерено диферентовани тумори се налазе између ове двије категорије. У неким туморима се могу наћи различите зоне диференцијације тумора, и у том случају градирање се одређује на основу зоне најмање диференцијације.

Извјештаји из литературе указују на сигнификантну повезаност LEPR експресије са хистолошким степеном диференцијације не само колоректалног већ и карцинома оваријума, дојке и карцинома желуца (28,179, 277, 278,279) У нашој студији је изражена експресија LEPR најчесталија (66,7%) унутар групе лоше диферентованих карцинома; међутим, због недовољног узорка (свега 6 случајева) у овој групи, резултати нису могли бити предмет посебне статистичке анализе. Интересантна су истраживања Kode и сар.(179) који су верификовали статистички значајну повезаност између експресије LEPR и умјерено диферентованог колоректалног карцинома, при чему су истакли могућу улогу лептина у процесу туморске дедиференцијације. Корелативном анализом LEPR експресије у карциному ендометријума, исти аутори нису регистровали статистички значајну повезаност експресије LEPR са хистолошким градусом односно са степеном диференцијације ендометријалног карцинома (280). Uddin и сар. су такође сигнификантно виши ниво експресије LEPR нашли у добро диферентованим колоректалним карциномима, у раним стадијумима по American Joint Comitee On Cancer (AJCC)(266). Сигнификантно виши ниво експресије LEPR у добро и средње диферентованим, него у лоше и недиферентованим типовима тумора, али у карциномима желуца, су нашли и Ishikawa и сар. (279)

### 6.2.3 LEPR експресија и стадијум примарног тумора (T)

На основу локалне инвазије примарног тумора смо констатовали да се испитивани тумори, из ове студије, могу класификовати у четири стадијума (од T1-T4). Највећи број (74,7%) колоректалних карцинома је нађен у T3 стадијуму, што се значајно разликује од броја случајева (16%) дијагностикованих у стадијуму T2. У T2 стадијум су класификовани тумори који инфилтришу мишићни омотач, али га не пробијају. У T3 стадијум су сврстани тумори који су пенетрирали кроз мишићни омотач у субсерозу или периколочно/периректално масно ткиво, али не у перитонеалну шупљину или у друге органе (51). У T1 стадијуму је било свега 2,7%, док је у T4 стадијум класификовано 6,7% колоректалних карцинома, односно тумори који су пробали висцерални перитонеум и врше инвазију околних органа и структура (51).

О учесталости колоректалних карцинома у T3 примарном стадијуму, подаци у литератури су прилично хетерогени. Румунска група аутора је из серије од 317 колоректалних карцинома, 58% случајева сврстала у T3 и T4 стадијуме (274). У једној студији из Калифорније, Pollack и сар су анализирајући на четворогодишњем материјалу чак 59076 колоректалних карцинома, нашли да је 57% пацијената у вријеме дијагностике имало колоректални карцином у T3 и T4 стадијуму (281). Аутори истичу да је већина од тих пацијената имала низак социјално-економски статус. Велики број случајева (74,7%) дијагностикован у T3 стадијуму, на нашем испитиваном материјалу, је вјероватно у вези са сиромашним економским статусом, недостатком здравствене културе, неадекватном исхраном и начином живота и недостатком или неадекватно спроведеним скринингом.

Извјештаји о повезаности експресије LEPR и стадијума примарног тумора су сасвим неусаглашени. Бројне студије указују на сигнификантну корелацију између LEPR експресије и стадијума примарног тумора (28,179,282,279) али постоје и истраживања у којима није нађена статистички значајна веза између LEPR експресије и стадијума примарног тумора (266,280). У нашој студији је, у преовлађујућем T3 стадијуму, у високом проценту случајева нађена изражена (37.5%) и умјерена (44.6%) LEPR експресија, али обзиром на мали узорак у другим групама, постоји ограничавајући услов у упоредним анализама.

#### **6.2.4. LEPР експресија и регионални лимфни чворови и удаљене метастазе**

Познато је да су дубина туморске инвазије и метастатски потенцијал тумора од пресудне важности за прогнозу и преживљавање. Метастатски потенцијал тумора зависи од присуства или одсуства метастаза у регионалним лимфним чворовима (122,123).

Метастазе у лимфним чворовима, у овом истраживању, су нађене код 39 испитаника (52%), док 36 (48%) испитаника није имало метастазе у лимфним чворовима. Метастатске депозите у 1-3 лимфна чвора је имало 22 (29,3 %) болесника, депозити у 4-6 лимфних чворова су нађени у 8 (10,7%) испитаника, а депозите у 7 и више лимфних чворова је имало 9 (12%) болесника. Добијени резултати су у сагласности са резултатима у доступној литератури. (283. 284)

Метастазе се обично шире од једног ка другом лимфном нодусу, пратећи лимфну дренажу. Карциноми колоректума могу метастазирати у мезентеричке, али и у ингвиналне лимфне нодусе. Код карцинома ректалне регије могу бити присутне метастазе у ингвиналне лимфне нодусе, када је обично присутна унилатерална метастаза, али у једне трећине болесника и билатерална (119,121,150). Хистолошке карактеристике тумора у лимфном нодусу могу бити различите. Некада су то само мали фокуси ткива аденокарцинома, док је некад читав нодус испуњен тумором, без виталног ткива. Метастаза у лимфном нодусу може бити са израженом дезмоплазијом и довести до склерозе нодуса. (43,120).

Удаљене метастазе представљају хистопатолошки потврђене метастатске депозите у нерегионалним лимфним чворовима, удаљеним органима, висцералном перитонеуму и позитиван цитолошки налаз у асцити (43,61). Удаљене метастазе у јетри, у нашој испитиваној серији, су нађене код 8 (10,7%) испитаника. Сматра се да се туморско ткиво шири хематогеним путем у јетру, и у вријеме дијагностиковања тумора истовремено се нађу и метастазе у јетри у око 15%- 25% болесника. Код око 5% -50% болесника присутне су метастазе у плућима, а код око 5%- 8% болесника у мозгу. Метастазе у оваријум код жена су честе и то хематогеним или перитонеалним путем, а рјеђе се налазе метастазе у слезини надбубрегу и тестису(43,150)

У овом истраживању је показано да је експресија LEPР сигнификантно повезана са метастазама у лимфним чворовима и са удаљеним метастазама. Одсутна или умјерена



експресија LEPR постоји у највећем броју случајева лимфних чворова без метастатских депозита (86.1%). Са повећањем броја захваћених лимфних чворова повећава се и заступљеност умјерене и изражене експресије LEPR, тако да је изражена експресија LEPR присутна у 45.5% случајева у тумора код којих су метастатски депозити присутни у 1-3 лимфна чвора, у случајевима код којих се депозити присутни у 4-6 лимфних чворова изражена LEPR експресија је присутна у 50.0% случајева, док је у тумора код којих је депозитима захваћено више од 7 лимфних чворова изражена експресија LEPR присутна у 66,7% случајева. Код случајева са удаљеним метастазама експресија LEPR се значајно повећава (100%) и присутна је у свим случајевима са удаљеним метастазама.. Ови наши резултати су у складу са налазима бројних студија у којима је показана високо сигнификантна корелација експресије LEPR са метастазама у регионалним лимфним чворовима и удаљеним метастазама (28,179,279).

Значајан пораст експресије LEPR у болесника са метастатским формама колоректалног карцинома указује да је сензитивност активности LEPR важан индикатор метастаза у ткиву колоне и да би експресија рецептора лептина могла бити вриједан дијагностички параметар.

### **6.2.5.LEPR експресија, инвазија лимфатика, крвних судова и перинеурална инвазија**

Кад ткиво колоректалног карцинома пробије *lamini muscularis* мукозе, може инвадирати у лимфатике субмукозе, а први лимфни нодус који је захваћен тумором је обично онај који је најближи тумору. Инвазија лимфатика је верификована у више од половине (54.7%) наших испитаника са колоректалним карциномом, док инвазија лимфних судова није нађена у 45.3% пацијената, тако да нема значајне статистичке разлике између ове двије групе испитаника.Ови резултати су компатабилни са резултатима Campos-а и сар, који су у својој проспективној студији инвазију лимфатика регистровали у 53.3% оперисаних болесника (284).

Инвазија венских крвних судова је нађена у 12 (16.0%) наших испитаника, тако да је одсуство инвазије крвних судова сигнификантна појава. У литератури влада мишљење да је инвазија крвних судова чешћа код тумора који су метастазирали у лимфне нодусе, тумора

са већим хистолошким градусом, као и код тумора који су метастазирали у јетру. Сматра се да постоји повезаност између венске инвазије, присуства метастаза и преживљавања и истиче се да присуство екстрамуралне венске инвазије код тумора представља лошији прогностички параметар од присуства интрамуралне венске инвазије (285, 286).

Перинеурална инвазија је, у нашој студији, нађена код 14 (18.7%) испитаника. Постоји мишљење да се перинеурално ширење тумора јавља у око 14% до 32% колоректалних карцинома и да се чешће јавља код тумора са већим хистолошким градусом, као и код тумора који су у већем стадијуму болести. Такође влада мишљење да су локални рецидиви чешћи и да је 5-годишње преживљавање краће у болесника код којих је присутна перинеурална инвазија (287).

Умјерена и изражена LEPR експресија је нађена у 92.7% случајева са инвазијом лимфних судова, док је изостанак експресије LEPR верификован само у 7.3% испитаника из ове групе. Статистички значајна разлика је такође забиљежена и у LEPR експресији између случајева колоректалних карцинома без и са инвазијом крвних судова, при чему су умјерена и изражена експресија LEPR нађене у свим случајевима колоректалних карцинома са инвазијом крвних судова. Умјерена и изражена експресија LEPR је такође нађена и у свим случајевима карцинома са перинеуралном инвазијом. У прилог ових резултата говоре и запажања Ishikawa-е и сар да су венска и лимфатична инвазија најчешће удружене са високом експресијом LEPR (279). Сигнификантна повезаност лимфатичне, венске и перинеуралне инвазије са експресијом LEPR је запажена и од стране других аутора (28,179)

#### **6.2.6. LEPR експресија, лимфоцитни инфилтрат, дезмоплазија и некроза**

У највећем броју случајева (41.3%), лимфоцитни одговор на присуство тумора је био умјерено изражен. Слабо изражен лимфоцитни инфилтрат је нађен у 36.0%, док је наглашена лимфоцитна инфилтрација присутна у 21.3% колоректалних карцинома. Познато је да је лимфоцитни инфилтрат резултат имуног одговора домаћина и сматра се повољним прогностичким фактором. Изражена “*Crohn like*” лимфоцитна реакција са израженим лимфоидним агрегатима и проминентним герминативним центрима по неким студијама представља независни прогностички параметар (128). Недавно је утврђено да постоји

сигнификантна корелација густине лимфоцитног инфилтрата са Т стадијумом и одсуством васкуларне, перинеуралне и инвазије лимфатика, односно, сугерисано је да је присуство субпопулације Т лимфоцита удружено са мање инвазивним туморима и већом стопом преживљавања.(126. 288. 289. 290).

Умјерена и изражена експресија LEPR је нађена у 75% случајева са наглашеном лимфоцитном инфилтрацијом, у 83.9% случајева са умјерено израженом лимфоцитном реакцијом и у 70.3% случајева тумора са слабо израженим лимфоцитним инфилтратом. Наши резултати указују да није нађена сигнификантна повезаност LEPR експресије са густином лимфоцитног инфилтрата у колоректалном карциному.

У овој студији није забиљежен ниједан случај са наглашеном дезмопластичном реакцијом. Слабо изражена дезмоплазија је била присутна у 42.7% случајева, док дезмоплазија није нађена у 46.7% колоректалних карцинома. Дезмоплазија настаје умножавањем густог везивног ткива око канцерских ћелија, а стварају је активирани фибробласти и миофибробласти. Фибробласти и миофибробласти су стимулирани различитим факторима, као што је активирани трансформишућм фактор раста бета TGF  $\beta$ , фактор раста везивног ткива и хипоксија у микросредини (61). Активирани миофибробласти продукују екстрацелуларни матрикс који је богат клагеном типа III и IV за које се сматра да су одговорни за чврсту конзистенцију строме (134,135). Иако је показано да је повећана количина колагене строме индикатор веће туморске активности и агресије (131,291), ипак дефинитивна улога дезмоплазије још увијек није разјашњена, будући да је у неким студијама истакнуто да може имати протективну улогу и да је удружена са дужим преживљавањем (127,132,133).

Умјерена и изражена експресија LEPR је нађена у 50% случајева карцинома са умјерено израженом дезмоплазијом, у 71.9% случајева са слабо израженом дезмоплазијом и у 88.6% случајева колоректалних карцинома код којих није идентификована дезмоплазија. У овом истраживању није нађена статистички значајна корелација експресије LEPR са количином дезмоплазије у туморском ткиву. Ови резултати нису у сагласности са резултатима Leung и сар који су показали да лептин индукује синтезу TGF-бета у мезотелним ћелијама, преко LEPR и активације JAK-STAT сигналног трансдукционог пута (292). У прилог овога иду резултати Nakazawa-е и сар који показали сигнификантну повезаност експресије LEPR са експериментално индукованом перитонеалном фиброзом. Аутори сматрају да лептин,

преко свог функционалног рецептора индукује синтезу TGF- $\beta$ , који има важну улогу у прогресији фиброзе и изазива акумулацију колагена III у субмезотелијалним ареама (293).

Наглашена некроза је нађена у 4% случајева, умјерено изражена у 6.7% а слаба у чак 74.7% колоректалних карцинома. Некроза настаје као посљедица смањеног дотока кисеоника, дејства имуног одговора, а може настати и као последица цитостатске терапије (61). У литератури углавном постоји сагласност да је некроза повезана са лошом прогнозом колоректалног карцинома (136,137).

Умјерена и изражена експресија LEPR је верификована у свим (100%) случајевима тумора са израженом некрозом, у 60% случајева са умјерено израженом некрозом и у 44% случајева са слабо израженом туморском некрозом. Ови наши резултати се могу објаснити извештајима Koda-e и сар. о позитивној корелацији између експресије лептина, експресије LEPR и хипоксија-индуцибилног фактора 1 (HIF-1), који је индикатор ткивне хипоксије у туморском ткиву (280). У складу са овим, и у ранијим истраживањима је доказано да хипоксија индукује усходну регулацију лептина путем стимулишућег hypoxia response element (HRE). (270). Ови резултати јасно указују на укљученост ткивне хипоксије у процес стимулације експресије лептина и LEPR у туморском ткиву.

### **6.2.7. LEPR експресија и Astler-Coller стадијум тумора**

Да би се дефинисао стадијум тумора потребно је одредити дубину инвазије, захваћеност лимфних чворова, васкуларну инвазију и удаљене метастазе (43). Највећи број испитиваних тумора (41,3%) се налазио у C2 стадијуму, по Astler-Coller-овој класификацији, која се иначе рутински користи за стејцирање колоректалних карцинома у КЦЦГ. Као стадијум C2 су класификовани сви тумори код којих је примарни тумор захватио перитонеум, урастао у околне органе и код којих више од 4 лимфна чвора садрже туморске ћелије (106). По учесталости слиједе тумори у B2 стадијуму (33,3%) који су пробали мишићни омотач, субсерозу и инфилтришу перитонеално периколично ткиво (106). У B1 стадијуму је евидентирано 14,7% случајева, у D стадијуму 9,3%, док је најмања учесталост колоректалних карцинома уочена у C1 стадијуму (1,3%).

Експресија LEPR, у нашој студији, је у сигнификантној корелацији са стадијумом тумора по Astler-Coller-у, са значајном разликом између стадијума В у односу на стадијуме С2 и D. Наиме, умјерена и изражена експресија LEPR је нађена код 87,1% случајева у стадијуму С2 и у 100% случајева у стадијуму D, док је умјерена и изражена експресија LEPR у стадијуму В1 забиљежена у 63.6%, а у В2 стадијуму је нађена у 64% случајева. Значајан пораст (100%) експресије LEPR у D стадијуму указује да је експресија LEPR добар индикатор метастаза у колоректалном карциному. Истовремено сигнификантан пораст пролиферативне активности и неоангиогенезе идући од стадијума В (1 и 2) ка стадијуму С и D ствара могућност да се гранични праг преко вриједности нуклеарног пролиферативног антигена (Ki67) и маркера неоангиогенезе (CD105) прецизно одреди као маркер прогресије у метастатску болест.

Наши резултати сугеришу да је експресија LEPR високо зависна од стадијума тумора по Astler-Coller-овој класификацији, али наше резултате који се тичу ове корелације нисмо у могућности да упоредимо са другим налазима будући да у литератури нема података о вези експресије LEPR са стадијумом тумора по Astler Collet класификационом систему, највјероватније из разлога што се овај систем класификације колоректалног карцинома посљедњих година користи спорадично.

