

UNIVERZITET U BEOGRADU

MEDICINSKI FAKULTET

Aleksandar S. Bogdanović

PROGNOSTIČKI ZNAČAJ BIOMARKERA EPITELNO-  
MEZENHIMALNE TRANZICIJE KOD METASTATSKOG  
KOLOREKTALNOG KARCINOMA U JETRI

doktorska disertacija

Beograd, 2021



UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF MEDICINE

Aleksandar S. Bogdanovic

PROGNOSTIC SIGNIFICANCE OF THE EPITHELIAL-  
MESENCHYMAL TRANSITION BIOMARKERS IN  
COLORECTAL CANCER LIVER METASTASES

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2021



**MENTOR: Akademik prof. dr Zoran Krivokapić,**

redovni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

**ČLANOVI KOMISIJE:**

1. Prof. dr Vladimir Dugalić,  
vanredni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu
2. Akademik prof. dr Predrag Peško,  
Srpska akademija nauka i umetnosti
3. Doc. dr Danijel Galun,  
docent Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu
4. Dr Aleksandra Nikolić,  
viši naučni saradnik Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo,  
Univerzitet u Beogradu
5. Prof. dr Goran Stanojević,  
redovni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Nišu

*Zahvaljujem se ...*

*Akademiku prof. dr Zoranu Krivokapiću, svom mentoru i učitelju na svesrdnoj pomoći, ukazanom poverenju i prenetom iskustvu*

*Kolegijumu Klinike za digestivnu hirurgiju, a posebno kolektivu 7. odeljenja na podršci i pomoći*

*Aleksandri Nikolić i Jovani Despotović sa Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, na velikoj pomoći pri izradi celokupnog projekta*

*Svojoj porodici zbog ogromnog razumevanja, podrške i inspiracije*

## SAŽETAK

**Naslov:** Prognostički značaj biomarkera epitelno-mezenhimalne tranzicije kod metastatskog kolorektalnog karcinoma u jetri.

### Rezime

**Uvod:** Postoji malo podataka o ekspresiji markera epitelno-mezenhimalne tranzicije (EMT) kod bolesnika sa metastazama kolorektalnog karcinoma u jetri. Prognostički značaj markera EMT u predikciji brze progresije bolesti nakon tretmana sa kurativnom namerom je i dalje nerasvetljen.

**Ciljevi:** Proceniti ekspresiju i prognostički značaj *CDHI*, *FNI* i *VIM* kod bolesnika sa metastazama kolorektalnog karcinoma u jetri nakon resekcije jetre sa kurativnom namerom.

**Metodologija:** U ovu prospektivnu pilot studiju uključeno je trideset bolesnika sa metastazama kolorektalnog karcinoma u jetri lečenih resekcijom jetre sa kurativnom namerom. Prikupljeni su uzorak krvi, maligno metastatsko tkivo u jetri i netumorsko tkivo jetre neposredno uz metastazu. Ekspresija *CDHI*, *FNI* i *VIM* je analizirana kvantitativnom lančanom reakcijom polimeraze u realnom vremenu. Vrednosti su poređene između grupa formiranih prema različitim kliničko-patološkim karakteristikama.

**Rezultati:** Ekspresija *CDHI* je bila slična u malignom metastatskom tkivu jetre i netumorskom tkivu, dok je ekspresija *FNI* i *VIM* bila značajno niža u metastatskom tkivu ( $p=0.003$  i  $p<0.001$ , respektivno). Serumska ekspresija *CDHI* i *VIM* je detektovana kod 66.7% i 93.3% bolesnika, respektivno, dok *FNI* nije detektovan ni kod jednog bolesnika. Korelacija *CDHI* i *VIM* ekspresije između seruma i malignog metastatskog tkiva u jetri nije statistički značajna. Snižena ekspresija *CDHI* u malignom metastatskom tkivu i snižena ekspresija *VIM* u serumu su bile udružene sa ranim recidivom nakon hirurškog tretmana metastaza kolorektalnog karcinoma u jetri. Ekspresija *CDHI* u malignom metastatskom tkivu je nezavisni prediktor ranog recidiva godinu dana nakon resekcije jetre.

**Zaključak:** Snižena ekspresija *CDHI* u malignom metastatskom tkivu jetre i snižena ekspresija *VIM* u serumu su udružene sa ranim recidivom nakon resekcije jetre zbog metastaza kolorektalnog karcinoma. *CDHI* u malignom metastatskom tkivu jetre je nezavisni prediktor ranog recidiva.

**Ključne reči:** epitelno-mezenhimalna tranzicija; *CDH1*; *VIM*; *FNI*; kolorektalni karcinom; metastaze kolorektalnog karcinoma u jetri.

**Naučna oblast:** Medicinske nauke

**Uža naučna oblast:** Rekonstruktivna hirurgija

**UDK broj:**



## ABSTRACT

**Title:** Prognostic significance of the epithelial-mesenchymal transition biomarkers in colorectal cancer liver metastases.

### Summary

**Background:** There is limited data about expression of epithelial-mesenchymal transition (EMT) markers in patients with colorectal liver metastases (CRLM). Prognostic value of EMT markers in prediction of fast disease progression after curative-intent treatment is still not elucidated.

**Objective:** To evaluate the expression and prognostic significance of *CDHI*, *FNI* and *VIM* in patients with CRLM after curative-intent liver resection.

**Methods:** Thirty patients with CRLM managed by curative-intent liver resection were included in this prospective pilot study. Blood samples, malignant metastatic tissue in the liver and surrounding non-tumor liver tissue were collected. Expression of *CDHI*, *FNI* and *VIM* was analyzed by quantitative real-time polymerase chain reaction. Values were compared between groups created according to various clinico-pathological features.

**Results:** The expression of *CDHI* was similar in malignant metastatic tissue and non-tumor liver tissues, while *FNI* and *VIM* expression was significantly lower in metastatic tissue ( $p=0.003$  and  $p<0.001$ , respectively). Serum expression of *CDHI* and *VIM* was detected in 66.7% and 93.3% of patients, respectively, while *FNI* was not detected in any of the patients. The correlation of *CDHI* and *VIM* expression between malignant metastatic tissue and serum was not statistically significant. Decreased *CDHI* expression in malignant metastatic tissue and decreased *VIM* expression in serum was associated with early recurrence after surgical treatment of CRLM. *CDHI* expression in malignant metastatic tissue was independent predictor of early recurrence one year after liver resection.

**Conclusions:** Lower expression of *CDHI* in malignant metastatic tissue and lower serum expression of *VIM* were found to be associated with early recurrence after liver resection for CRLM. *CDHI* in malignant metastatic tissue is independent predictor of early recurrence.

**Keywords:** epithelial-mesenchymal transition; *CDHI*; *VIM*; *FNI*; colorectal liver metastasis; colorectal cancer.

**Research area:** Medical Science

**Specific research area:** Reconstructive surgery

**UDC number:**

## SADRŽAJ

<b>1</b>	<b>UVOD</b> .....	1
1.1.	Kolorektalni karcinom.....	1
1.1.1	Epidemiologija.....	1
1.1.2	Faktori rizika .....	5
1.1.3	Klasifikacija i stadijumi .....	7
1.2.	Metastaze kolorektalnog karcinoma u jetri .....	9
1.2.1	Funkcionalna anatomija jetre .....	9
1.2.2	Epidemiologija.....	11
1.2.3	Proces metastaziranja.....	12
1.2.4	Prognostički faktori i prediktivni markeri.....	13
1.2.5	Lečenje .....	14
1.3.	Epitelno-mezenhimalna tranzicija .....	26
1.3.1	Osnovi epitelno-mezenhimalne tranzicije.....	26
1.3.2	Uloga epitelno-mezenhimalne tranzicije u patogenezi kolorektalnog karcinoma .....	27
1.3.3	Epitelno-mezenhimalna tranzicija u metastatskom kolorektalnom karcinomu .....	30
<b>2</b>	<b>CILJEVI ISTRAŽIVANJA</b> .....	31
<b>3</b>	<b>MATERIJAL I METODE</b> .....	32
3.1	Dizajn studije.....	32
3.1.1	Vreme i mesto istraživanja.....	32
3.1.2	Ispitanici.....	32
3.1.3	Parametri u istraživanju .....	32
3.1.4	Uzorkovanje biološkog materijala .....	33
3.2	Genetička analiza.....	34
3.3	Praćenje bolesnika .....	35
3.4	Statistička analiza .....	36
<b>4</b>	<b>REZULTATI</b> .....	38

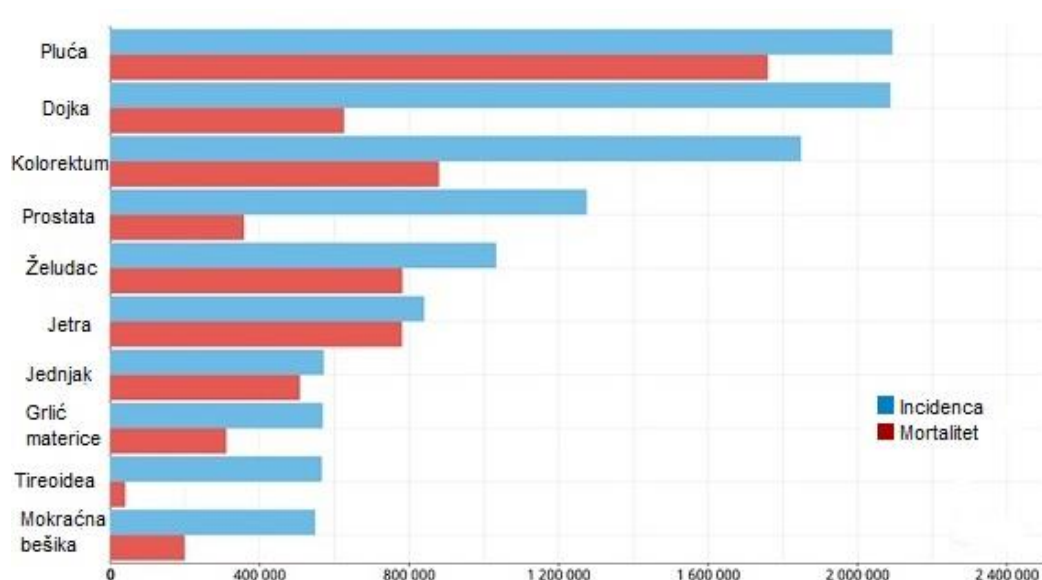
4.1	Karakteristike ispitivane grupe bolesnika .....	38
4.1.1	Opšte karakteristike .....	38
4.1.2	Karakteristike primarnog karcinoma .....	39
4.1.3	Karakteristike metastaza kolorektalnog karcinoma u jetri.....	43
4.2	Rezultati analize nivoa ekspresije genetičkih markera.....	51
4.2.1	Nivo ekspresije u malignom metastatskom tkivu .....	51
4.2.2	Nivo ekspresije u zdravom tkivu jetre .....	53
4.2.3	Nivo ekspresije u serumu .....	63
4.3	Korelacija nivoa ekspresije genetičkih markera u tkivima.....	64
4.4	Nivo ekspresije u zavisnosti od odgovora na preoperativnu hemioterapiju.....	67
4.5	Predikcija ranog recidiva bolesti .....	69
5	<b>DISKUSIJA</b> .....	81
6	<b>ZAKLJUČCI</b> .....	92
7	<b>LITERATURA</b> .....	93