### **6.2.8. LEPR експресија , локализација и макроскопски тип тумора**

Резултати анализе у овој студији су показали да је највећи број (65.3%) колоректалних карцинома локализован у ректуму, затим у асцедентном колону (14.7%), у сигмоидном колону 12% , у цекуму 4%, док је 2.7% тумора било локализовано у десцедентном колону и свега 1.3% у трансверзалном колону. Учесталост локализације тумора у ректуму је високо статистички значајна у односу на остале локализације. Ректум је као научесталија локализација колоректалног карцинома истакнут и од стране бројних аутора (51,89, 179, 274).

Научесталији макроскопски тип тумора у овој студији је улцеро-инфилтративни који је верификован у 53.3% колоректалних карцинома. Иза њега слиједи инфилтративни тип (36.0%), а затим вегетантни тип (обухвата и улцеровегетантну и вегетантно-инфилтративну варијанту) који чини 26.7% случајева. Без обзира што је преодоминантно улцеро-инфилтративни тип најучесталија макроскопска варијанта тумора и у истраживању Khoo-a

и сар (294), ипак се чини да у већини извјештаја из литературе, за разлику од наших резултата, преовлађује вегетантни (егзофитични) тип колоректалног карцинома (43,51, 295. 296).

Умјерена и изражена експресија LEPR је верификована у 71.5% тумора локализованих у ректуму, у 77,8 % тумора локализованих у сигмоидном колону, а такође у високом проценту и у тумора локализованих у другим сегментима колоне. Умјерена и изражена експресија LEPR нађена је у 82.2% случајева улцеро-инфилтративног карцинома, у 74% инфилтративног и у 75% вегетантних колоректалних карцинома. Међутим, без обзира на висок ниво експресије LEPR није уочена статистички сигнификантна повезаност експресије LEPR са локализацијом и макроскопским типом колоректалног карцинома, што је у сагласности са резултатима већине аутора (28,266). Постоји, ипак, истраживање у коме је доказана сигнификантна повезаност експресије LEPR са ректалном локализацијом колоректалног карцинома (179).

### **6.2.9. LEPR експресија, пол и старост испитаника**

У складу са наводима из литературе (28,43,51,61,179) и у нашем истраживању није нађена статистички значајна разлика у дистрибуцији колоректалног карцинома, у односу на пол испитаника, мада је у нашој студији и у извјештајима већине истраживача колоректални карцином чешћи у мушкараца (45,60% ) него у жена (30,40%). Група румунских аутора је недавно извијестила о већој учесталости овог тумора у жена (274).

У односу на старост наших испитаника, запазили смо да учесталост колоректалног карцинома рапидно расте после 50.год живота, и то како у мушкараца, тако и у жена, што може да укаже на кумулативне ефекте етиопатогенетских фактора. Ни у дистрибуцији колоректалног карцинома у односу на старосне групе испитаника није нађена статистички значајна разлика, што је у сагласности са бројним литературним извјештајима (28,51,61,179).

Експресија (изражена и умјерена) LEPR је забиљежена у 77.8% мушкараца и у 76,6% испитаница женског пола. Експресија LEPR је у испитаника млађих од 60.год присутна у 75% случајева, док је у популацији старијој од 60 година експресија LEPR нађена у 78.5% случајева. Не постоји сигнификантна повезаност експресије лептин рецептора са

демографском карактеристикама пацијената (пол и старосна доб), што је у складу са резултатима Wang-а и сар и Uddin-а и сар који су испитивали експресију LEPR у колоректалном карциному у односу на демографске параметре (28,266). Са друге стране Koda и сар су верификовали статистички сигнификантно позитивну корелацију експресије LEPR са женским полом и испитаницима старијим од 60 година. (280).

### **6.3. Корелација LEPR експресије са муцин-хистохемијском експресијом**

#### **6.3.1 Хистохемијска експресија муцина**

Муцини представљају селективну молекуларну баријеру на епителној површини, обезбјеђују заштиту ћелијске површине и учествују у морфогенетској ћелијској трансдукцији (194). То су сложена макромолекулска једињења састављена од протеина и полисахарида везаних међу собом чврстим ковалентним везама. Протеинску компоненту чини полипептидни ланац, а преко 70% молекулске тежине чине полисахариди у форми угљенохидратних бочних ланаца који су припојени за протеинску компоненту.(34,194,195). Конституенти угљенохидратних бочних ланаца су Н-ацетилгалактозамин, Н-ацетилглюкозамин, галактоза, фруктоза и сијалинска киселина (34).

Муцини се, на основу хистохемијских карактеристика, дијеле на неутралне- фукомуцине (садрже хексозамин, галактозу и фруктозу), слабо кисјеле или сијаломуцине (садрже хексозамин и сијалинску киселину) и јако киселе сулфомуцине (садрже хексозамин, уронску киселину и сулфатну групу) (204). Хистохемијске технике за детекцију муцина се базирају на могућности детекције угљених хидрата или негативног наелектрисања. Муцини са кисјелим угљенохидратним групама су негативног наелектрисања па се везују са АВ (Alcian Blue) и НID (High Iron Diamine) реагенсима, што је разлог употребе ове комбиноване хистохемијске методе за квалитативну и семиквантитативну анализу кисјелих муцина (38).

Добро је познато да у покровном епителу здравог колона доминира секреција сулфатираних, јако киселих муцина, док су сијало-и фукомуцини присутни у трагу (297). У нетуморском ткиву наших испитаника је у свим случајевима верификованана хипер- и умјерена секреција сулфомуцина, док су слабо кисјели-сијаломуцини и неутрални-

фукомуцини присутни најчешће у трагу или сасвим недостају. Ова природна прерасподјела је разумљива уколико се има на уму значајан протективни ефекат хипервискозних сулфатираних муцина, чија улога је базирана на способности да инхибишу протеолизу и да захваљујући лубрификантном дејству штите слузницу колона. (36,297,298).

Из наших резултата је очигледно да у колоректалном аденокарциному настаје квалитативни и квантитативни поремећај секреције епителних муцина. Алтерације муцина се манифестују прије свега хипер и умјереном секрецијом сијаломуцина у високом проценту (88%) случајева, и сигнификантном редукцијом јако киселих сулфомуцина који су најчешће присутни у трагу, уколико их уопште има. Оваква муцинска секреција сигнификантно одступа од секреције епителних муцина у нетуморском ткиву, што сугерише да се упоредо са морфолошком дедиференцијацијом дешава и функционална дедиференцијација у туморском ткиву. Резултати муцин-хистохемијске анализе у колоректалном карциному, у овом истраживању, су у сагласности са запажањима многих аутора (38, 196.297,298).

Хиперсекреција сијаломуцина са редукцијом сулфомуцина је давно запажена и у „adenoma-carcinoma sequence“ у људи и у „аберантном крипталном фокусу“ (ACF) у пацова (299). Појава хиперсекреције сијаломуцина са редукцијом сулфомуцина у ACF, најраније познатој преканцерозној лезији, иде у прилог схватању да је аберантна секреција муцина рани догађај у колоректалној карциногенези. Постоји мишљење да муцини експримирани у колоректалном аденокарциному показују промјене у периферним угљенохидратним ланцима које укључују смањење О-ацетил-сиаличне киселине и смањење сулфатисања, али са друге стране постоји повећање количине сијаломуцина и удружених структура на муцинима који се могу понашати као лиганди за селективне, што повећава метастатски потенцијал канцерских ћелија колоректалног карцинома (298,300).

Алтерације у структури и/или количини муцина узрокују промјене како баријерне функције мукуса у цријевима, тако и поремећај сигналне трансдукције у коју су муцински молекули укључени. То покреће инфламаторне процесе у цријевној слузокожи, узрокујући развој инфламаторне болести цријева и предиспонирајући развој карцинома (301). Показано је да хронична инфламација у цријевима доводи до измјене експресије и гликозилације муцина, те је у литератури прихваћен став да управо аберантна и дерегулисана експресија муцина представља везу између инфламације и канцера. Прекомјерна експресија муцина



ћелијске површине, директно доводи до оштећења тијесних веза између епителних ћелија путем HER2 активације (302. 303).

Ове промјене у муцинској експресији или гликозилацији утичу на ћелијски раст, диференцијацију, трансформацију, адхезију, инвазивност и имунолошку контролу (35,36), па се из ових разлога муцини користе као дијагностички маркери преvasходно за карциноме гастроинтестиналног тракта. Секвенционирање муцинских гена пружа нова сазнања о биохемијским и биофизичким особинама муцина и о њиховој улози у патогенези карцинома.

### **6.3.2. LEPR експресија и хистохемијска експресија муцина**

Одавно је запажено да, осим неконтролисане пролиферације и неоангиогенезе, током колоректалне карциногенезе настају алтерације у структури и/или количини епителних муцина (36). Будући да о повезаности лептина са хистохемијском дисрегулацијом муцина нема података у литератури, један од циљева овог истраживања је и испитивање утицаја експресије лептин рецептора на хистохемијске алтерације муцина у колоректалном аденокарциному.

У овом истраживању је први пут показана значајна корелација између хистохемијске алтерације муцина и експресије LEPR у хуманом колоректалном аденокарциному. Из наших резултата је очигледно да секреција сијаломуцина прати тренд пораста експресије LEPR како у околном нетуморском ткиву, тако и у колоректалном аденокарциному, али је у случајевима колоректалног аденокарцинома јачег интензитета, тако да је код изражене експресије LEPR присутна експресија слабо кисјелих сијаломуцина са сигнификантно високом учесталашћу(84%). Истовремено се са повећањем експресије LEPR, смањује секреција сулфомуцина и то тако да у случајевима изражене експресије LEPR настаје потпуна асекреција јако киселих сулфомуцина, што се дешава у сигнификантно великом броју случајева колоректалног карцинома (60%). Такође је запажено да се са повећањем експресије LEPR повећава секреција и неутралних фукомуцина, али тако да је код изражене експресије LEPR у 60% случајева присутна секреција фукомуцина у трагу, а у свега 8% колоректалног карцинома је присутна умјерена секреција ових муцина. У литератури је одавно усаглашен став да постоји позитивна корелација између агресивног фенотипа колоректалног карцинома и секреције слабо кисјелих-сијаломуцина (36,38). Постоји

мишљење да се, у случају хиперсекреције и појачане експресије сијаломуцина, смањује адхезивност између малигних ћелија па је олакшана инфилтрација зида колоне и рано метастазирање (38).

У експерименту су Plaisancie и сар показали да је локално администриран лептин потентан мукусни секретар и да је способан да стимулише секрецију муцинских гликопротеина у колону, експресијом функционалног LEPR. Исти аутори су показали и да луминални лептин колонске мукозе, осим што активира муцинску секрецију помаже и реконструкцију интраћелијских резерви пехарстих ћелија. Такође су илустровали да лептин повећава продукцију главног муцина секретованог у цријевима - rMUC2 (39). У другој студији је показано да системска администрација великих доза лептина повећава гастричну мукусну секрецију (304). Са друге стране, у истраживању које се бавило утицајем лептина на мукусну секрецију сублингалних пљувачних жлијезда је показано да лептин превентивно смањује синтезу муцина индуковану липополисахаридима *P gingivalis*(305).

Сматра се да је стимулација мукусне секреције у одговору на луминалну или системску администрацију лептина у корелацији са експресијом LEPR и на апикалној и на базалној страни мембране колонских ћелија. Експресија LEPR на апикалној страни колоноцита иде у прилог луминалног дејства лептина (306). Поред секретарног ефекта, све више има доказа у литератури да лептин има и анти-инфламаторне, протективне ефекте, јер је показано да лептин редукује тежину колитиса изазваног сирћетном киселином у пацова (307, 308). Још увијек није познато на који начин лептин стимулише секрецију муцина, али Plaisancie и сар и El Homsі и сар. сугеришу да функционални LEPR дјелује кроз активацију PKC, PI3K и MAPK сигналних путева (39,188).

#### **6.4. Корелација експресије лептин рецептора и експресије нуклеарног пролиферативног антигена Ki67**

Имунохистохемијско испитивање нуклеарног пролиферативног антигена Ki67 је опште прихваћена метода у хистопатолошкој дијагностици тумора из разлога што се овај маркер експримира у читавој пролиферативној фази тумора, а осим дијагностичког, експресија антигена Ki67 има и прогностички значај (309).

Испитивањем експресије нуклеарног пролиферативног антигена (Ki67), у овом истраживању добијене су апсолутне величине густине позитивних ћелија по јединици површине. Из апсолутно одређених вриједности пролиферативног антигена Ki67 у односу на одступање од медијане добијен је индекс пролиферације. Примјеном ROC (receiver operating characteristic) анализе одређене су граничне вриједности нуклеарног пролиферативног антигена (Ki67), изнад којих се, са високом поузданошћу, може очекивати прогресија колоректалног карцинома у метастатску болест. За наше испитанике гранична вриједност за нуклеарни пролиферативни антиген износи 3045.45 Ki67 позитивних ћелија /мм<sup>2</sup>.

У овом истраживању је потврђена значајна повезаност степена пролиферације, изражена преко индекса пролиферације, са експресијом LEPR. У високо сигнификантном броју случајева (94.1%), одсуство експресије LEPR је у корелацији са ниским индексом пролиферације. Истовремено, високом индексу пролиферације одговара значајних 92% случајева са израженом експресијом LEPR. Такође смо уочили да је умјерена експресија LEPR удружена са ниским индексом пролиферације у 63.6% случајева, а са високим пролиферативним индексом у 36,4% случајева, али између ових учесталости нема статистички значајне разлике.

Без обзира на спорадичне извјештаје да не постоји веза између плазма растворљивог лептин рецептора и ризика за настанак колоректалног карцинома (310), ипак су бројне студије показале везу између серумског лептина и ризика за настанак карцинома епителне хистогенезе, укључујући и колоректални карцином (172, 311, 312).

Независно од контрадикторних извештаја, у литератури је усаглашен став да лептин има стимулативне ефекте на пролиферацију малигнућ ћелија тумора различите локализације (7,18,21,26,29-31). Резултати који се тичу повезаности експресије LEPR са експресијом нуклеарног пролиферативног антигена, у овом истраживању, су у складу са том сагласношћу.

Показано је да лептин *in vitro* стимулише пролиферацију хуманих ћелија колоректалног карцинома, а поред тога је показано да лептин промовише ћелијску миграцију и ангиогенезу, која је неопходна за инвазију и метастазирање тумора (32,33, 313).

У култури ткива је доказано да лептин преко својих рецептора активира различите сигналне путеве. У култури ћелија карцинома колоне показано је да лептин стимулише

пролиферацију преко R42/44 MAPK сигналног пута и индукује инвазивност преко JAK /PI3K сигналног пута (177,182,183). За PI3K/AKT сигнални пут се зна да регулише више ћелијских процеса укључујући ћелијску пролиферацију, раст и покретљивост (188).

## **6.5.Корелација експресије LEPR и експресије Ендоглина (CD105)**

Познато је да често,само на основу конвенционалних хистопатолошких параметара (99,100), није могуће предвидјети исход колоректалног карцинома, па се користе и други, допунски прогностички параметри. Веома важна етапа неопластичног процеса је туморска ангиогенеза, која подразумева формирање нових перитуморских и интратуморских крвних судова (214).Неоваскуларизација је неопходна за туморски раст и метастазирање, а за процјену индекса микроваскуларне густине су у употреби различити маркери (220,314 ).

У литератури постоје бројни извјештаји који истичу предикторну вриједност микроваскуларне густине у различитим малигним туморима (216,220,222), али кад је у питању улога ангиогенезе у колоректалном карциному, резултати истраживања из различитих студија су контрадикторни. Наиме, док Bossi и сар и Pietra и сар (315,316) негирају предикторни значај ангиогенезе, дотле Saad и сар. користећи Ендоглин истичу значајну корелацију повећане микроваскуларне густине са рецидивом, метастазама и преживљавањем (222). Ови конфликтни резултати се могу објаснити прије свега коришћењем различитих маркера, а затим и различитих имунохистохемијских техника. Наиме у истраживању Bossi-а и сар. и Pietra и сар. су коришћени панендотелни маркери CD34, CD31 и von Willebrand -ов фактор који показују изразиту експресију и у нормалним крвним судовима, и нису строго специфични за крвне судове јер могу обојити и лимфатике (220, 317). Ендоглин као маркер ангиогенезе има одређене предности, прије свега јер се ендоглинско антитијело превасходно везује за активирани ендотелне ћелије које учествују у туморској ангиогенези и везује се само за око 20% не-неопластичних крвних судова, а такође се не везује ни за запаљенске и стромалне ћелије (221-223).