# 1 UVOD

## 1.1. Kolorektalni karcinom

### 1.1.1 Epidemiologija

Karcinom debelog creva ili kolorektalni karcinom (KRK) je jedan od najčešćih maligniteta u zapadnim zemljama sveta. Na osnovu stope incidence standardizovane prema starosti koja iznosi 19.7 na 100000 stanovnika, karcinom debelog creva je četvrti karcinom u svetu.<sup>1</sup> Prema stopi mortaliteta od 9.7 na 100000 stanovnika, KRK je treći uzrok umiranja u svetu. Prema podacima Internacionalne agencije za istraživanje raka, 2018. godine je registrovano preko 1.8 miliona novoobolelih u svetu i 881000 umrlih od KRK (slika 1).<sup>2</sup> Prema aktuelnim predviđanjima, očekuje se da će do 2030-e, broj novoobolelih u svetu na godišnjem nivou dostići 2.2 miliona, što čini uvećanje od oko 20%.<sup>3</sup>



**Slika 1.** Ukupan broj novoobolelih i umrlih od najčešćih karcinoma u svetu u 2018. godini  
(preuzeto sa <https://gco.iarc.fr/today/>)

Stopa incidence je najveća u Australiji i Novom Zelandu (36.7/100000), potom slede Evropa (28.8-32.1), Istočna Azija (26.5) i Severna Amerika (26.2), dok je najniža stopa oboljevanja u Africi (6.4-9.3) i u Centralnoj i Južnoj Aziji (4.9/100000).<sup>4</sup> Kumulativni rizik od pojave KRK u svetu je 2.27% od rođenja do 74. godine života. Muškarci imaju povišen rizik oboljevanja od 2.75% a žene 1.83%. Ovaj rizik je najveći u zemljama gde je indeks ljudskog razvoja najveći (3.56% od 0-74 godine) a najmanji u zemljama sa niskim indeksom ljudskog razvoja (0.81% od 0-74 godine). Iako incidenca ostaje viša u razvijenijim zemljama sveta, trend je

stabilizovan pa čak i u opadanju, dok je porast incidence registrovan u nisko i srednje razvijenim zemljama, što odražava prihvatanje zapadnog stila života.

Rizik od pojave KRK se uvećava starenjem i on je deset puta veći kod osoba starijih od 85 godina u odnosu na mlađe od 50 godina. Prosečna starost u trenutku dijagnoze KRK kod muškaraca je 72, a kod žena 68 godina.

U 2018. godini broj umrlih od KRK čini 9.2% svih smrtnih slučajeva povezanih sa karcinomima, što ga čini drugim najčešćim uzrokom smrti među karcinomima.<sup>2</sup> Na osnovu trenda promene incidence i smrtnosti u svetu, izdvajaju se tri geografska obrasca: 1) porast incidence i mortaliteta poslednjih dekada (Baltičke zemlje, Rusija, Kina, Brazil), 2) porast incidence ali pad mortaliteta (Velika Britanija, Kanada, Danska, Singapur) i 3) pad incidence i pad mortaliteta (SAD, Francuska, Japan).

Prema podacima Svetske zdravstvene organizacije, a na osnovu Registra za karcinome u centralnoj Srbiji, broj novoobolelih u Srbiji u 2018. godini je bio 6049 u populaciji od 8762022 stanovnika. Broj novoobolelih je činio 12% svih novoobolelih od karcinoma u toj godini, što ga čini drugim najčešćim uzrokom obolevanja među karcinomima. Od toga je broj novoobolelih od karcinoma rektuma bio 3033 a od kolona 3016. U istoj godini je broj umrlih od KRK u Srbiji bio 3187. Kumulativni rizik od smrti od KRK je bio 0.88% za karcinom rektuma i 1.09% za karcinom kolona.

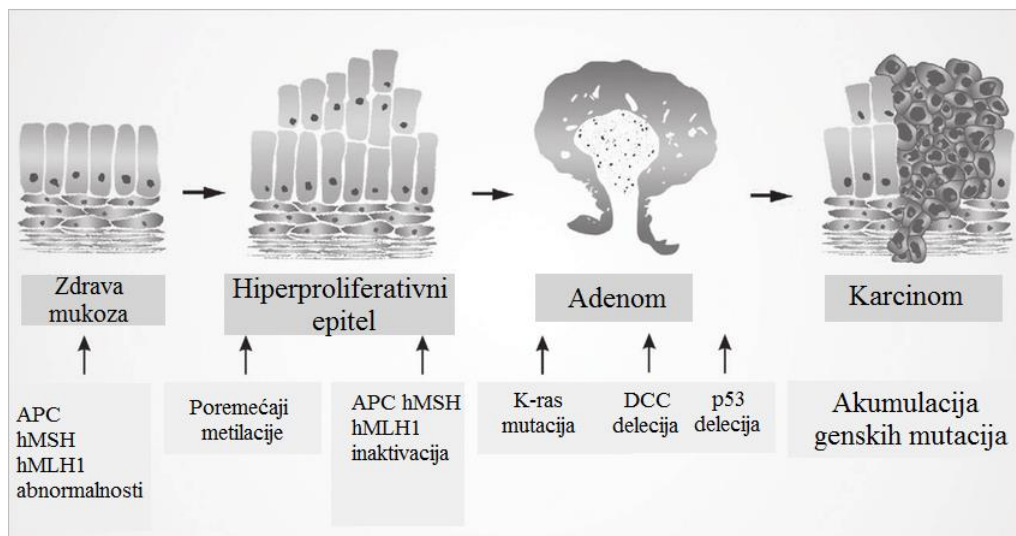
Prema podacima Američkog društva za kancer, ukupno 5-godišnje preživljavanje bolesnika sa karcinomom kolona je 64% a bolesnika sa karcinomom rektuma 67%.<sup>5</sup> Stopa preživljavanja varira u zavisnosti od stadijuma bolesti. Tako je 5-godišnje preživljavanje karcinoma kolona u stadijumu I i II 90%, 71% u stadijumu III ali značajno opada na 14% kod bolesnika sa udaljenim metastazama u stadijumu IV. Kod karcinoma rektuma, očekivano 5-godišnje preživljavanje u ranom stadijumu je 89% a kod bolesnika sa udaljenim metastazama samo 15%. Razlog je dugotrajna asimptomatska faza bolesti u kojoj karcinom ostaje nem i ne daje nikakve tegobe, dok se simptomi bolesti javljaju u uznapređenoj fazi bolesti. Testovi rane detekcije su i dalje ograničeno dostupni a većina država nema organizovane programe ranog otkrivanja KRK.

## Molekularna patogeneza

KRK se klasifikuje u sporadičnu, familijalnu i hereditarnu formu.

### *Sporadična forma KRK*

Sporadična forma karcinoma debelog creva je najzastupljenija i čini i do 60% svih karcinoma kolona i rektuma. Sporadični KRK najčešće nastaje iz benigne lezije-adenoma. Progresija adenoma u karcinom se odvija na dva načina: adenom-karcinom sekvenca (slika 2) i put seratnog adenoma. Prvi mehanizam je češći i uglavnom zastupljen kod karcinoma levog kolona i rektuma. Opisan je 1990. godine kao lanac događaja koji učestvuju u procesu transformacije od normalnog preko hiperplastičnog epitela do adenoma i karcinoma, i traje nekoliko decenija.<sup>6</sup> Genetičku osnovu ovog procesa čine sekvencijalne mutacije gena *APC*, *KRAS* i *TP53*. Seratni adenom je ređe zastupljeni mehanizam evolucije. Nastaje iz sesilnih polipa, dominantno kod karcinoma desnog kolona.



**Slika 2.** Transformacija normalnog epitela u karcinom<sup>7</sup>

Za ovu kompleksnu, multifaktorijalnu tranziciju i razvoj sporadične forme KRK odgovorni su sledeći molekularni mehanizmi: hromozomska nestabilnost (*engl.* chromosomal instability, CIN), mikrosatelitna nestabilnost (*engl.* microsatellite instability, MSI) i DNK metilacija u CpG (*engl.* 5'-C-phosphate-G-3') ostrvcima (*engl.* CpG island methylator phenotype, CIMP). Ovi mehanizmi se mogu međusobno preklapati i odgovorni su za genetičku nestabilnost adenoma koja vodi ka malignoj transformaciji.<sup>8</sup>

Hromozomska nestabilnost je prisutna kod oko 70% KRK. Rearanžiranje hromozoma se klasifikuje kao numerički CIN (pridobijanje ili gubitak celih hromozoma) ili strukturni CIN koji uključuje translokacije, inverzije, amplifikacije ili delecije sekvenci hromozoma. Ovi procesi dovode do promena u onkogenima, tumor-supresornim genima, genima DNK popravke i programirane ćelijske smrti-apoptoze.<sup>9</sup> Gubitak sekvenci u jednom od roditeljskih hromozoma rezultira stanjem koje se označava kao gubitak heterozigotnosti.

MSI je posledica inaktivacije gena koji su odgovorni za popravku grešaka nastalih u DNK. Na ovaj način je oštećen čitav mehanizam DNK reparacije što rezultira greškama koje ne mogu da se poprave i uvode ćeliju u stanje MSI. Originalno, MSI je otkrivena kao posledica germinativne mutacije MMR (*engl.* mismatch repair) gena u hereditarnom ne-polipoznom kolorektalnom karcinomu u sklopu Linčovog sindroma.