У овом истраживању је за испитивање микроваскуларне густине у туморском ткиву, по јединици површине такође коришћен Ендоглин (CD105).Изражена експресија Ендоглина је присутна у туморској и перитуморској микроваскулатури у свим случајевима колоректалног карцинома, док је његова експресија слаба или негативна у нетуморском ткиву у сусједству карцинома.Ови наши резултати су у сагласности са резултатима Saad-а и сар. и Minhajat-а и сар (221,222). Примјеном ROC анализе су одређене граничне вриједности ангиогенезе (CD105), изнад којих се, са високом поузданошћу може очекивати прогресија у метастатску болест. За наше испитанике гранична вриједност за ангиогенезу износи 606,72 CD105 позитивних ћелија /мм<sup>2</sup>.

Задатак ове студије је и испитивање утицаја експресије LEPR на неоангиогенезу, изражену преко микроваскуларне густине, у колоректалном карциному и сусједном нетуморском ткиву. Резултати овог истраживања указују да је висок индекс неоангиогенезе чак у 92.0% случајева повезан са израженом експресијом лептин рецептора, док је низак индекс ангиогенезе у сигнификантних 88,2% повезан са одсуством експресије лептин рецептора.У случајевима умјерене експресије лептин рецептора чешћи је низак индекс ангиогенезе (66,7%) од високог (33,3%). Ови наши резултати су у досљедној корелацији са бројним студијама, у којима се истиче да лептин учествује у ширењу тумора и стимулацијом ангиогенезе, попут VEGF-а (7,26,31,32,170,172).

## **6.6.Узајамни односи испитиваних варијабли**

Компаративна анализа параметара, из ове студије, указује на високо значајне везе у зајамним односима између испитиваних варијабли. Корелационом анализом је показана права мјера њихове повезаности, гдје је значајност везе доказана значајношћу коефицијента корелације. Величина коефицијента корелације изражава јачину те везе.

Експресија LEPR је високо значајним и високо позитивним коефицијентима корелације повезана са индексом експресије нуклеарног пролиферативног антигена (proIDX) и индексом неоангиогенезе (mvdIDX). Осим индекса пролиферације и неоангиогенезе, високо значајним коефицијентима корелације са LEPR експресијом су повезане и апсолутне вриједности експресије Ki67 и Ендоглина (CD105),што значи да повишеној експресији

LEPR одговара пораст пролиферативне активности и неоангиогенезе у колоректалном карциному.

Распрострањена гојазност и забрињавајућа инциденца колоректалног карцинома су, у прошлој деценији, индуковале скоро фанатична истраживања везана за лептин и LEPR. У прилог извјештаја бројних клиничких студија који се тичу повезаности експресије LEPR са пролиферативном активношћу канцерских ћелија и неоангиогенезом у колоректалном карциному говоре и наши резултати (28,33,179,183,266,313). У култури ћелија карцинома колона је показано да лептин стимулише пролиферацију преко P42/444 MAPK сигналног пута и индукује инвазивност преко JAK/PI3K сигналног пута (177,182,183). Сматра се да лептин учествује у ширењу тумора стимулацијом инвазије и миграције малигних ћелија и подстицајем ангиогенетске активности, попут васкуларног ендотелијалног фактора раста (VEGF-a), тако да му се приписује и улога у инвазији и метастазирању тумора (7,26,31,32,170,172).

Друга по значају је веза између експресије LEPR и хистохемијске експресије слабо кисјелих сијаломуцина. Повећање експресије LEPR је високо значајним позитивним коефицијентом корелације повезано са хиперсекрецијом сијаломуцина. Продукција сијаломуцина је високо значајним, позитивним коефицијентом корелације повезана са пролиферацијом и неоангиогенезом. Експресија LEPR је умјерено високим и високо статистички значајним коефицијентом корелације повезана са секрецијом неутралних фукомуцина. Фукомуцини су у односу на сијаломуцине слабијим, али статистички значајним, коефицијентом корелације у вези са пролиферацијом и неоангиогенезом. Такође слабијим од сијаломуцина и негативним, али статистички значајним коефицијентом корелације је LEPR експресија у вези са секрецијом јако кисјелих сулфомуцина. Негативан коефицијент корелације указује да је повећање експресије LEPR праћено падом секреције јако кисјелих сулфомуцина. Секреција муцина је у доброј и значајној узајамној повезаности. Једино је секреција сулфомуцина у негативној корелацији према сијало и фукомуцинима. Осим тога секреција сулфомуцина је значајним, негативним коефицијентом корелације повезана са експресијом LEPR, пролиферативним индексом (proIDX), индексом неоангиогенезе (mvdIDX) и инвазијом лимфних судова.

О повезаности експресије LEPR са хистохемијском експресијом муцина у колоректалном карциному нема података у литератури, али се зна да локално

администриран лептин пацовима у физиолошким условима, стимулише секрецију муцинских гликопротеина у колону, а показано је и да луминални лептин може да активира муцинску секрецију(39). Такође се зна да алтерације у структури муцина узрокују промјене како баријерне функције мукуса у цријевима, тако и поремећај сигналне трансдукције у коју су муцински молекули укључени (318).Показано је да у случају хиперсекреције сијаломуцина долази до смањене адхезивности између малигнух ћелија, што олакшава инфилтрацију зида, инвазију и метастазирање (38,298). Са друге стране хипосекреција/асекреција сулфомуцина, у колоректалном карциному, такође утиче на алтерацију мукусне баријере, будући да сулфомуцини у колоректуму имају прије свега лумбрификантну улогу (298).

Умјерено високим и статистички високо значајним коефицијентима корелације је повезана експресија LEPR са стадијумом тумора по Astler-Coller класификацији, са метастатски захваћеним лимфним чворовима, перинеуралном инвазијом и удаљеним метастазама.

Astler-Coller стадијум тумора је у доброј и сигнификантној вези са експресијом LEPR, али је присутна још јача позитивна повезаност ових стадијума са индексом пролиферације и неоангиогенезе. Врло високим и значајним коефицијентом корелације Astler-Coller стадијум је повезан са патолошким стадијумом тумора (pT), са захваћеношћу лимфних чворова,са лимфном,периваскуларном, перинеуралном инвазијом и удаљеним метастазама. Фукомуцини и сијаломуцини су у доброј позитивној, а сулфомуцини у негативној корелацији са Astler-Coller стадијумом колоректалног карцинома.

У литератури је показана сигнификантна повезаност експресије LEPR са стадијумом тумора по TNM класификационом систему (28,179). Hashimoto и сар су саопштили и статистички високо значајну повезаност стадијума колоректалног карцинома са индексом пролиферације (319), Liu и сар су показали позитивну корелацију микроваскуларне густине са стадијумом колоректалног карцинома по Dukes-у (320), а Zhou и сар. су потврдили сигнификантну корелацију микроваскуларне густине са стадијумом тумора по TNM систему класификације (321).

Удаљене метастазе су, осим са стадијумом по Astler-Coller-у, у најбољој корелацији са периваскуларном и перинеуралном инвазијом. Добрим и статистички значајним коефицијентом корелације удаљене метастазе су повезане са индексом пролиферације и

неоангиогенезе. За нијансу слабија, али статистички значајна веза постоји између удаљених метастаза и експресије LEPR.

Сигнификантна корелација експресије LEPR са метастазама у регионалним лимфним чворовима и удаљеним метастазама је показана и од стране других аутора (28,179, 322).

Статистички значајним, али slabим и негативним коефицијентом корелације експресија LEPR је повезана са дезмоплазијом., тако да је повећање експресије LEPR праћено слабљењем или одсуством дезмоплазије. Такође слаба , али значајна негативна корелација постоји између дезмоплазије и стадијума колоректалног карцинома по Astler Coller класификацији.

Хистолошки градус тумора је због напред поменутих ограничења (већина тумора припадају умјерено диферентованом типу-HG2), у корелационој анализи показао значајну повезаност једино са пролиферативним индексом.

\*

\*

\*

Лептин дјелује као мултифункционални цитокин у различитим ткивима и укључен је у многе ћелијске функције у читавом организму. Код људи је висок индекс тјелесне масе директно повезан са повишеним нивоима лептина (20,23).Лептин поред своје неуроендокрине функције, може да дјелује као фактор промоције раста, доводећи тиме до активације различитих сигналних путева за преживљавање туморских ћелија (28, 183,266,313,323). Бројне *in vitro* и *in vivo* студије су показале да лептин може аберантно активирати велики број ћелијских сигналних молекула, као што су ЈАК киназа, PI3-киназа/АКТ и МАП киназа (185,188).

Постоји значајна повезаност између експресије лептинских рецептора и различитих клиничких параметара важних за туморски раст и прогнозу (26,32,266,280,313), што указује



на могућу улогу лептина као критичног фактора за преживљавање, развој и напредовање одређених карцинома као што је колоректални.

И на крају, у овом истраживању је потврђено да лептин/лептин рецептор дјелује као фактор промоције пролиферативне активности и неоангиогенезе.

Оригиналност ове студије се огледа о томе што је први пут показана значајна повезаност експресије лептин рецептора са муцин-хистохемијским абериацијама у колоректалном карциному .

Даље студије су неопходне да прецизно процијене значај лептина/лептин рецептора као нових потенцијалних мета у превенцији и/или третману колоректалног карцинома.

## 7.3 А К Љ У Ч А К

Након спроведеног истраживања и на основу добијених резултата извели смо следеће закључке:

1. Инциденца колоректалног аденокарцинома није повезана са узрастом и полом испитаника
2. Најчесталија локализација колоректалног аденокарцинома је ректум и најчешће се презентује као улцероинфилтративна промјена.
3. Највећи број колоректалних аденокарцинома је дијагностикован као умјерено диферентован (HG2) тип и класификован у T3 стадијум.
4. Лимфогене метастазе су нађене у више од половине испитаника, што корелира са налазом инвазије лимфатика, док су метастазе у јетри нађене знатно рјеђе- код сваког десетог пацијента, што је у корелацији са венском ангиоинвазијом.
5. Највећи број испитиваних колоректалних аденокарцинома је без или са слабо израженом дезмопластичном реакцијом, док је слабо изражена некроза присутна у 3/4 испитиваних тумора.
6. Највећи број испитиваних тумора се налазио у C2 стадијуму, по Astler-Coller-овој класификацији
7. Експресија LEPR је верификована у сигнификантном броју случајева (у преко 3/4 испитиваних колоректалних аденокарцинома)
8. Умјерена и изражена секреција сијаломуцина у колоректалном аденокарциному је нађена у преко 4/5 испитаника, док се сијаломуцини у нетуморској мукози колоне и ректума најчешће продукују у трагу.
9. У највећем броју колоректалних аденокарцинома је присутна асекреција фукомуцина, док је секреција сулфомуцина најчешће присутна у трагу.
10. Хиперсекреција сијаломуцина сигнификантно корелира са повећањем експресије LEPR у колоректалном аденокарциному
11. Експресија LEPR значајно позитивно корелира са пролиферативном активношћу и неоангиогенезом у колоректалном аденокарциному
12. Експресија LEPR је сигнификантно повезана са метастатским потенцијалом колоректалног аденокарцинома

## ОПШТИ ЗАКЉУЧАК

Пораст експресије LEPR је праћен повећањем пролиферативне активности, повећаном неоангиогенезом, аберацијама у муцинској продукцији и порастом метастатског потенцијала колоректалног аденокарцинома

## 8.ЛИТЕРАТУРА

1. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics.CA Cancer J Clin. 2011; 61(2):69-90.
2. Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2012. CA Cancer J Clin. 2012; 62(1):10-29.
3. Ferlay J, ShinHRBray F, Forman D, Mathers c and Parkin DM: Cancer Incidence and Mortality Worldwide. IARC Cancer Base, Globocan 2008, No 10,pp 1027-1056, IARC Lyon.
4. Mihajlović J, Pechlivanoglou P, Miladinov-Mikov M, Zivković S, Postma MJ. Cancer incidence and mortality in Serbia 1999-2009.BMC Cancer. 2013,15;13:18
5. Lawrence PF, Richard M. Bell RM, Merrill T. Dayton MT(eds): Essentials of General Surgery Lippincott Williams &Wilkins, 2012, pp 316-318.
6. van Duijnhoven FJ, Bueno-De-Mesquita HB, Ferrari P, Jenab M, Boshuizen HC, Ros MM et al: Fruit, vegetables, and colorectal cancer risk: the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. Am J Clin Nutr. 2009;89(5):1441-52.
7. Zhao L, Shen ZX, Luo HS, Shen L. Possible involvement of leptin and leptin receptor in developing gastric adenocarcinoma.World J Gastroenterol. 2005; 11(48):7666-70.
8. Pischon T, Nöthlings U, Boeing H. Obesity and cancer. Proc Nutr Soc. 2008; 67(2):128-45.
9. Dai Z, Xu YC, Niu L. Obesity and colorectal cancer risk: a meta-analysis of cohort studies.World J Gastroenterol. 2007; 13(31):4199-206.
10. Siegel EM, Ulrich CM, Poole EM, Holmes RS, Jacobsen PB, Shibata D. The effects of obesity and obesity-related conditions on colorectal cancer prognosis.Cancer Control. 2010; 17(1):52-7.
11. Bardou M, Barkun AN, Martel M. Obesity and colorectal cancer.Gut. 2013; 62(6):933-47.
12. Boeing H. Obesity and cancer--the update 2013.Best Pract Res Clin Endocrinol Metab. 2013; 27(2):219-27.
13. Auwerx J, Staels B. Leptin.Lancet. 1998; 351(9104):737-42.

14. Hausman GJ, Barb CR. Adipose tissue and the reproductive axis: biological aspects. *Endocr Dev.* 2010; 19:31-44.
15. Bado A, Levasseur S, Attoub S, Kermorgant S, Laigneau JP, Bortoluzzi MN, Moizo L, Lehy T, Guerre-Millo M, Le Marchand-Brustel Y, Lewin MJ. The stomach is a source of leptin. *Nature.* 1998; 394(6695):790-3.
16. Vernooij JH, Ubags ND, Brusselle GG, Tavernier J, Suratt BT, Joos GF, Wouters EF, Bracke KR. Leptin as regulator of pulmonary immune responses: involvement in respiratory diseases. *Pulm Pharmacol Ther.* 2013; 26(4):464-72.
17. Pérez-Pérez A, Maymó J, Gambino Y, Guadix P, Dueñas JL, Varone C, Sánchez-Margalet V. Insulin enhances leptin expression in human trophoblastic cells. *Biol Reprod.* 2013; 89(1):20
18. Sheffield L. Malignant transformation of mammary epithelial cells increases expression of leptin and leptin receptor. *Endocr Res.* 2008;33(3):111-8.
19. Figlewicz DP, Evans SB, Murphy J, Hoen M, Baskin DG. Expression of receptors for insulin and leptin in the ventral tegmental area/substantia nigra (VTA/SN) of the rat. *Brain Res.* 2003; 964:107–15
20. Yannakoulia M, Yiannakouris N, Blüher S, Matalas AL, Klimis-Zacas D, Mantzoros CS. Body fat mass and macronutrient intake in relation to circulating soluble leptin receptor, free leptin index, adiponectin, and resistin concentrations in healthy humans. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003; 88(4):1730-6.
21. Hoda MR, Popken G: Mitogenic and anti-apoptotic actions of adipocyte-derived hormone leptin in prostate cancer cells. *BJU Int.* 2008; 102(3):383-8
22. Méndez-López LF, Dávila-Rodríguez MI, Zavala-Pompa A, Torres-López E, González-Martínez BE, López-Cabanillas-Lomelí M. Expression of leptin receptor in endometrial biopsies of endometrial and ovarian cancer patients. *Biomed Rep.* 2013; 1(4):659-663.
23. Tutino V, Notarnicola M, Guerra V, Lorusso D, Caruso MG. Increased soluble leptin receptor levels are associated with advanced tumor stage in colorectal cancer patients. *Anticancer Res.* 2011; 31(10):3381-3.
24. Myers MG Jr: Leptin receptor signaling and the regulation of mammalian physiology. *Recent Progress in Hormone Research* 2004; 59 287–304.

25. Tu H, Pan W, Feucht L, Kastin AJ. Convergent trafficking pattern of leptin after endocytosis mediated by ObRa-ObRd. *J Cell Physiol.* 2007; 212(1):215-22.
26. Yoon KW, Park SY, Kim JY, Lee SM, Park CH, Cho SB, Lee WS, Joo YE, Lee JH, Kim HS, Choi SK, Rew JS. Leptin-induced adhesion and invasion in colorectal cancer cell lines. *Oncol Rep.* 2014; 31(6):2493-8.
27. Uddin S, Hussain AR, Khan OS, Al-Kuraya KS. Role of dysregulated expression of leptin and leptin receptors in colorectal carcinogenesis. *Tumour Biol.* 2014; 35(2):871-9.
28. Wang D, Chen J, Chen H, Duan Z, Xu Q, Wei M, Wang L, Zhong M. Leptin regulates proliferation and apoptosis of colorectal carcinoma through PI3K/Akt/mTOR signalling pathway. *J Biosci.* 2012; 37(1):91-101.
29. Frankenberry KA, Somasundar P, McFadden DW, Vona-Davis LC. Leptin induces cell migration and the expression of growth factors in human prostate cancer cells. *Am J Surg.* 2004 ;188(5):560-5
30. Jeong YJ, Bong JG, Park SH, Choi JH, Oh HK. Expression of leptin, leptin receptor, adiponectin, and adiponectin receptor in ductal carcinoma in situ and invasive breast cancer. *J Breast Cancer.* 2011;(14(2):96-103.
31. Sharma D, Saxena NK, Vertino PM, Anania FA. Leptin promotes the proliferative response and invasiveness in human endometrial cancer cells by activating multiple signal-transduction pathways. *Endocr Relat Cancer.* 2006;13(2):629-40.
32. Ratke J, Entschladen F, Niggemann B, Zänker KS, Lang K. Leptin stimulates the migration of colon carcinoma cells by multiple signaling pathways. *Endocr Relat Cancer.* 2010; 17(1):179-89.
33. Liu H, Wan D, Pan Z, Cao L, Wu X, Lu Z, Kang T. Expression and biological significance of leptin, leptin receptor, VEGF, and CD34 in colorectal carcinoma. *Cell Biochem Biophys.* 2011; 60(3):241-4.
34. Jass JR, Robertson AM. Colorectal mucin histochemistry in health and disease: A critical review. *Pathol Int* 1994; 44:487–504.
35. Williams SJ, McGuckin MA, Gotley DC, *et al.* Two novel mucin genes down-regulated in colorectal cancer identified by differential display. *Cancer Res* 1999;59:4083–9.
36. Jass JR, Walsh MD. Altered mucin expression in the gastrointestinal tract: a review. *J Cell Mol Med* 2001; 5:327-51

37. Agawa S, Jass JR. Sialic acid histochemistry and the adenoma-carcinoma sequence in colorectum. *J Clin Pathol.*1990 ;43(7):527-32.
38. Saez C, Japon MA, Poveda MA, Segura DI: Mucinous (colloid) adenocarcinomas secrete distinct O-acylated forms of sialomucins: a histochemical study of gastric, colorectal and breast adenocarcinomas. *Histopathology* 2001; 39:554-560.
39. Plaisancie P, Ducroc R, El Homsy M, Tsocas A, Guilmeau S, Zoghbi S, Thibaudeau O, Bado A. Luminal leptin activates mucin-secreting goblet cells in the large bowel. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.*2006; 290(4):G805-12
40. Chang MS, Byeon SJ, Yoon SO, Kim BH, Lee HS, Kang GH, Kim WH, Park KJ. Leptin, MUC2 and mTOR in appendiceal mucinous neoplasms. *Pathobiology.* 2012;79(1):45-53
41. Šljivić B. Sistematska i topografska anatomija -abdomen i karlica 3 izdanje Naučna knjiga, Beograd 1979
42. Irving MH, Catchpole B. ABC of colorectal diseases. Anatomy and physiology of the colon, rectum, and anus. *BMJ.* 1992;;304:1106-8.
43. Rosai J: Colon. In : Rosai and Ackerman's Surgical Pathology (9<sup>th</sup>Edn), Elsevier, 2004, pp776-855
44. Sakorafas GH, Zouros E, Peros G. Applied vascular anatomy of the colon and rectum: clinical implications for the surgical oncologist. *Surg Oncol.* 2006;15(4):243-55.
45. Ignjatovic D, Sund S, Stimec B, Bergamaschi R. Vascular relationships in right colectomy for cancer: clinical implications. *Tech Coloproctol.* 2007;11(3):247- 50
46. Fujita S, Yamamoto S, Akasu T, Moriya Y. Lateral pelvic lymph node dissection for advanced lower rectal cancer. *Br J Surg.* 2003;90(12):1580-5.
47. Mahmoud N, Rombeau J, Ross HM, Fry RD. Colon and Rectum. In: Townsend CM, Beauchamp RD, Evers BM, Mattox KL, editors. *Sabiston Textbook of Surgery.* 17th ed. International edition: Elsevier; 2004.
48. Dahl J and Greenson JK: Colon . In Mills SE (ed): *Histology for Pathologists.*(3rdEdn), Lippincott Williams & Wilkins, 2007, pp 627-648
49. Ponz de Leon M, Di Gregorio C. Pathology of colorectal cancer. *Dig Liver Dis.* 2001 ;33(4):372-88
50. Šegović R: Regulacija gastrointestinalne funkcije, U: Ganong WF. *Pregled medicinske fiziologije.* 13-to prevedeno izdanje. Savremena administracija, Beograd, 1991, str.481-486

51. Hamilton SR, Bosman FT, Lyas M, Morreau H, Nakamura SJ, Riboli E, Sobin LH: Carcinoma of the colon and rectum. In: Bosman FT, Carniero F, Hruban RH, Theise D (eds): WHO Classification of Tumours Of the Digestive System (4th Edn), IARC, Lyon 2010, pp 132-146
52. Ilić M: Maligni tumori debelog creva: U: M Ilić (ed): Maligni tumori-odabrana poglavlja. Medicinski fakultet Univerziteta u Kragujevcu, Kragijevac 2012, str 54-59.
53. Parkin DM : Global cancer statistics. CA J Clin 2005;55:74-108
54. Compton C, Fenoglio-Preiser CM, Pettigrew N, Fielding LP. American Joint Committee on Cancer Prognostic Factors Consensus Conference: Colorectal Working Group. Cancer. 2000 1;88(7):1739-57.
55. Amini AQ, Samo KA, Memon AS. Colorectal cancer in younger population: our experience. J Pak Med Assoc. 2013;63(10):1275-7.
56. Siegel R, Ward E, Brawley O, Jemal A, Cancer statistics, 2011: the impact of eliminating socioeconomic and racial disparities on premature cancer deaths. CA Cancer J Clin, 2011, 61(4):212–236.
57. Center MM, Jemal A, Ward E, International trends in colo-rectal cancer incidence rates, Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2009, 18(6):1688–1694.
58. Miller PE, Lesko SM, Muscat JE, Lazarus P, Hartman TJ. Dietary patterns and colorectal adenoma and cancer risk: a review of the epidemiological evidence. Nutr Cancer. May 2010;62(4):413-424.
59. Janković S: Maligni tumori debelog creva-epidemiološki pokazatelji. U: Ilić M (ed): Maligni tumori-odabrana poglavlja, Medicinski fakultet Univerziteta u Kragujevcu, Kragijevac 2012, str 310-346.
60. Botteri E, Iodice S, Bagnardi V, Raimondi S, Lowenfels AB, Maisonneuve P. Smoking and colorectal cancer: a meta-analysis. JAMA. 2008;300(23):2765-78.
61. Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Mitchell RN: Robbinsove osnove patologije. 8 prevedeno izdanje, Datastatus, Beograd, 2010 str.619-625
62. Ciarrocchi A, Amicucci G. Sporadic carcinoma of the colon-rectum in young patients: a distinct disease? A critical review J Gastrointest Cancer. 2013;44(3):264-9.
63. Neuman HB, Weiss JM, Levenson G, O'Connor ES, Greenblatt DY, Loconte NK, Greenberg CC, Smith MA. Predictors of short-term postoperative survival after elective



- colectomy in colon cancer patients  $\geq$  80 years of age. *Ann Surg Oncol*. 2013;20(5):1427-35.
64. Ahnen DJ, Wade SW, Jones WF, Sifri R, Mendoza Silveiras J, Greenamyre J, Guiffre S, Axilbund J, Spiegel A, You YN. The increasing incidence of young-onset colorectal cancer: a call to action. *Mayo Clin Proc*. 2014;89(2):216-24.
65. Vlajinac H., Šipetić–Grujičić S, Janković S, et al. Burden of cancer in Serbia. *CMJ* 2006; 47:134– 171.
66. Gala M, Chung DC. Hereditary colon cancer syndromes. *Semin Oncol*. 2011;38(4):490-9.
67. Skomorowski M, Taxier M, Wise W Jr. Turcot syndrome type 2: medulloblastoma with multiple colorectal adenomas. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2012;10(10):A24.
68. McGarrity TJ, Amos C. Peutz-Jeghers syndrome: clinicopathology and molecular alterations. *Cell Mol Life Sci*. 2006;63(18):2135-44.
69. Ryan S, Jenkins MA, Win AK. Risk of prostate cancer in Lynch syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2014;23(3):437-49.
70. Kaneko K, Kurahashi T, Makino R, Konishi K, Ito H, Katagiri A, Kumekawa Y, Hirayama Y, Yoneyama K, Kushima M, Kusano M, Tajiri H, Rembacken BJ, Mitamura K, Imawari M. Pathological features and genetic alterations in colorectal carcinomas with characteristics of nonpolypoid growth. *Br J Cancer*. 2004; 91(2):312-8.
71. Tsuda M, Okamoto K, Muguruma N, Sannomiya K, Nakagawa T, Miyamoto H, Kitamura S, Goji T, Kimura T, Okahisa T, Izumi K, Takayama T. Suppressive effect of RAS inhibitor manumycin A on aberrant crypt foci formation in the azoxymethane-induced rat colorectal carcinogenesis model. *J Gastroenterol Hepatol*. 2013;28(10):1616-23.
72. Chan AO, Broaddus RR, Houlihan PS, Issa JP, Hamilton SR, Rashid A. CpG island methylation in aberrant crypt foci of the colorectum. *Am J Pathol*. 2002;160(5):1823-30.
73. Kattentidt-Mouravieva AA, den Heijer M, van Kessel I, Wagner A. How harmful is genetic testing for familial adenomatous polyposis (FAP) in young children; the parents' experience. *Fam Cancer*. 2014;13(3):391-9.
74. Rosty C, Buchanan DD, Walsh MD, Pearson SA, Pavluk E, Walters RJ, Clendenning M, Spring KJ, Jenkins MA, Win AK, Hopper JL, Sweet K, Frankel WL, Aronson M, Gallinger S, Goldblatt J, Woodall S, Arnold J, Walker NI, Jass JR, Parry S, Young JP. Phenotype and

- polyp landscape in serrated polyposis syndrome: a series of 100 patients from genetics clinics. *Am J Surg Pathol*. 2012;36(6):876-82
75. Takahashi H, Hosono K, Endo H, Nakajima A. Colon epithelial proliferation and carcinogenesis in diet-induced obesity. *J Gastroenterol Hepatol*. 2013;28 Suppl 4:41-7
  76. Esa F, Ngah WZ, Jamal AR, Mohd Yusof YA. Inhibition of beta-catenin and KRAS expressions by Piper betle in azoxymethane-induced colon cancer of male Fischer 344 rats. *Anal Quant Cytol Histol*. 2013;35(6):324-34.
  77. Cheng L, Lai MD. Aberrant crypt foci as microscopic precursors of colorectal cancer. *World J Gastroenterol*. 2003;9(12):2642-9.
  78. Suehiro Y, Hinoda Y. Genetic and epigenetic changes in aberrant crypt foci and serrated polyps. *Cancer Sci*. 2008;99(6):1071-6.
  79. Tokarz P, Błasiak J. Role of DNA methylation in colorectal cancer. *Postepy Biochem*. 2013;59(3):267-79
  80. Vymetalkova VP, Slyskova J, Korenkova V, Bielik L, Langerova L, Prochazka P, Rejhova A, Schwarzova L, Pardini B, Naccarati A, Vodicka P. Molecular characteristics of mismatch repair genes in sporadic colorectal tumors in Czech patients. *BMC Med Genet*. 2014;15:17.
  81. Li Z, Meng J, Xu TJ, Qin XY, Zhou XD. Sodium selenite induces apoptosis in colon cancer cells via Bax-dependent mitochondrial pathway. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2013;17(16):2166-71.
  82. Pinto Sánchez JF, Rebaza Vásquez S, Muñoz Mendoza S, Maco Cárdenas V. Peutz-Jeghers syndrome and colon adenocarcinoma. *Rev Gastroenterol Peru*. 2004;24(4):363-6
  83. Nishihori T, Strazzabosco M, Saif MW. Incidence and management of colorectal cancer in liver transplant recipients. *Clin Colorectal Cancer*. 2008;7(4):260-6.
  84. Miao Y, Everly JJ, Gross TG, Tevar AD, First MR, Alloway RR, Woodle ES. De novo cancers arising in organ transplant recipients are associated with adverse outcomes compared with the general population. *Transplantation*. 2009;87(9):1347-59.
  85. Mueller JD, Bethke B, Stolte M. Colorectal de novo carcinoma: A review of its diagnosis, histopathology, molecular biology, and clinical relevance. *Virchows Arch* 2002; 440:453-460.

86. Popov Z, Ivanovski O, Kolevski P, Stankov O, Petrovski D, Cakalaroski K, Ivanovski N. De novo malignancies after renal transplantation--a single-center experience in the Balkans. *Transplant Proc.* 2007;39(8):2589-91.
87. Bresalier SR: Malignant neoplasms of the large intestine. In: Feldman M, Friedman L.S, Brandt L.J(eds) : *Sleisenger and Fordtran's gastrointestinal and liver disease: pathophysiology, diagnosis, management.* (9<sup>th</sup> Edn), 2006, Saunders Elsevier 2006, Chapter 120, pp.2786-7
88. Compton C: Pathology report in colon cancer: what is prognostically important? *Dig. Dis* 1999,17:67-79
89. Parente F, Bargiggia S, Boemo C et al. Anatomic distribution of cancers and colorectal adenomas according to age and sex and relationship between proximal and distal neoplasms in an i-FOBT-positive average-risk Italian screening cohort. *Int J Colorectal Dis.* 2014;29(1):57-64.
90. Cucino C, Buchner AM, Sonnenberg A. Continued rightward shift of colorectal cancer. *Dis Colon Rectum.* 2002;45(8):1035-40.
91. Boland CR, Goel A. Microsatellite instability in colorectal cancer. *Gastroenterology.* 2010 Jun;138(6):2073-2087
92. Calcagno SR, Li S, Colon M, Kreinest PA, Thompson EA, Fields AP, Murray NR. Oncogenic K-ras promotes early carcinogenesis in the mouse proximal colon. *Int J Cancer.* 2008;122(11):2462-70
93. <http://www.iarc.fr/en/publications/pdfs-online/pat-gen/bb2/bb2-chap6.pdf>
94. Winawer SJ, Stewart ET, Zauber AG et al: Relative sensitivity of colonoscopy and barium enema for detection of colorectal cancers in clinical practice. *Gastroenterology* 112:17,1997
95. Sun L, Wu H, Guan YS: Colonography by CT, MRI and PET/CT combined with conventional colonoscopy in colorectal cancer screening and staging. *World J Gastroenterol.* 2008;14(6):853-63.
96. Halligan S, Altman DG, Taylor SA, Mallett S, Deeks JJ, Bartram CI, Atkin W: CT colonography in the detection of colorectal polyps and cancer: systematic review, meta-analysis, and proposed minimum data set for study level reporting. *Radiology.* 2005 ;237(3):893-904.

97. Mang T, Bogoni L, Anand VX, Chandra D, Curtin AJ, Lev-Toaff AS et al.: CT colonography: effect of computer-aided detection of colonic polyps as a second and concurrent reader for general radiologists with moderate experience in CT colonography. *Eur Radiol.* 2014;24(7):1466-76.
98. Ishida H, Iwama T, Tomita N: Diagnosis and management of hereditary colorectal cancer according to the JSCCR Guidelines 2012 for the Clinical Practice of Hereditary Colorectal Cancer. *Nihon Rinsho.* 2014;72(1):143-9
99. Compton CC, Fielding LP, Burgart LJ, Conley B, Cooper HS, Hamilton SR, Hammond ME, Henson DE, Hutter RV, Nagle RB, Nielsen ML, Sargent DJ, Taylor CR, Welton M, Willett C. Prognostic factors in colorectal cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999. *Arch Pathol Lab Med.* 2000;124(7):979-94.
100. Compton CC. Colorectal carcinoma: diagnostic, prognostic, and molecular features. *Mod Pathol.* 2003;16(4):376-88.
101. Greene FL, Page DL, Fleming ID, et al, American Joint Committee on Cancer: AJCC Cancer Staging Manual. New York, Springer-Verlag, 2002, p 435; and Compton CC, Fielding LP, Burgart LJ, et al: Prognostic factors in colorectal cancer. College of American Pathologists consensus statement 1999. *Arch Pathol Lab Med;*2000 124:979-994
102. Hermanek P, Sobin LH: Colorectal carcinoma. In: Hermanek P, Gospodarowicz M, Henson DE, et al ed. *Prognostic Factors in Cancer*, New York: Springer-Verlag; 1995:64--79.
103. Hermanek P, Guggenmoos-Holzmann I, Gall FP: Prognostic factors in rectal carcinoma: A contribution to the further development of tumor classification. *Dis Colon Rectum* 1989; 32:593-599.
104. Brodsky JT, Richard GK, Cohen AM, Minsky BD: Variables correlated with the risk of lymph node metastasis in early rectal cancer. *Cancer* 1992;69:322.
105. Dukes CE: The classification of cancer of the rectum. *J Pathol Bact* 1932;35:323-332
106. Astler VB, Coller FA. The prognostic significance of direct extension of carcinoma of the colon and rectum. *Ann Surg* 1954;139:846
107. Dukes CE. The surgical pathology of rectal cancer. *J Clin Pathol.* 1949;2(2):95-8.