CIMP pozitivni KRK se karakteriše visokim stepenom metilacije u multiplim CpG ostrvcima u različitim tumor-supresornim genima.

#### *Familijalna forma KRK*

Familijalna forma karcinoma debelog creva je na drugom mestu po učestalosti i čini i do 30% bolesti.<sup>10</sup> Kod familijalnog karcinoma postoji pozitivna porodična anamneza na KRK ali se bolest ne može okarakterisati kao hereditarna. Kod ovih karcinoma najverovatnije postoji germinativna mutacija kao predisponirajući faktor ali ona još nije precizno identifikovana od strane istraživača.

#### *Hereditarna forma KRK*

Hereditarni KRK čini do 10% svih karcinoma debelog creva i uključuje: hereditarni ne-polipozni kolorektalni karcinom (HNPCKRK), adenomatozni polipozni sindrom (familijalna adenomatozna polipoza-FAP i MYH-udružena polipoza-MAP) i hamartomatozni polipoza sindrom (Peutz-Jeghers sindrom-PJS, juvenilni polipoza sindrom-JPS i hamartoma tumor sindrom-PHTS). Hereditarni oblici i njihove karakteristike su prikazani u tabeli 1.



**Tabela 1.** Hereditarni sindromi kolorektalnog karcinoma

Stanje	Gen	Nasleđivanje
Familijalna adenomatozna polipoza-FAP	APC	AD
Gardnerov sindrom (varijanta FAP)	APC	AD
Turcot sindrom (varijanta FAP)	APC, MLH1	AD ili AR
Hereditarni ne-polipozni kolorektalni karcinom (HNPKRK) - Linčov sindrom	MLH1, MSH2, MSH6, PMS2	AD
MYH udružena polipoza (MAP)	MUTYH, APC	AR
Juvenilni polipoza sindrom - JPS	SMAD4 (MADH4), BMPR1A (ALK3)	AD
Puc-Jegerov sindrom - PJS	STK11 (LKB1)	AD
Hamartoma tumor sindrom - PHTS	PTEN	AD

AD, autozomno dominantno; AR, autozomno recesivno

Najčešći hereditarni sindrom je HNPKRK, poznat kao Linčov sindrom. Nosioци ovog sindroma imaju 20% šanse da dobiju KRK do 50. godine a 50% posle 70. godine života. Sindrom podrazumeva i povišen rizik od drugih karcinoma, kao što su karcinom jednjaka, želuca, jajnika i endometrijuma. Odgovorni gen je tumor-supresorni APC gen.

FAP sindrom je drugi najčešći hereditarni oblik. Karakteriše se pojavom hiljade adenomskih polipa na debelom crevu koji su prekancerozna stanja. Rizik od nastanka KRK do 40 godine života je 100%.

### 1.1.2 Faktori rizika

U nastajanju KRK ulogu imaju genetički (nasledni) faktori i faktori sredine. Faktori rizika se mogu klasifikovati na one koji se ne mogu modifikovati (nepromenljivi) i one koji su podležni korekciji (promenljivi), pa kao takvi istovremeno predstavljaju faktore prevencije KRK.

#### *Nepromenljivi faktori rizika*

Prvu grupu čine nasledni faktori. Familijalne forme KRK se karakterišu 2-3 puta većim rizikom oboljevanja pojedinca ukoliko je KRK prisutan kod srodnika prvog stepena. Taj rizik raste ako je srodnik dobio KRK u mladosti. Povećan je rizik od oboljevanja i kod osoba sa naslednim (hereditarnim) sindromom, a dva najčešća su Linčov sindrom i FAP.

Drugu grupu čine starost i pozitivna lična anamneza na polipozu, KRK i inflamatorne bolesti creva. Približno 90% obolelih je starije od 50 godina. Podatak o prisustvu polipa debelog creva podrazumeva povišen rizik od nastanka KRK iako neće svaki polip maligno alterisati vremenom. Osoba koja je izlečena od kolorektalnog karcinoma ima povišen rizik od nastanka novog KRK u odnosu na pojedinca koji nije bolovao od ove maligne bolesti. Inflamatorne bolesti (ulcerozni kolitis i Kronova bolest) su predisponirajuća stanja za nastanak KRK.