108. Horton JK, Tepper JE. Staging of colorectal cancer: past, present, and future. *Clin Colorectal Cancer*. 2005;4(5):302-12
109. Gemenjager E. The classification system of Dukes and its modification for rectal and colonic cancers. *Helv Chir Acta*. 1981;48(1-2):265-72
110. Hamilton R, Vogelstein B, Kudo S, Riboli E, Nakamura S, Hainaut P, Rubio CA, Sobin LH et al: Carcinoma of the colon and rectum. In: Hamilton SR, Aaltonen LA: Pathology and Genetics of Tumours of the Digestive System. IARC Press, Lyon, 2000, pp104-143
111. Compton CC. Key issues in reporting common cancer specimens: problems in pathologic staging of colon cancer. *Arch Pathol Lab Med*. 2006;130(3):318-24.
112. Grin A, Messenger DE, Cook M, O'Connor BI, Hafezi S, El-Zimaity H, Kirsch R. Peritoneal elastic lamina invasion: limitations in its use as a prognostic marker in stage II colorectal cancer. *Hum Pathol*. 2013;44(12):2696-705
113. Stewart CJ, Morris M, de Boer B, Iacopetta B. Identification of serosal invasion and extramural venous invasion on review of Dukes' stage B colonic carcinomas and correlation with survival. *Histopathology*. 2007;51(3):372-8.
114. Nakamura T, Yoshioka H, Ohno M, Kuniyasu T, Tabuchi Y. Clinicopathologic variables affecting survival of distal colorectal cancer patients with macroscopic invasion into the adjacent organs. *Surg Today*. 1999;29(3):226-32.
115. Webber C, Gospodarowicz M, Sobin LH, Wittekind C, Greene FL, Mason MD, Compton C, Brierley J, Groome PA. Improving the TNM classification: findings from a 10-year continuous literature review. *Int J Cancer*. 2014 ;135(2):371-8.
116. Tang LH, Berlin J, Branton P et al. Protocol for the Examination of Specimens From Patients With Primary Carcinoma of the Colon and Rectum Based on AJCC/UICC TNM, 7th edition, Protocol web posting date: October 2013.
117. Kang H, O'Connell JB, Maggard MA, Sack J, Ko CY.: A 10-year outcomes evaluation of mucinous and signet ring cell carcinoma of the colon and rectum. *Dis Colon Rectum* 2005;48:161.
118. Baxter NN, Morris AM, Rothenberger DA, Tepper JE. Impact of preoperative radiation for rectal cancer on subsequent lymph node evaluation: a population-based analysis. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2005;1;61(2):426-31.

119. Wong JH, Severino R, Honnebler MB, Tom P, Namiki TS. Number of nodes examined and staging accuracy in colorectal carcinoma. *J Clin Oncol.* 1999;17(9):2896-900.
120. Goldstein NS. Lymph node recoveries from 2427 pT3 colorectal resection specimens spanning 45 years: recommendations for a minimum number of recovered lymph nodes based on predictive probabilities. *Am J Surg Pathol.* 2002 ;26(2):179-89.
121. Dušek M, Chlumská A, Mukenšnabl P, Zámečník M. Examination of lymph nodes in resected colon segments with colorectal carcinoma. *Rozhl Chir.* 2013;92(5):250-4.
122. Gleisner AL, Mogal H, Dodson R, Efron J, Gearhart S, Wick E, Lidor A, Herman JM, Pawlik TM. Nodal status, number of lymph nodes examined, and lymph node ratio: what defines prognosis after resection of colon adenocarcinoma? *J Am Coll Surg.* 2013 ;217(6):1090-100
123. Yamamoto H, Doki Y, Mori M. Lymph node micrometastases in colorectal cancer. *Nihon Geka Gakkai Zasshi.* 2013;114(1):17-21.
124. Sobin LH. TNM, sixth edition: new developments in general concepts and rules. *Semin Surg Oncol.* 2003;21(1):19-22.
125. Nelson H, Petrelli N, Carlin A, Couture J, Fleshman J, Guillem J, Miedema B, Ota D, Sargent D. Guidelines 2000 for Colon and Rectal Cancer Surgery. *J Natl Cancer Inst* 2001;93 : 583-596.
126. Lee WS, Park S, Lee WY, Yun SH, Chun HK. Clinical impact of tumor-infiltrating lymphocytes for survival in stage II colon cancer. *Cancer.* 2010;116(22):5188-99
127. Ogino S, Nosho K, Irahara N, Meyerhardt JA, Baba Y, Shima K, Glickman JN, Ferrone CR, Mino-Kenudson M, Tanaka N, Dranoff G, Giovannucci EL, Fuchs CS. Lymphocytic reaction to colorectal cancer is associated with longer survival, independent of lymph node count, microsatellite instability, and CpG island methylator phenotype. *Clin Cancer Res.* 2009 ;15(20): 6412-20.
128. Ueno H, Hashiguchi Y, Shimazaki H, Shinto E, Kajiwara Y, Nakanishi K, Kato K, Maekawa K, Miyai K, Nakamura T, Yamamoto J, Hase K. Objective criteria for Crohn-like lymphoid reaction in colorectal cancer. *Am J Clin Pathol.* 2013;139(4):434-41
129. Greenson JK, Huang SC, Herron C, Moreno V, Bonner JD, Tomsho LP, Ben-Izhak O, Cohen HI, Trougouboff P, Bejhar J, Sova Y, Pinchev M, Rennert G, Gruber SB.

- Pathologic predictors of microsatellite instability in colorectal cancer. *Am J Surg Pathol*. 2009;33(1):126-33
130. Jass JR: Lymphocytic infiltration and survival in rectal cancer. *J Clin Pathol* 1986;39:585.
131. Tsujino T, Seshimo I, Yamamoto H, Ngan CY, Ezumi K, Takemasa I, Ikeda M, Sekimoto M, Matsuura N, Monden M. . Stromal myofibroblasts predict disease recurrence for colorectal cancer. *Clin Cancer Res*. 2007 ;13(7):2082-90.
132. Coulson-Thomas VJ, Coulson-Thomas YM, Gesteira TF, de Paula CA, Mader AM, Waisberg J, Pinhal MA, Friedl A, Toma L, Nader HB. Colorectal cancer desmoplastic reaction up-regulates collagen synthesis and restricts cancer cell invasion. *Cell Tissue Res*. 2011 ;346(2):223-36.
133. Caporale A, Amore Bonapasta S, Scarpini M, Ciardi A, Vestri A, Ruperto M, Giuliani A. Quantitative investigation of desmoplasia as a prognostic indicator in colorectal cancer. *J Invest Surg*. 2010;23(2):105-9.
134. Ionescu C, Berindan-Neagoe I, Burz C et al :The clinical implications of platelet derived growth factor B, vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in colorectal cancer. *J BUON* 2011;16:274-6.
135. Yen TW, Aardal NP, Bronner MP et al. Myofibroblasts are responsible for the desmoplastic reaction surrounding human pancreatic carcinomas. *Surgery* 2002;131:129.
136. Kovačević Z: Neoplastični program ćelije. U Kovačević Z (ed): Maligne neoplazme. Srpska akademija nauka i umetnosti, ogranak u Novom Sadu, Novi Sad 2006, str. 176-186
137. Komori K, Kanemitsu Y, Kimura K, Hattori N, Sano T, Ito S, Abe T, Senda Y, Misawa K, Ito Y, Uemura N, Shimizu Y. Tumor necrosis in patients with TNM stage IV colorectal cancer without residual disease (R0 Status) is associated with a poor prognosis. *Anticancer Res*. 2013 ;33(3):1099-105.
138. Zhai ZW1, Gu J. Influence of tumor size on the prognosis in patients with colon cancer *Zhonghua Wei Chang Wai Ke Za Zhi*. 2012;15(5):495-8.
139. Laohavinij S1, Maneechavakajorn J, Techatanol P. Prognostic factors for survival in colorectal cancer patients *J Med Assoc Thai*. 2010;93(10):1156-66
140. Sternberg A1, Amar M, Alfici R, Groisman G. Conclusions from a study of venous invasion in stage IV colorectal adenocarcinoma. *J Clin Pathol*. 2002 Jan;55(1):17-21.

141. Krebs B, Kozelj M, Kavalar R, Gajzer B, Gadzijev EM: Prognostic value of additional pathological variables for long-term survival after curative resection of rectal cancer *World J Gastroenterol* 2006 July 28;12(28):4565-4568
142. Hagggar FA1, Boushey RP. Colorectal cancer epidemiology: incidence, mortality, survival, and risk factors. *Clin Colon Rectal Surg.* 2009 Nov;22(4):191-7
143. Schoen RE, Pinsky PF, Weissfeld JL, Colorectal-cancer incidence and mortality with screening flexible sigmoidoscopy. *N Engl J Med.* 2012;366(25):2345-57
144. Thompson MR, Asiimwe A, Flashman K, Is earlier referral and investigation of bowel cancer patients presenting with rectal bleeding associated with better survival? *Colorectal Dis.* 2011 Nov;13(11):1242-8
145. Hansen IO, Jess P. Possible better long-term survival in left versus right-sided colon cancer - a systematic review. *Dan Med J.* 2012;59(6):A4444.
146. O'Connell JB, Maggard MA, Livingston EH, Yo CK. Colorectal cancer in the young. *Am J Surg.* 2004;187(3):343-8.
147. Basbug M, Arikanoglu Z, Bulbuller N, Prognostic value of preoperative CEA and CA 19-9 levels in patients with colorectal cancer *Hepatogastroenterology.* 2011;58(106):400-5
148. Siddiqui AA, Yomi Fayiga Y, and Huerta S: The role of endoscopic ultrasound in the evaluation of rectal cancer. *Int Semin Surg Oncol.* 2006; 3: 36
149. Klos CL, Montenegro G, Jamal N, Wise PE, Fleshman JW, Safar B, Dharmarajan S. Segmental versus extended resection for sporadic colorectal cancer in young patients. *J Surg Oncol.* 2014;110(3):328-32
150. Sang W. Lee, Laparoscopic Procedures for Colon and Rectal Cancer Surgery. *Clin Colon Rectal Surg.* Nov 2009; 22(4): 218–224.
151. Cammà C, Giunta M, Fiorica F et al. Preoperative radiotherapy for resectable rectal cancer: A meta-analysis. *JAMA.* 2000;284(8):1008-15.
152. Curley SA, Izzo F, Abdalla E et al Surgical treatment of colorectal cancer metastasis. *Cancer Metastasis Rev.* 2004;23(1-2):165-82
153. Evangelos P Misiakos, Nikolaos P Karidis, and Gregory Kouraklis Current treatment for colorectal liver metastases *World J Gastroenterol.* Sep 28, 2011; 17(36): 4067–4075.
154. Curley SA, Izzo F, Delrio P et al: Radiofrequency ablation of unresectable primary and metastatic hepatic malignancies: results in 123 *Ann Surg.* 1999;230(1):1-8.



155. Labianca R, Nordlinger B, Beretta GD et al Primary colon cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, adjuvant treatment and follow-up, *Ann Oncol*. 2010 May;21 Suppl 5:v70-7
156. NICE Clinical Guidelines, No. 131 The Diagnosis and Management of Colorectal Cancer 2011 Nov. 74-112
157. Mandel JS, Bond JH, Church TR, et al. Reducing mortality from colorectal cancer by screening for fecal occult blood. Minnesota Colon Cancer Control Study. *N Engl J Med*. 1993 May 13;328(19):1365–1371
158. Kronborg O, Fenger C, Olsen J, et al. Randomised study of screening for colorectal cancer with faecal-occult-blood test. *Lancet*. 1996 Nov 30;348(9040):1467–1471
159. <http://www.cancer.gov/cancertopics/pdq/screening/colorectal/HealthProfessional/page3>
160. Ahlquist DA, Sargent DJ, Loprinzi CL, et al. Stool DNA and occult blood testing for screen detection of colorectal neoplasia. *Ann Intern Med*. 2008 Oct 7; 149(7):441-50, W81.
161. Diaz JA, Slomka T. State of the Art Review: Colorectal Cancer Screening. *Am J Lifestyle Med*. 2012 May 1;6(3):196-203
162. Levin B, Lieberman D, McFarland B, et al. Screening and Surveillance for the Early Detection of Colorectal Cancer and Adenomatous Polyps, 2008: A Joint Guideline from the American Cancer Society, the US Multi-Society Task Force on Colorectal Cancer, and the American College of Radiology. *CA Cancer J Clin*. 2008;58:130–160
163. Walsh JM, Terdiman JP. Colorectal cancer screening: scientific review. *Jama*. 2003 Mar 12;289(10):1288–1296.
164. Ransohoff DF. How much does colonoscopy reduce colon cancer mortality? *Ann Intern Med*. 2009;150(1):50–52
165. Whitlock EP, Lin JS, Liles E, et al. Screening for colorectal cancer: a targeted, updated systematic review for the U S Preventive Services Task Force. *Ann Intern Med*. 2008;149(9):638–658.
166. Rex DK, Johnson DA, Anderson JC, et al. American College of Gastroenterology guidelines for colorectal cancer screening 2009. *Am J Gastroenterol*. 2009 Mar;104(3):739–750

167. Sell S.: Cancer markers of the 1990s. Comparison of the new generation of markers defined by monoclonal antibodies and oncogene probes to prototypic markers. *Clin Lab Med.* 1990;10(1):1-37.
168. Ladstein RG, Bachmann IM, Straume O, Akslen LA. Ki-67 expression is superior to mitotic count and novel proliferation markers PHH3, MCM4 and mitotin as a prognostic factor in thick cutaneous melanoma. *BMC Cancer.* 2010 Apr 14;10:140-45
169. Habberstad AH, Gulati S, Torp SH. Evaluation of the proliferation markers Ki-67/MIB-1, mitotin, survivin, pHH3, and DNA topoisomerase II $\alpha$  in human anaplastic astrocytomas--an immunohistochemical study. *Diagn Pathol.* 2011; 24;6:43-8
170. Elias CF, Purohit D. Leptin signaling and circuits in puberty and fertility. *Cell Mol Life Sci.* 2013;70(5):841-62
171. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature.* 1994;372(6505):425-32.
172. Janeckova R. The role of leptin in human physiology and pathophysiology. *Physiol Res.* 2001;50(5):443-59.
173. Isidori AM, Strollo F, Morè M, Caprio M, Aversa A, Moretti C, Frajese G, Riondino G, Fabbri A. Leptin and aging: correlation with endocrine changes in male and female healthy adult populations of different body weights. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000;85(5):1954-62.
174. Klein S, Coppack SW, Mohamed-Ali V, Landt M. Adipose tissue leptin production and plasma leptin kinetics in humans. *Diabetes.* 1996;45(7):984-7.
175. Yamada M, Irahara M, Tezuka M, Murakami T, Shima K, Aono T. Serum leptin profiles in the normal menstrual cycles and gonadotropin treatment cycles. *Gynecol Obstet Invest.* 2000;49(2):119-23.
176. Schneider R, Bomstein SR, Chrousos GP, Boxberger S, Ehninger G, Breidert M.: Leptin mediates a proliferative response in human gastric mucosa cells with functional receptor. *Horm Metab Res* 2001; 33: 1-6
177. Attoub S, Noe V, Pirola L, Bruyneel E, Chastre E, Mareel M, Wymann MP, Gespach C. Leptin promotes invasiveness of kidney and colonic epithelial cells via phosphoinositide 3-kinase-, rho-, and rac-dependent signaling pathways. *FASEB J* 2000; 14: 2329-2338

178. Somasundar P, Frankenberry KA, Skinner H, Vedula G, McFadden DW, Riggs D, Jackson B, Vangilder R, Hileman SM, Vona-Davis LC. Prostate cancer cell proliferation is influenced by leptin. *J Surg Res* 2004; 118 : 71-82
179. Koda M, Sulkowska M, Kanczuga-Koda L, Cascio S, Colucci G, Russo A, Surmacz E, Sulkowski S. Expression of the obesity hormone leptin and its receptor correlates with hypoxia-inducible factor-1 alpha in human colorectal cancer. *Ann Oncol.* 2007 Jun;18 Suppl 6:vi116-9.
180. Lee JW, Bae SH, Jeong JW, Kim SH, Kim KW. Hypoxia-inducible factor (HIF-1)alpha: its protein stability and biological functions. *Exp Mol Med.* 2004;36(1):1-12.
181. Lim JH, Lee ES, You HJ, Lee JW, Park JW, Chun YS. Ras-dependent induction of HIF-1alpha785 via the Raf/MEK/ERK pathway: a novel mechanism of Ras-mediated tumor promotion. *Oncogene.* 2004;23(58):9427-31.
182. Saxena NK, Sharma D, Ding X., Lin S, Marra F, Merlin D, Anania FA. Concomitant activation of the JAK/STAT, PI3K/AKT, and ERK signaling is involved in leptin-mediated promotion of invasion and migration of hepatocellular carcinoma cells. *Cancer Res.* 2007; 67(6):2497-507.
183. Huang XF, Chen JZ. Obesity, the PI3K/Akt signal pathway and colon cancer. *Obes Rev.* 2009; 10(6):610-6.
184. Beales IL, Ogunwobi OO. Leptin synergistically enhances the anti-apoptotic and growth-promoting effects of acid in OE33 oesophageal adenocarcinoma cells in culture. *Mol Cell Endocrinol.* 2007; 274(1-2):60-8.
185. Quintás-Cardama A, Verstovsek S. Molecular pathways: Jak/STAT pathway: mutations, inhibitors, and resistance. *Clin Cancer Res* 2013; 19(8):1933-40.
186. Abubaker K, Luwor RB, Zhu H, McNally O, Quinn MA, Burns CJ, Thompson EW, Findlay JK, Ahmed N. Inhibition of the JAK2/STAT3 pathway in ovarian cancer results in the loss of cancer stem cell-like characteristics and a reduced tumor burden. *BMC Cancer.* 2014; 14(1):317
187. Malinowsky K, Nitsche U, Janssen KP, Bader FG, Späth C, Drecoll E, Keller G, Höfler H, Slotta-Huspenina J, Becker KF. Activation of the PI3K/AKT pathway correlates with prognosis in stage II colon cancer. *Br J Cancer.* 2014; 110(8):2081-9.