### *Promenljivi faktori rizika i prevencije*

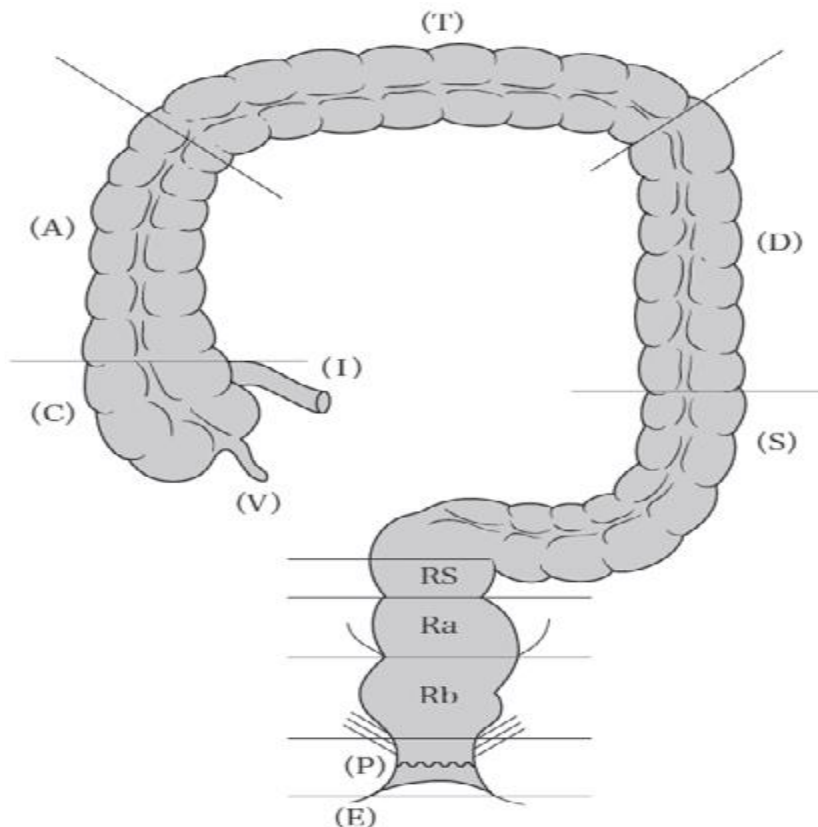
Faktori rizika koji se mogu korigovati su ishrana, gojaznost, fizička neaktivnost, dijabetes, konzumiranje alkohola. Aspirin smanjuje mogućnost nastanka KRK zbog antiinflamatornog efekta.

Ako u ishrani pojedinca dominiraju masti, crveno meso i mesne preradevine onda su oni izloženi povišenom riziku od nastanka KRK. Masti u hrani povećavaju sintezu holesterola i žučnih kiselina koje se metabolišu pod dejstvom crevne flore u toksične produkte podstičući proces ćelijske proliferacije i povećavajući rizik od maligne alteracije. Jedinjenja koja su zastupljena u crvenom mesu i preradevinama a imaju mutageni efekat na ćelije su nitrati, nitriti i heterociklični amini. Smatra se da unos mleka i mlečnih proizvoda smanjuje rizik od KRK. Savremeni način života diriguje nedovoljan unos svežeg voća i povrća koji su bogati vitaminima, mineralima, dijetetskim vlaknima i antioksidantima. Ove materije značajno smanjuju rizik od nastanka KRK. Epidemiološka studija Burkitt-a iz 1970. godine je pokazala da su Afrikanci iz ruralnih sredina manje oboljevali od KRK-a u odnosu na pripadnike britanske zajednice iz urbanih sredina.<sup>11</sup> Objašnjenje ove pojave su različite navike u ishrani. Sveža hrana bogata voćem i povrćem obezbeđuje unos dijetetskih vlakana koja zadržavaju vodu i toksične materije u lumen creva, prave volumen stolice, ubrzavaju pasažu kroz crevo i smanjuju ekspoziciju sluznice kolona kancerogenim materijama. Takođe, sve je više dokaza da različita hrana menja mikrofloru i utiče na stepen inflamacije u zidu creva.

Gojaznost kao bolest današnjice, fizička neaktivnost i dijabetes su međusobno povezani faktori čiji je pojedinačni efekat na pojavu KRK dokazan brojnim epidemiološkim studijama. Smatra se da konzumiranje alkohola povećava rizik od oboljevanja dok kancerogeni potencijal pušenja nije jasno dokazan.

### 1.1.3 Klasifikacija i stadijumi

Prema japanskoj klasifikaciji, karcinom kolona i rektuma se u odnosu na lokalizaciju anatomskog segmenta kolona i rektuma deli na karcinom: cekuma, ascendentnog kolona, transverzuma, descendentnog kolona i sigme (kolon), karcinom rektosigme, gornjeg i donjeg rektuma (rektum).<sup>12</sup> Klasifikacija prema lokalizaciji prikazana je na slici 3.



**Slika 3.** Kolorektalni karcinom u odnosu na lokalizaciju<sup>12</sup>

C, cekum; A, ascendus; T, transverzum; D, descedens; S, sigma; RS, rektosigma; RA, gornji rektum; Rb, donji rektum; P, analni kanal; E, perianalna koža

Kolorektalni karcinom je maligni tumor epitelnog porekla kolona i rektuma. Histopatološki, maligni epitelni tumor kolorektuma može biti: adenokarcinom, adenoskvamozni karcinom, skvamozni karcinom, karcinoidni tumor, karcinom endokrinih ćelija i drugi, neklasifikovani maligni epitelni tumori.<sup>12</sup> Adenokarcinom kolona i rektuma je najčešći histološki tip KRK. Prema histološkoj građi može biti: papilarni, tubularni, slabo-diferentovani, mucinozni, medularni i karcinom ćelija pečatnog prstena (*engl.* signet-ring cell carcinoma).