188. El Homsy M, Ducroc R, Claustre J, Jourdan G, Gertler A, Estienne M, Bado A, Scoazec JY, Plaisancié P. Leptin modulates the expression of secreted and membrane-associated mucins in colonic epithelial cells by targeting PKC, PI3K, and MAPK pathways. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2007; 293(1):G365-73.
189. Johansson ME, Hansson GC. Mucus and the goblet cell. *Dig Dis*. 2013;31(3-4):305-9.
190. Hollingsworth MA, Swanson BJ. Mucins in cancer: protection and control of the cell surface. *Nat Rev Cancer* 2004; 4:45-60.
191. Merga Y, Campbell BJ, Rhodes JM. Mucosal barrier, bacteria and inflammatory bowel disease: possibilities for therapy. *Dig Dis*. 2014;32(4):475-83.
192. Rachagani S, Torres MP, Moniaux N, Batra SK. Current status of mucins in the diagnosis and therapy of cancer. *Biofactors* 2009; 35:509-27
193. Jonckheere N, Van Seuning I. The membrane-bound mucins: From cell signalling to transcriptional regulation and expression in epithelial cancers. *Biochimie*. 2010 ;92(1):1-11)
194. Carraway, L., Ramsauer VP., Haq, B. & Carothers Carraway CA. Cell signaling through membrane mucins. *Bioessays* 2003; 25(1), 66-71
195. Fukuda M: Roles of mucin-type O-glycans in cell adhesion. *Biochim Biophys Acta* 2002, 1573:394-405
196. Inagaki Y, Xu H, Nakata M, Seyama Y, Hasegawa K, Sugawara Y, Tang W, Kokudo N. Clinicopathology of sialomucin: MUC1, particularly KL-6 mucin, in gastrointestinal, hepatic and pancreatic cancers. *Biosci Trends*. 2009; 3(6):220-32.
197. Barchi JJ Jr. Mucin-type glycopeptide structure in solution: past, present, and future. *Biopolymers*. 2013;99(10):713-23.
198. Adler KB, Tuvim MJ, Dickey BF. Regulated mucin secretion from airway epithelial cells. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2013;4:129 ;
199. Dharmaraj N, Chapela PJ, Morgado M, Hawkins SM, Lessey BA, Young SL, Carson DD. Expression of the transmembrane mucins, MUC1, MUC4 and MUC16, in normal endometrium and in endometriosis. *Hum Reprod*. 2014;29(8):1730-8.)
200. Itoh Y, Kamata-Sakurai M, Denda-Nagai K, Nagai S, Tsuiji M, Ishii-Schrade K, Okada K, Goto A, Fukayama M, Irimura T. Identification and expression of human epiglycanin/MUC21: a novel transmembrane mucin. *Glycobiology*. 2008;18(1):74-8.

201. Xu Y, Zhang L, Hu G. Potential application of alternatively glycosylated serum MUC1 and MUC5AC in gastric cancer diagnosis. *Biologicals*. 2009;37(1):18-25
202. Saeki N, Sakamoto H, Yoshida T. Mucin 1 gene (MUC1) and gastric-cancer susceptibility. *Int J Mol Sci*. 2014;15(5):7958-73
203. Bäckström M, Ambort D, Thomsson E, Johansson ME, Hansson GC. Increased understanding of the biochemistry and biosynthesis of MUC2 and other gel-forming mucins through the recombinant expression of their protein domains. *Mol Biotechnol*. 2013;54(2):250-6.
204. Chaturvedi P, Singh AP, Batra SK. Structure, evolution, and biology of the MUC4 mucin. Structure, evolution, and biology of the MUC4 mucin. *FASEB J*. 2008 Apr;22(4):966-81.
205. Kesimer M, Makhov AM, Griffith JD, Verdugo P, Sheehan JK. Unpacking a gel-forming mucin: a view of MUC5B organization after granular release. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2010;298(1):L15-22.
206. Gendler SJ, Spicer AP. Epithelial mucin genes. *Annu Rev Physiol* 1995;57:607–34.
207. Saldova R, Piccard H, Pérez-Garay M, Harvey DJ, Struwe WB, Galligan MC, Berghmans N, Madden SF, Peracaula R, Opdenakker G, Rudd PM. Increase in sialylation and branching in the mouse serum N-glycome correlates with inflammation and ovarian tumour progression. *PLoS One*. 2013;8(8): e71159
208. Bruno S, Gorczyca W, Darzynkiewicz Z. Effect of ionic strength in immunocytochemical detection of the proliferation associated nuclear antigens p120, PCNA, and the protein reacting with Ki-67 antibody. *Cytometry*. 1992;13(5):496-501.
209. Bridger JM, Kill IR, Lichter P. Association of pKi-67 with satellite DNA of the human genome in early G1 cells. *Chromosome Res*. 1998;6(1):13-24.
210. Sra KK, Torres G, Rady P, Hughes TK, Payne DA, Tying SK. Molecular diagnosis of infectious diseases in dermatology. *J Am Acad Dermatol*. 2005; 53(5):749-65
211. Foltyn W, Zajęcki W, Marek B, Kajdaniuk D, Siemińska L, Zemczak A, Kos-Kudła B. The value of the Ki-67 proliferation marker as a prognostic factor in gastroenteropancreatic neuroendocrine tumours. *Endokrynol Pol*. 2012;63(5):362-6.
212. Healy E, Angus B, Lawrence CM, Rees JL. Prognostic value of Ki67 antigen expression in basal cell carcinomas. *Br J Dermatol*. 1995;133(5):737-41.

213. Gerlach C, Golding M, Larue L, Alison MR, Gerdes J. Ki-67 immunoexpression is a robust marker of proliferative cells in the rat. *Lab Invest.* 1997;77(6):697-8.
214. Folkman J, Tumor angiogenesis: therapeutic implications, *N Engl J Med*, 1971, 285(21):1182–1186.
215. Gușet G, Costi S, Lazăr E, Dema A, Cornianu M, Vernic C, Păiușan L.: Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and assessment of microvascular density with CD34 as prognostic markers for endometrial carcinoma. *Rom J Morphol Embryol.* 2010;51:677-82
216. Rak J, Yu JL, Klement G et al. Oncogenes and angiogenesis: signaling three-dimensional tumor growth. *J Investig Dermatol Symp Proc* 2000;5:24-33.
217. Dachs GU, Tozer GM. Hypoxia modulated gene expression: angiogenesis, metastasis and therapeutic exploitation. *Eur J Cancer* 2000;36:1649-1660.
218. Cross MJ, Claesson-Welsh L. FGF and VEGF function in angiogenesis: signalling pathways, biological responses and therapeutic inhibition. *Trends Pharmacol Sci* 2001;22:201- 207.
219. Des Guetz G, Uzzan B, Nicolas P, Cucherat M, Morere JF, Benamouzig R, Breau JL, Perret GY. Microvessel density and VEGF expression are prognostic factors in colorectal cancer. Meta-analysis of the literature. *Br J Cancer.* 2006 19;94(12):1823-32.
220. Sundov Z, Tomic S, Alfirevic S, Sundov A, Capkun V, Nincevic Z, Nincevic J, Kunac N, Kontic M, Poljak N, Druzijanic N. Prognostic value of MVD, LVD and vascular invasion in lymph node-negative coloncancer. *Hepatogastroenterology.* 2013;60(123):432-8.
221. Minhajat R, Mori D, Yamasaki F, Sugita Y, Satoh T, Tokunaga O. Endoglin (CD105) expression in angiogenesis of colon cancer: analysis using tissue microarrays and comparison with other endothelial markers. *Virchows Arch.* 2006;448(2):127-34
222. Saad RS, Liu YL, Nathan G, Celebrezze J, Medich D, Silverman JF. . Endoglin (CD105) and vascular endothelial growth factor as prognostic markers in colorectal cancer. *Mod Pathol.* 2004;17(2):197-203.
223. Fonsatti E, Altomonte M, Nicotra MR, Natali PG, Maio M. Endoglin (CD105): a powerful therapeutic target on tumor-associated angiogenic blood vessels. *Oncogene.* 2003;22(42):6557-63.

224. Heldin CH, Miyazono K, ten Dijke P. TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature*. 1997;390(6659):465-71.
225. Bobik A. . Transforming growth factor-betas and vascular disorders. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006;26(8):1712-20.
226. Fonsatti E, Del Vecchio L, Altomonte M, Sigalotti L, Nicotra MR, Coral S, Natali PG, Maio M. Endoglin: An accessory component of the TGF-beta-binding receptor-complex with diagnostic, prognostic, and bioimmunotherapeutic potential in human malignancies. *J Cell Physiol*. 2001;188(1):1-7.
227. Akagi K, Ikeda Y, Sumiyoshi Y, Kimura Y, Kinoshita J, Miyazaki M, Abe T. Estimation of angiogenesis with anti-CD105 immunostaining in the process of colorectal cancer development. *Surgery*. 2002;131(1 Suppl):S109-13.
228. Gómez-Esquer F, Agudo D, Martínez-Arribas F, Nuñez-Villar MJ, Schneider J. mRNA expression of the angiogenesis markers VEGF and CD105 (endoglin) in human breast cancer. *Anticancer Res*. 2004;24(3a):1581-5.
229. Rosen LS, Gordon MS, Robert F, Matei DE. Endoglin for targeted cancer treatment. *Curr Oncol Rep*. 2014;16(2):365.
230. Hsu SM, Raine L, Fanger H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem*. 1981;29(4):577-80.
231. Mouton PR: *Unbiased Stereology: A Concise Guide*. Baltimore John Hopkins University Press, 2011, first edition, 1-171
232. Frazier AL, Colditz GA, Fuchs CS, Kuntz KM. Cost-effectiveness of screening for colorectal cancer in the general population. *JAMA* 2000;284:1954-61)
233. Cancer Trends Progress Report – 2009/2010 Update, National Cancer Institute, NIH, DHHS, Bethesda, MD, april 2010
234. Ministarstvo zdravlja Republike Srbije; Nacionalni vodič dobre kliničke prakse za dijagnostikovanje i lečenje raka kolona i rektuma. Beograd. 2012.
235. Burt RW: Colon cancer screening. *Gastroenterology* 2000;119(3): 837–53.
236. Ponz de Leon M, Varesco L, Benatti P, Sassatelli R, Izzo P, Scarano MI, et al. Phenotype-genotype correlations in an extended family with adenomatosis coli and an unusual APC gene mutation. *Dis Colon Rectum* 2001; 44(11): 1597–604

237. Steele SR, Park GE, Johnson EK, Martin MJ, Stojadinovic A, Maykel JA, Causey MW. The impact of age on colorectal cancer incidence, treatment, and outcomes in an equal-access health care system. *Dis Colon Rectum*. 2014;57(3):303-10.
238. de Jong AE, Morreau H, Nagengast FM, et al. Prevalence of adenomas among young individuals at average risk for colorectal cancer. *Am J Gastroenterol* 2005;100(1):139–143
239. Grande M, Milito G, Attina GM, et al. Evaluation of clinical, laboratory and morphologic prognostic factors in colon cancer. *World J Surg Oncol* 2008;6:98.
240. Martínez ME, Sampliner R, Marshall JR, Bhattacharyya AK, Reid ME, Alberts DS. Adenoma characteristics as risk factors for recurrence of advanced adenomas. *Gastroenterology* 2001;120(5): 1077–83.
241. Freeman HJ. Heterogeneity of colorectal adenomas, the serrated adenoma, and implications for screening and surveillance. *World J Gastroenterol* 2008; 14(22): 3461–3.
242. Bernstein CN, Blanchard JF, Kliever E, Wajda A. Cancer risk in patients with inflammatory bowel disease: a population-based study. *Cancer*. 2001;91(4):854-862
243. Eaden JA, Abrams KR, Mayberry JF. The risk of colorectal cancer in ulcerative colitis: a meta-analysis. *Gut*. Apr 2001;48(4):526-535.
244. Skibber J, Minsky B, Hoff P. Cancer of the colon and rectum. In: DeVita VT Jr, Hellmann S, Rosenberg SA, eds. *Cancer: principles & practice of oncology*. 6th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2001:1216–1271.
245. Jasperson KW, Tuohy TM, Neklason DW, Burt RW. Hereditary and familial colon cancer. *Gastroenterology*. Jun 2010;138(6):2044-2058.
246. Lynch HT, de la Chapelle A. Hereditary colorectal cancer. *N Engl J Med*. Mar 6 2003;348(10):919-932.
247. Lynch HT, de la Chapelle A. Genetic susceptibility to nonpolyposis colorectal cancer. *J Med Genet* 1999; 36(11): 801–18.
248. Chan AT, Giovannucci EL. Primary prevention of colorectal cancer. *Gastroenterology*. Jun 2010;138(6):2029-2043 e2010.
249. World Cancer Research Fund and American Institute for Cancer Research. *Food, Nutrition, Physical Activity, and the Prevention of Cancer: A Global Perspective*. Washington, DC: American Institute for Cancer Research; 2007



250. Homann N, König IR, Marks M, Benesova M, Stickel F, Millionig G, Mueller S, Seitz HK. Alcohol and colorectal cancer: the role of alcohol dehydrogenase 1C polymorphism. *Alcohol Clin Exp Res.* 2009;33(3):551-6.
251. Ferrari P, Jenab M, Norat T, et al. Lifetime and baseline alcohol intake and risk of colon and rectal cancers in the European prospective investigation into cancer and nutrition (EPIC). *Int J Cancer.* 2007;121(9):2065-2072.
252. Seitz HK, Cho CH. Contribution of alcohol and tobacco use in gastrointestinal cancer development. *Methods Mol Biol.* 2009;472:217-41.
253. Zisman AL, Nickolov A, Brand RE, Gorchow A, Roy HK. Associations between the age at diagnosis and location of colorectal cancer and the use of alcohol and tobacco: implications for screening. *Arch Intern Med* 2006;166(6): 629–634.
254. Liang PS, Chen TY, Giovannucci E. Cigarette smoking and colorectal cancer incidence and mortality: systematic review and meta-analysis. *Int J Cancer.* 2009;124(10):2406-2415.
255. Bishehsari F, Mahdavinia M, Vacca M, Malekzadeh R, Mariani-Costantini R. Epidemiological transition of colorectal cancer in developing countries: environmental factors, molecular pathways, and opportunities for prevention. *World J Gastroenterol.* 2014;20(20):6055-72).
256. McArdle CS. Faecal occult blood testing for colorectal cancer. *Annals of Oncology* 2002;13:35-9.
257. Grazzini G, Castiglione G, Ciabattini C, Franceschini F, Giorgi S, Gozzi S et al. Colorectal cancer screening programme by faecal occult blood test in Tuscany: first round results. *Eur J Cancer Prev* 2004; 13:19-26.)
258. Glimelius B, Gronberg H, Jarnhult J , et al. A systematic overview of radiation therapy effects in rectal cancer. *Acta Oncol.* 2003;42:476–492).
259. Twelves C, Wong A, Nowacki MP, et al. Capecitabine as adjuvant treatment for stage III colon cancer. *N Engl J Med.* 2005;352:2696-2704).
260. Ahmed AA . Role of Pathology and Immunohistochemistry in the new era of molecular therapy. *The Open Conference Proceedings Journal* 2010; 1: 164-167),

261. De Hertogh GG, Karen P. Practical and molecular evaluation of colorectal cancer: new roles for the pathologist in the era of targeted therapy. *Arch Pathol Lab Med* 2010; 134: 853-863.
262. Pritchard CC, Grady WM. Colorectal cancer molecular biology moves into clinical practice. *Gut* 2011; 60: 118-129).
263. Nguyen SP, Bent S, Chen YH, Terdiman JP. Gender as a risk factor for advanced neoplasia and colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2009 ;7(6):676-81).
264. Li Q, Zhuo C, Cai G, Zheng H, Li D, Cai S. Pathological features and survival outcomes of young patients with operable colon cancer: are they homogeneous? *PLoS One.* 2014;9(7): e102004)
265. Tartaglia LA, Dembski M, Weng X, Deng N, Culpepper J, Devos R, Richards GJ, Campfield LA et al: . Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. *Cell.* 1995;29;83(7):1263-71.
266. Uddin S, Bavi PB, Hussain AR, Alsbeih G, Al-Sanea N, Jabbar AA, Ashari LH, Alhomoud S, Fouad Al-Dayel F, Maqbool A and Al-Kuraya: KS: Leptin receptor expression in Middle Eastern colorectal cancer and its potential clinical implication. *Carcinogenesis*, 2009; 30(11): 1832–40
267. Baile CA, Della-Fera MA, Martin RJ. Regulation of metabolism and body fat mass by leptin. *Annu Rev Nutr.* 2000;20:105-27
268. Folch J, Pedrós I, Patraca I, Sureda F, Junyent F, Beas-Zarate C, Verdaguer E, Pallàs M, Auladell C, Camins A. Neuroprotective and anti-ageing role of leptin. *J Mol Endocrinol.* 2012 10;49(3):R149-56).
269. Sulkowska M, Golaszewska J, Wincewicz A, Koda M, Baltaziak M, Sulkowski S: Leptin--from regulation of fat metabolism to stimulation of breast cancer growth. *Pathol Oncol Res.* 2006;12(2):69-72.
270. Ambrosini G, Nath AK, Sierra-Honigmann MR, Flores-Riveros J. Transcriptional activation of the human leptin gene in response to hypoxia. Involvement of hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem.* 2002;277(37):34601-9
271. Koukourakis MI, Giatromanolaki A, Sivridis E, Fezoulidis I. :Cancer vascularization: implications in radiotherapy? *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2000;48(2):545-53

272. Ceddia RB, Koistinen HA, Zierath JR and Sweeney G: Analysis of paradoxical observations on the association between leptin and insulin resistance. *FASEB Journal*;2002, 16 1163–1176).
273. Myers EA, Feingold DL, Forde KA, Arnell T, Jang JH, Whelan RL. Colorectal cancer in patients under 50 years of age: a retrospective analysis of two institutions' experience. *World J Gastroenterol*. 2013;19(34):5651-7;
274. Mogoantă SS, Vasile I, Totolici B, Neamțu C, Streba L, Busuioc CJ, Mateescu GO. Colorectal cancer - clinical and morphological aspects. *Rom J Morphol Embryol*. 2014;55(1):103-10
275. Fleming M, Ravula S, Tatishchev SF, Wang HL. Colorectal carcinoma: Pathologic aspects. *J Gastrointest Oncol*. 2012;3(3):153-73.
276. Greene FL, Page DL, Fleming ID, et al, American Joint Committee on Cancer: *AJCC Cancer Staging Manual*. New York, Springer-Verlag, 2002, p 435-454
277. Uddin S, Bu R, Ahmed M, Abubaker J, Al-Dayel F, Bavi P, Al-Kuraya KS. Overexpression of leptin receptor predicts an unfavorable outcome in Middle Eastern ovarian cancer. *Mol Cancer*. 2009 ;8:74-81
278. Ishikawa M, Kitayama J, Nagawa H. Enhanced expression of leptin and leptin receptor (OB-R) in human breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2004 ;10(13):4325-31
279. Ishikawa M, Kitayama J, Nagawa H. Expression pattern of leptin and leptin receptor (OB-R) in human gastric cancer. *World J Gastroenterol*. 2006 ;12(34):5517-22.
280. Koda M, Sulkowska M, Wincewicz A, Kanczuga-Koda L, Musiatowicz B, Szymanska M, Sulkowski S. Expression of leptin, leptin receptor, and hypoxia-inducible factor 1 alpha in human endometrial cancer. *Ann N Y Acad Sci*. 2007 ;1095:90-8
281. Pollack LA, Gotway CA, Bates JH, Parikh-Patel A, Richards TB, Seeff LC, Hodges H, Kassim S. Use of the spatial scan statistic to identify geographic variations in late stage colorectal cancer in California (United States). *Cancer Causes Control*. 2006;17(4):449-57
282. Garofalo C, Koda M, Cascio S, Sulkowska M, Kanczuga-Koda L, Golaszewska J, Russo A, Sulkowski S, Surmacz E. Increased expression of leptin and the leptin receptor as a marker of breast cancer progression: possible role of obesity-related stimuli. *Clin Cancer Res*. 2006;12(5):1447-53

283. Yatsuoka T, Nishimura Y, Sakamoto H, Tanaka Y, Kurozumi M. Lymph node metastasis of colorectal cancer with submucosal invasion. *Gan To Kagaku Ryoho*. 2013 ; 40(12):2041-3
284. Campos FG, Calijuri-Hamra MC, Imperiale AR, Kiss DR, Nahas SC, Ceconello I. Locally advanced colorectal cancer: results of surgical treatment and prognostic factors. *Arq Gastroenterol*. 2011;48(4):270-5).
285. Gibson KM, Chan C, Chapuis PH, Dent OF, Bokey L. Mural and extramural venous invasion and prognosis in colorectal cancer. *Dis Colon Rectum*. 2014;57(8):916-26;
286. Roxburgh CS, McMillan DC, Richards CH, Atwan M, Anderson JH, Harvey T, Horgan PG, Foulis AK. The clinical utility of the combination of T stage and venous invasion to predict survival in patients undergoing surgery for colorectal cancer. *Ann Surg*. 2014;259(6):1156-65
287. Ueno H, Shirouzu K, Eishi Y, Yamada K, Kusumi T, Kushima R, Ikegami M, Murata A, Okuno K, Sato T, Ajioka Y, Ochiai A, Shimazaki H, Nakamura T, Kawachi H, Kojima M, Akagi Y, Sugihara K; Study Group for Perineural Invasion projected by the Japanese Society for Cancer of the Colon and Rectum (JSCCR). Characterization of perineural invasion as a component of colorectal cancer staging. *Am J Surg Pathol*. 2013;37(10):1542-9
288. Tougeron D, Maby P, Elie N, Fauquembergue E, Le Pessot F, Cornic M, Sabourin JC, Michel P, Frébourg T, Latouche JB. Regulatory T lymphocytes are associated with less aggressive histologic features in microsatellite-unstable colorectal cancers. *PLoS One*. 2013 ;8(4):e 61001;
289. Correale P, Rotundo MS, Botta C, Del Vecchio MT, Ginanneschi C, Licchetta A, Conca R, Apollinari S, De Luca F, Tassone P, Tagliaferri P. Tumor infiltration by T lymphocytes expressing chemokine receptor 7 (CCR7) is predictive of favorable outcome in patients with advanced colorectal carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2012 ;18(3):850-7.
290. Katz SC, Bamboat ZM, Maker AV, Shia J, Pillarisetty VG, Yopp AC, Hedvat CV, Gonen M, Jarnagin WR, Fong Y, D'Angelica MI, DeMatteo RP. Regulatory T cell infiltration predicts outcome following resection of colorectal cancer liver metastases. *Ann Surg Oncol*. 2013 ;20(3):946-55.

291. Tufegdžić I, Radovanović Z, Jović J, Jancić S. Quantitative evaluation of stromal myofibroblasts and their significance for the metastatic capacity of colorectal carcinoma. *J BUON*. 2012 ;17(1):85-91.
292. Leung, J. C., Chan, L. Y., Tang, S. C., Chu, K. M. and Lai, K. N. (2006) Leptin induces TGF-beta synthesis through functional leptin receptor expressed by human peritoneal mesothelial cell. *Kidney Int.* 69; 2078–2086
293. Nakazawa M, Obata Y, Nishino T, Abe S, Nakazawa Y, Abe K, Furusu A, Miyazaki M, Koji T, Kohno S. Involvement of leptin in the progression of experimentally induced peritoneal fibrosis in mice. *Acta Histochem Cytochem*. 2013;46(2):75-84
294. Khoo JJ, Gunn A, Peh SC. Pattern of hMLH1, hMSH2 and hMSH6 expression and clinical characteristics in a sample of Malaysian colorectal carcinoma cases. *Malays J Pathol*. 2013;35(1):45-57
295. Farhoud S, Bromberg SH, Barreto E, Godoy AC. Clinical and macroscopic variables that influence the prognosis of colorectal carcinoma. *Arq Gastroenterol*. 2002;39(3):163-7
296. Kalinin OE. Endoscopic method of intestinal decompression with the use of entero- and colonosorption in treatment of rectal cancer complicated with intestinal obstruction. *Exp Oncol*. 2013;35(1):53-7
297. Matsushita Y, Yamamoto N, Shirahama H, Tanaka S, Yonezawa S, Yamori T, Irimura T, Sato E. Expression of sulfomucins in normal mucosae, colorectal adenocarcinomas, and metastases. *Jpn J Cancer Res*. 1995; 86(11):1060-7
298. Byrd JC, Bresalier RS. Mucins and mucin binding proteins in colorectal cancer. *Cancer Metastasis Rev* 2004; 23(1–2): 77–99.
299. Corfield AP, Myerscough N, Warren BF, *et al*. Reduction of sialic acid O-acetylation in human colonic mucins in the adenoma-carcinoma sequence. *Glycoconj J* 1999; 16:307–17
300. Trinchera M, Malagolini N, Chiricolo M, Santini D, Minni F, Caretti A, Dall'olio F. The biosynthesis of the selectin-ligand sialyl Lewis x in colorectal cancer tissues is regulated by fucosyltransferase VI and can be inhibited by an RNA interference-based approach. *Int J Biochem Cell Biol*. 2011; 43(1):130-9
301. Sheng YH, Hasnain SZ, Florin TH, McGuckin MA. Mucins in inflammatory bowel diseases and colorectal cancer. *J Gastroenterol Hepatol*. 2012; 27(1):28-38

302. Li Y, Yu WH, Ren J, Chen W, Huang L, Kharbanda S, Loda M, Kufe D. Heregulin targets gamma-catenin to the nucleolus by a mechanism dependent on the DF3/MUC1 oncoprotein. *MolCancer Res.* 2003; 1(10):765-75
303. Chaturvedi P, Singh AP, Chakraborty S, Chauhan SC, Bafna S, Meza JL, Singh PK, Hollingsworth MA, Mehta PP, Batra SK. MUC4 mucin interacts with and stabilizes the HER2 oncoprotein in human pancreatic cancer cells. *Cancer Res.* 2008; 68(7):2065-70).
304. Adeyemi EO, Bastaki SA, Chandranath IS, Hasan MY, Fahim M, and Adem A. Mechanisms of action of leptin in preventing gastric ulcer. *World J Gastroenterol* 2005; 11(27):4154–4160
305. Slomiany BL, Slomiany A. Leptin suppresses Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide interference with salivary mucin synthesis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003; 312(4):1099-103).
306. Aparicio T, Guilmeau S, Goiot H, Tsocas A, Laigneau JP, Bado A, Sobhani I, Lehy T. Leptin reduces the development of the initial precancerous lesions induced by azoxymethane in the rat colonic mucosa. *Gastroenterology.* 2004;126(2):499-510
307. Bozkurt A, Cakir B, Ercan F, Yeğen BC. Anti-inflammatory effects of leptin and cholecystokinin on acetic acid-induced colitis in rats: role of capsaicin-sensitive vagal afferent fibers. *Regul Pept.* 2003;15;116(1-3):109-18.
308. Cakir B, Bozkurt A, Ercan F, Yeğen BC. The anti-inflammatory effect of leptin on experimental colitis: involvement of endogenous glucocorticoids. *Peptides.* 2004;25(1):95-104.
309. Rahmanzadeh R, Rai P, Celli JP, Rizvi I, Baron-Lühr B, Gerdes J, Hasan T. Ki-67 as a molecular target for therapy in an in vitro three-dimensional model for ovarian cancer. *Cancer Res.* 2010 ;70(22):9234-42.
310. Song M, Zhang X, Wu K, Ogino S, Fuchs CS, Giovannucci EL, Chan AT. Plasma adiponectin and soluble leptin receptor and risk of colorectal cancer: a prospective study. *Cancer Prev Res (Phila).* 2013;6(9):875-85
311. Stattin P, Lukanova A, Biessy C, Söderberg S, Palmqvist R, Kaaks R, Olsson T, Jellum E. Obesity and colon cancer: does leptin provide a link? *Int J Cancer.* 2004;109(1):149-52.
312. Fenton JI, Lavigne JA, Perkins SN, Liu H, Chandramouli GV, Shih JH, Hord NG, Hursting SD. Microarray analysis reveals that leptin induces autocrine/paracrine cascades

- to promote survival and proliferation of colon epithelial cells in an Apc genotype-dependent fashion. *Mol Carcinog*. 2008 ;47(1):9-21).
313. Erkasap N, Ozkurt M, Erkasap S, Yasar F, Uzuner K, Ihtiyar E, Uslu S, Kara M, Bolluk O. Leptin receptor (Ob-R) mRNA expression and serum leptin concentration in patients with colorectal and metastatic colorectal cancer. *Braz J Med Biol Res*. 2013;46(3):306-10).
  314. Hansen TF, Nielsen BS, Jakobsen A, Sørensen FB. Visualising and quantifying angiogenesis in metastatic colorectal cancer : A comparison of methods and their predictive value for chemotherapy response. *Cell Oncol (Dordr)*. 2013;36(4):341-50
  315. Bossi P, Viale G, Lee AK, *et al*. Angiogenesis in colorectal tumors: microvessel quantitation in adenomas and carcinomas with clinicopathological correlations. *Cancer Res* 1995;55:5049–5053.
  316. Pietra N, Sarli L, Caruana P, *et al*. Is tumor angiogenesis a prognostic factor in patients with colorectal cancer and no involved nodes? *Eur J Surg* 2000;166:552–556.
  317. Anannamcharoen S, Nimmanon T. Study of the vascular endothelial growth factor (VEGF) expression and microvascular density (MVD) in primary colorectal cancer specimens. *J Med Assoc Thai*. 2012;95(8):1041-7.
  318. Sheng YH, Hasnain SZ, Florin TH, McGuckin MA. Mucins in inflammatory bowel diseases and colorectal cancer. *J Gastroenterol Hepatol*. 2012 ;27(1):28-38
  319. Hashimoto Y, Skacel M, Lavery IC, Mukherjee AL, Casey G, Adams JC. Prognostic significance of fascin expression in advanced colorectal cancer: an immunohistochemical study of colorectal adenomas and adenocarcinomas. *BMC Cancer*. 2006 ;6:241-7
  320. Liu H, Wan D, Pan Z, Cao L, Wu X, Lu Z, Kang T. Expression and biological significance of leptin, leptin receptor, VEGF, and CD34 in colorectal carcinoma. *Cell Biochem Biophys*. 2011;60(3):241-4
  321. Zhou YJ, Ye Q, Lu HS, Yang YH, Guan GX, Huang CM, Wang C, Zhang J. Association of microvessel density and blood vessel invasion with the prognosis in rectal carcinoma at stages I to II. *Zhonghua Wei Chang Wai Ke Za Zhi*. 2010 ;13(7):516-9).
  322. Liu H, Wan D, Pan Z, Cao L, Wu X, Lu Z, Kang T. Expression and biological significance of leptin, leptin receptor, VEGF, and CD34 in colorectal carcinoma. *Cell Biochem Biophys*. 2011;60(3):241-4)