Adenokarcinom čini više od 90% karcinoma kolorektuma. Karakteriše se žlezdanim strukturama na osnovu kojih se određuje histološki gradus. Dobro diferentovani

adenokarcinom je uglavnom (preko 95%) sačinjen od žlezdanih struktura. Umereno diferentovani adenokarcinom pokazuje 50-95% glandularnu građu dok je kod slabo diferentovanog žlezdana struktura zastupljena sa manje od 50%. Najčešći adenokarcinom u kliničkoj i patološkoj praksi je umereno diferentovani.<sup>13</sup>

Najznačajnija prognostička klasifikacija tumora je TNM sistem utvrđivanja stadijuma bolesti. U TNM klasifikaciji koja je pretrpela i osmo izdanje, T je parametar primarnog tumora, N se odnosi na limfne noduse a M na udaljene metastaze (tabela 2).

**Tabela 2.** TNM klasifikacija kolorektalnog karcinoma; Osmo izdanje<sup>14</sup>

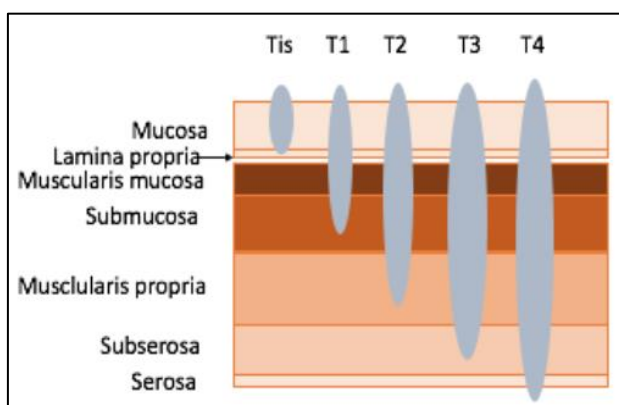
Primarni tumor (T)	
Tx	Primarni tumor ne može biti procenjen
T0	Nema dokaza o primarnom tumoru
Tis	Karcinom in situ
T1	Tumor zahvata submukozu
T2	Tumor zahvata muscularis propriu
T3	Tumor probija muscularis propriu
T4	Tumor direktno zahvata druge strukture ili organe
T4a	Tumor zahvata visceralni peritoneum
T4b	Tumor direktno zahvata ili adherira druge organe ili strukture
Regionalni limfni nodusi (N)	
Nx	Regionalni limfni nodusi ne mogu biti procenjeni
N0	Nema metastaza u regionalnim limfnim nodusima niti tumorskih depozita
N1	1-3 metastatska limfna nodusa
N1a	1 metastatski limfni nodus
N1b	2-3 metastatska limfna nodusa
N1c	Nema metastatskih regionalnih limfnih nodusa ali su prisutni tumorski depoziti
N2	≥4 metastatska limfna nodusa
N2a	4-6 metastatskih limfnih nodusa
N2b	≥7 metastatskih limfnih nodusa
Udaljene metastaze (M)	
M1	Postoje udaljeni metastatski limfni nodusi
M1a	Metastaze ograničene na jedan organ

M1b	Metastaze dva ili više organa
M1c	Peritonealne metastaze

Drugi prognostički markeri su: vaskularna, limfatična i perineuralna invazija, tumorski depoziti, mikrosatelitna nestabilnost, karcinoembrioni antigen.

**Tabela 3.** Klasifikacija prema Internacionalnoj uniji protiv raka (*franc.* Union Internationale Contre le Cancer UICC) /levo/. Dubina tumorske invazije T /desno/

Stadijum	T	N	M
0	Tis	N0	M0
I	T1-2	N0	M0
IIA	T3	N0	M0
IIb	T4a	N0	M0
IIC	T4b	N0	M0
IIIA	T1-2	N1/1c	M0
	T1	N2a	M0
IIIB	T3-4a	N1/1c	M0
	T2-3	N2a	M0
	T1-2	N2b	M0
IIIC	T4a	N2a	M0
	T3-4a	N2b	M0
	T4b	N1-2	M0
IVA	Bilo koji T	Bilo koji N	M1a
IVB	Bilo koji T	Bilo koji N	M1b
IVC	Bilo koji T	Bilo koji N	M1c



## 1.2. Metastaze kolorektalnog karcinoma u jetri

### 1.2.1 Funkcionalna anatomija jetre

Topografska (morfološka) anatomija jetre je definisana strukturama koje se nalaze na površini jetre. Na osnovu toga jetra ima četiri režnja: desni, levi, kvadratni i repati (kaudatni). Srpasti (falciformni) ligament koji pripaja prednju stranu jetre za prednji trbušni zid deli jetru na dva režnja, desni i levi. Sa visceralne strane se nalaze dva pomoćna režnja, kvadratni, koji je lokalizovan ispred porte jetre (hilusa) i repati, koji se nalazi iza porte jetre. Vena porte,

hepatična arterija i zajednički hepatični vod ulaze u jetru u sklopu hepatoduodenalnog ligamenta koji čini desnu stranu malog opornjaka (omentuma). Elementi hepatoduodenalnog ligamenta pre ulaska u hilus jetre se dele na dve grane, čineći levi i desni pedikl koji ulaze u jetru i nastavljaju dalje granjanje.