323. Dutta D, Ghosh S, Pandit K, Mukhopadhyay P, Chowdhury S. Leptin and cancer: Pathogenesis and modulation. *Indian J Endocrinol Metab.* 2012;16(Suppl 3):S596-600



## ИДЕТИФИКАЦИОНА СТРАНИЦА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

<b>I. Аутор</b>	
Име и презиме:	Велимир Милошевић
Датум и место рођења:	13.3.1975 ,Подгорица
Садашње запослење:	специјалиста гастроентерохепатологије на одељењу за гастроентерохепатологију Клиничког центра Црне горе, сарадник у настави за ужу научну област Интерна медицина Медицинског факултета у Подгорици
<b>II. Докторска дисертација</b>	
Наслов:	<b>„Корелација експресије лептин рецептора са пролиферацијом, неоангиогенезом и секрецијом муцина у колоректалном аденокарциному“</b>
Број страница:	176
Број слика:	22 фотографије, 21 графикон и 45 табела
Број библиографских података:	323
Установа и место где је рад израђен:	Факултет медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, Клинички центар Црне горе
Научна област (УДК):	Медицина (онкологија, гастроентерологија)
Ментор:	Доц.др Миљан Крстић
<b>III. Оцена и одбрана</b>	
Датум пријаве теме:	19.09.2013(25.11.2013)
Број одлуке и датум прихватања докторске дисертације:	01-2798/3-5 26.03.2014
Комисија за оцену подобности теме и кандидата:	1. Доц.др Иван Јовановић 2. Доц.др Дракче Радовановић 3. Доц.др Миљан Крстић
Комисија за одбрану докторске дисертације:	1. Проф.др Милан Кнежевић, председник 2. Доц. др Гордана Радосављевић 3. Доц. др Милутин Булајић
Комисија за одбрану докторске дисертације:	1. Проф.др Милан Кнежевић, председник 2. Доц. др Гордана Радосављевић 3. Доц. др Милутин Булајић
Датум одбране дисертације:	

**УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ**  
**ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА**  
**КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАТИКА**

Редни број-РБ:	223/2009
Идентификациони број-ИБР:	01-2798/3-5
Тип документације- ТД :	Монографска публикација
Тип записа- ТЗ:	Текстуални штампани материјал
Врста рада- ВР:	Докторска дисертација
Аутор- АУ:	Мр.сци.мед.др Велимир Милошевић
Ментор/коментор- МН:	Доц.др Миљан Крстић
Наслоб рада- МН:	„Корелација експресије лептин рецептора са пролиферацијом , неоангиогенезом и секрецијом муцина у колоректалном аденокарциному“
Језик публикације-ЈП:	Српски (ћирилица)
Језик извода- ЈИ:	Српски/ Енглески
Земља публикавања- ЗП:	Србија
Уже географско подручје-УГП:	Шумадија
Година- ГО:	2014
Издавач- ИЗ:	Ауторски репринт
Место и адреса-МС:	34000 Крагујевац ,Светозара Марковића 69
Физички опис рада- ФО:	176/8/22/21/45/323
Научна област:	Медицина
Научна дисциплина-НД:	Онкологија, Гастроентерологија
Предметна одредница/ кључне речи-ПО:	Колоректални карцином,лептин рецептори, пролиферација, неоангиогенеза, муцини
УДК	
Чува се-ЧУ:	У библиотеци Факултета медицинских наука у Крагујевцу
Важна напомена ВН:	

<p>Извод:- ИД:</p>	<p>УВОД: Колоректални карцином је мултифакторска болест која је последица интеракције наслеђених и фактора околине. Бројне студије су потврдиле значајну повезаност овог тумора са навикама у исхрани, а запажено је да је ризик за настанак колоректалног карцинома код гојазних особа 1,5-3,5 пута већи у поређењу са нормално ухрањеним особама. Кључни молекул у развоју гојазности је лептин, продукт гена гојазности (ob-гена), који дјелује преко својих рецептора (LEPR).</p> <p>ЦИЉ: Одређивање експресије лептин рецептора (LEPR) и корелација експресије LEPR са пролиферацијом, неоангиогенезом и секрецијом муцина у колоректалном аденокарциному.</p> <p>МЕТОД: За истраживање је коришћен биопсијски, оперативни материјал добијен ресекцијом колоректалног карцинома од 75 пацијената лечених на Хируршкој клиници Клиничког Центра Црне Горе (КЦЦГ). За диференцијацију хистопатолошких процеса је коришћена рутинска Н&amp;Е метода, а за испитивање експресије LEPR, маркера пролиферације Ki67 и експресије маркера ангиогенезе Ендоглина (CD105) је коришћена имунохистохемијска АВС метода са специфичним антитијелима. За диференцијацију муцина кориштене су хистохемијске АВ-PAS и НID-AB (pH 2,5) технике. За сваки појединачан случај одређени су класични прогностички параметри: стадијум тумора, хистолошки градус, присутност лимфатичке, ангио- и перинеуралне инвазије, присуство метастаза у лимфним нодусима и јетри, степен дезмоплазије, некрозе и инфламацијског инфилтрата. Након квантитативне анализе експресије LEPR, стереометријски је израчуната густина Ki67 позитивних ћелија и густина микроваскуларних структура по мм<sup>2</sup>, а затим и квалитативна и семиквантитативна анализа експресије неутралних, сијало- и сулфомуцина. Добијене вриједности су кориштене за одређивање прогностичког значаја експресије лептин рецептора у односу на степен пролиферације, микроваскуларну густину, експресију муцина, као и у односу на класичне клиничке прогностичке параметре тумора.</p> <p>РЕЗУЛТАТИ: Умјерена и изражена експресија LEPR је нађена у сигнификантном броју случајева (77.3%) колоректалног аденокарцинома. Умјерена и изражена секреција сијаломуцина је нађена у 88% случајева колоректалног карцинома. У највећем броју случајева овог тумора верификована је асекреција</p>
--------------------	---

	<p>фукомуцина док је секреција сулфомуцина најчешће била присутна у трагу. Експресија LEPR је високо значајним и високо позитивним коефицијентима корелације повезана са индексом нуклеарног пролиферативног антигена (proIDX) и индексом неоангиогенезе (mvdIDX). Осим индекса пролиферације и неоангиогенезе, високо значајним коефицијентима корелације са LEPR експресијом су повезане и апсолутне вриједности експресије Ki67 и Ендоглина (CD105). Друга по значају је веза између експресије LEPR и хистохемијске експресије слабо кисјелих сијаломуцина. Повећање експресије LEPR је високо значајним позитивним коефицијентом корелације повезано са хиперсекрецијом сијаломуцина. Негативним, али статистички значајним коефицијентом корелације је LEPR експресија у вези са секрецијом јако кисјелих сулфомуцина. Умјерено високим и статистички високо значајним коефицијентима корелације експресија LEPR је повезана са стадијумом тумора по Astler-Coller класификацији, са метастазама захваћеним лимфним чворовима, перинеуралном инвазијом и удаљеним метастазама.</p> <p><b>ЗАКЉУЧАК:</b> Пораст експресије LEPR је праћен повећањем пролиферативне активности, повећаном неоангиогенезом, аберацијама у муцинској продукцији и порастом метастатског потенцијала колоректалног аденокарцинома.</p>
Извод:- ИД:	
Датум прихватања теме од стране ННВ- ДП:	26.03.2014.године
Датум одбране- ДО:	
Чланови комисије- КО:	<p>Проф.др Милан Кнежевић, председник Факултет медицинских наука Универзитета у Крагујевцу</p> <p>Доц.др Гордана Радосављевић, члан Факултет медицинских наука Универзитета у Крагујевцу</p> <p>Доц.др Милутин Булајић, члан Медицински факултет Универзитета у Београду</p>

**UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC  
FACULTY OF MEDICAL SCIENCES  
KEY WORDS DOCUMENTATION**

Accession number - ANO:	223/2009
Identification number -INO:	01-2798/3-5
Documentation type - DT:	Monographic publications
Type of record- TR:	Printed text material
Contents code -CC:	PhD Thesis
Author- AU:	Velimir Milošević, MD, MA
Menthor/co-mentor- MN	Ass prof. Miljan Krstić, MD, PhD
Title- TI:	<b>“Correlation of leptin receptor expression with proliferation, neoangiogenesis and mucin secretion in colorectal adenocarcinoma”</b>
Language of text- LT :	Serbian
Language of abstract - LA:	Serbian /English
Country of publication- CP:	Serbia
Locality of publication – LP :	Sumadia municipality
Publication year- PY:	2014
Publisher- PU:	Author reprint
Publication place- PP:	Kragujevac 34000,Svetozara Markovića 69
Physical description- PD:	176/8/22/21/45/323
Scientific field- SF:	Medicine,
Scientific discipline- SD:	Oncology, Gastroenterology
Subject/key words-SKW:	Colorectal carcinoma,leptin receptors, proliferation, neoangiogenesis, mucins
UDC	
Holding data- HD:	Faculty of medical sciences Library

Abstract- AB:

**INTRODUCTION:** Colorectal carcinoma is multifactorial disease which is a consequence of interreaction between hereditary and environmental factors. Numerous studies have confirmed significant linkage of this tumor with food intake habits, and it was observed that the risk for development of colorectal carcinoma in obese persons is 1,5-3,5 folds greater compared to normal weight persons. Key molecule in obesity development is leptin, product of obesity gene (ob), that acts through its receptors (LEPR).

**AIM:**Determination of LEPR expression and correlation of LEPR expression with proliferation, neoangiogenesis and mucin secretion in colorectal carcinoma.

**METHODS:** For research, we have used biopsies obtained from resected colorectal carcinomas from 75 patients treated in Clinic for Surgery of Clinical Center of Montenegro (CCMNE). For differentiation of histopathological processes,routine H&E method was used, and for investigation of LEPR expression, and expression of proliferation (Ki67) and angiogenesis marker (CD105),it has been used immunohistochemical ABC method with specific antibodies. For mucin differentiation, histochemical AB-PAS and HID-AB (pH 2,5) were used. For each single case were used classic prognostic parameters: tumor stage, histologic grade, presence of lymphatic, angio and perineural invasion, presence of metastasis in lymph nodes and liver, desmoplasia grade, necrosis and inflamation infiltrate. After quantitative analysis of LEPR expression, the density of Ki67 positive cells and density of microvascular structures per square milimeter was calculated stereometrically. Subsequently, qualitative and semiquantitative analisys of neutral, sialo and sulfomucins expression was performed. Obtained values were used for determination of prognostic significance of LEPR expression ragarding the degree of proliferation, microvascular density, mucin expression, and regarding the classic clinical prognostic parameters as well.

**RESULTS:** Moderate and pronounced LEPR expression was found in significant number of cases (77,3%) of colorectal carcinoma. Moderate and pronounced secretion of sialomucins was found in 88% of colorectal carcinoma cases. In majority of this tumor cases,no secretion of fucomucins was verified, while sulfomucins secretion was most often present in trace. LEPR expression is with highly significant and highly positive correlation coefficients related to nuclear proliferative antigen index (proIDX) and neoangiogenesis index (mvdIDX). Besides proliferation and neoangiogenesis index, with highly

	<p>significant correlation coefficients, LEPR expression is related to absolute values of Ki67 and Endoglin (CD105). Second by significance, is relation between LEPR expression and histochemical expression of weak acid sialomucins. Increasing of LEPR expression is with highly significant positive correlation coefficient related to sialomucins hypersecretion. With negative, but statistically significant correlation coefficient, LEPR expression is related to sulfomucins secretion. With moderate and statistically highly significant correlation coefficients, LEPR expression was related to tumor stage according to Astler-Coller classification, metastatic lymph nodes, perineural invasion and distant metastasis.</p> <p>CONCLUSION: Increasing of LEPR expression is followed by increasing of proliferative activity, increased neoangiogenesis, aberrations of mucin production and increasing of metastatic potential of colorectal adenocarcinoma.</p>
Note- N:	
Accepted by the Scientific Board on- ASB:	
Defended on- DE:	26.03.2014.
Thesis defended board (Degree/name/surname/title/faculty)-DB:	<p>Prof.dr Milan Knežević, president Faculty of Medical sciences University Kragujevac</p> <p>Ass. prof. Gordana Radosavljević, member Faculty of Medical sciences University Kragujevac</p> <p>Ass..prof. Milutin Bulajić, member Faculty of Medicine University of Belgrade</p>

## БИОГРАФСКИ ПОДАЦИ АУТОРА

Мр.сци.др Велимир Милошевић је рођен 13.3.1975 у Подгорици, где је са одличним успехом завршио основну школу и Гимназију. Медицински факултет је завршио 2000.год. у Београду са просечном оценом 9,3. У току студија је био више пута награђиван за постигнуте резултате и као студент је био учесник више студентских конгреса.

Академске магистарске студије је завршио на Факултету медицинских наука у Крагујевцу и 2005 год успешно одбранио магистарски рад под називом „Утицај полицикличног угљоводоника типа 9,10-dimethyl-1,2-benzanthracena на карциногенезу желуца“. Специјалистички испит из Интерне медицине је положио јуна 2006год у Београду, са највећом оценом. Субспецијализацију из Гастроентерохепатологије је завршио на Медицинском факултету у Београду октобра 2008год .

У склопу стручног усавршавања похађао је бројне радне обуке и континуиране едукације у земљи и иностранству, а читаву 2011.годину је провео у Риму у Поликлиници Gemelli, где је у «hands on training» програму обучен за извођење ендоскопске ретроградне холангиопанкреатографије (ЕРЦП) и других напредних ендоскопских метода под менторством професора Гвида Костамање (Guido Costamagna). Предавач је по позиву на многим стручним састанцима и публиковао је стручне и научне радове у часописима и зборницима са рецензијом, а бројне радове је усмено презентовао на међународним и домаћим скуповима.

Запослен је у Клиничком Центру Црне Горе на одељењу Гастроентерохепатологије . Од 2008год. , др Милошевић је и сарадник у настави на Медицинском факултету Универзитета у Подгорици, за ужу научну област Интерна медицина. Течно говори енглески и италијански језик. Ожењен је супругом Вером, отац кћерке Софије.



## ОБРАЗАЦ 1.

### ИЗЈАВА О АУТОРСТВУ

Потписник

Др Велимир Милошевић

Број одлуке и датум прихватања:

01-2798/3-5, 26.03.2014 године

ИЗЈАВЉУЈЕМ да је докторска дисертација под називом „Корелација експресије лептин рецептора са пролиферацијом, неоангиогенезом и секрецијом муцина у колоректалном аденокарциному“:

- Резултат сопственог истраживачког рада,
- Да предложена дисертација ни у целини, ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- Да су резултати коректно наведени и
- Да нисам кршио ауторска права нити користио интелектуалну својину других лица.

У Крагујевцу,

08.12.2014.године

Потпис аутора

Др Велимир Милошевић

---

## ОБРАЗАЦ 2.

### ИЗЈАВА О ИСТОВЕТНОСТИ ШТАМПАНЕ И ЕЛЕКТРОНСКЕ ВЕРЗИЈЕ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Потписник

Др Велимир Милошевић

Број одлуке и датум прихватања:

01-2798/3-5, 26.03.2014 године

Студијски програм:

Докторске академске студије

Наслов рада:

Корелација експресије лептин рецептора са пролиферацијом, неоангиогенезом и секрецијом муцина у колоректалном аденокарциному

Ментор:

Доц.др Миљан Крстић

ИЗЈАВЉУЈЕМ да је штампана верзија докторске дисертације истоветна електронској верзији коју сам предао за објављивање на порталу ДИГИТАЛНОГ РЕПОЗИТОРИЈУМА УНИВЕРЗИТЕТА У КРАГУЈЕВЦУ.

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

Ови лични подаци могу се објавити мрежним станицама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама универзитета у Крагујевцу.

У Крагујевцу,

08.12.2014.године

Потпис аутора  
Др Велимир Милошевић

---

### ОБРАЗАЦ 3.

#### ИЗЈАВА О КОРИШЋЕЊУ

ОВЛАШЋУЈЕМ Универзитетску библиотеку да у дигитални репозиторијум Универзитета у Крагујевцу унесе моју докторску дисертацију под насловом „Корелација експресије лептин рецептора са пролиферацијом , неoангиогенезом и секрецијом муцина у колоректалном аденокарциному“, која је моје ауторско дело.

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

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Крагујевцу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative commons), за коју сам се одлучио:

1. Ауторство
2. Ауторство- некомерцијално
3. Ауторство- некомерцијално- без прераде
4. Ауторство- некомерцијално-делити под истим условима
5. Ауторство- без прераде
6. Ауторство делити под истим условима

У Крагујевцу,  
08.12.2014.године

Потпис аутора  
Др Велимир Милошевић

---