Danas su znanja o anatomiji jetre proširena. Operacije na jetri se planiraju na osnovu znanja o funkcionalnoj (hirurškoj) anatomiji. Kantli je još 1897. godine potvrdio da se jetra sastoji od dva skoro jednaka režnja i da granica između njih nije srpasti ligament, već linija koja se pruža od sredine lože žučne kese do suprahepatičnog segmenta donje šuplje vene.<sup>15</sup> Obzirom da pojam „lobus“ pripada topografskoj anatomiji i označava deo organa ograničen fisurom, sulkusom ili ligamentom, u funkcionalnoj anatomiji, jetra se deli na levu i desnu, na osnovu područja irigacije vene porte i hepatične arterije. Dakle, vaskularizacija jetre određuje prisustvo i granice anatomskih celina, a ne morfološke strukture na njenoj površini. Iako se originalni naziv „Cantlie-jeva linija“ u današnjoj literaturi zadržao, ispravno je koristiti pojam „ravan“ da bi se označila dvodimenzionalnost u razgraničavanju leve i desne jetre.

Desna i leva jetra su podeljene na po dva sektora ravnima koje projektuju pravac pružanja hepatičnih vena i koje su originalno označene kao scizure. Glavna scizura se pruža duž projekcije medijalne vene, poklapa se sa Kantlijevom ravni i deli jetru na levu i desnu. Desna scizura se poklapa sa desnom hepatičnom venom i deli desnu jetru na prednji i zadnji sektor. Leva scizura projektuje pravac leve hepatične vene i deli levu jetru na medijalni i lateralni sektor. Sektori su podeljeni na segmente. Francuski anatom Klod Kvino je opisao osam segmenata jetre.<sup>16</sup>

Internacionalna hepato-pankreato-bilijarna asocijacija je 1998. godine ustanovila Komitet koji je predložio novu anatomsku terminologiju. Na Kongresu u Brizbejn 2000. prihvaćena je univerzalna “Terminologija anatomije jetre i resekcija - Brizbejn 2000”.<sup>17</sup> Terminologija je zasnovana na unutrašnjoj anatomiji, na arterijskoj i bilijarnoj arborizaciji, a postoji dodatak sa terminologijom zasnovanom na portnoj vaskularizaciji. Najvažniji principi podele jetre na funkcionalne celine prikazani su u tabeli 4.

**Tabela 4.** Anatomska klasifikacija i podela jetre

	Sektorski (Kvino)	Segmentni	Brizbejn
I red	desna jetra	desni lobus	desna jetra
	leva jetra	levi lobus	leva jetra
II red	prednji sektor	prednji segment	desna prednja sekcija
	zadnji sektor	zadnji segment	desna zadnja sekcija
	medijalni sektor	medijalni segment	leva medijalna sekcija (Sg4)
	lateralni sektor	lateralni segment	leva lateralna sekcija (Sg2,3)
III red	segment (Sg1-8)	subsegment (1-8)	segment (Sg 1-8)

### 1.2.2 Epidemiologija

Prisustvo udaljenih metastaza kolorektalnog karcinoma predstavlja uznapredovali – IV stadijum bolesti. Udaljene metastaze nastaju hematogenom diseminacijom karcinomskih ćelija iz primarnog tumora. Jetra je najčešće zahvaćena udaljenim metastazama zbog specifičnosti abdominalne vaskularizacije. Smatra se da trećina bolesnika u stadijumu IV bolesti ima metastaze samo u jetri, trećina van jetre a trećina u jetri i u drugim organima kao što su pluća, udaljeni limfni nodusi, kosti, mozak, peritoneum i drugi. Karcinom kolona češće daje metastaze u jetri, dok karcinom rektuma ima veću učestalost metastaza u plućima i kostima.<sup>18</sup> Prisustvo metastaza KRK u plućima podrazumeva veću mogućnost od pojave metastaza u kostima i mozgu. Metastaze u peritoneumu su češće udružene sa karcinomom kolona. U norveškoj studiji, registrovana je veća učestalost metastaza u jetri kod levostranog karcinoma kolona.<sup>19</sup>

Metastaze KRK u jetri se češće javljaju kod muškaraca. Smatra se da je razlog tome veća učestalost KRK u muškom polu.<sup>20</sup> Prisustvo metastaza u jetri je češće kod mlađih bolesnika sa KRK kod kojih se primarni karcinom inicijalno dijagnostikuje u uznapredovalom stadijumu a period od pojave simptoma do dijagnoze je duži.<sup>21</sup>

Metastaze u jetri su glavni uzrok smrti bolesnika sa KRK. Populacione studije iz zapadnoevropskih zemalja su pokazale da se metastaze KRK u jetri javljaju kod 24-27% bolesnika.<sup>22,23</sup> Sinhronne metastaze su metastaze detektovane u trenutku ili pre dijagnoze primarnog KRK. Rane metahrone metastaze su metastaze detektovane do 12 meseci od dijagnoze KRK a kasne metahrone su detektovane nakon godinu dana od dijagnoze KRK.<sup>24</sup> Incidenca sinhronih metastaza je u porastu zbog boljih dijagnostičkih tehnika pa se smatra da

oko 20% bolesnika sa KRK ima metastatsku bolest u trenutku dijagnoze primarnog karcinoma. Bolesnici sa sinhronim metastazama u jetri obično imaju uznapredovali stadijum primarnog karcinoma i multiple i velike metastaze u jetri. Oko 85% metahronih metastaza se otkrije u prvoj godini nakon dijagnoze KRK, 94% u toku prve dve godine a 97% u toku prve tri godine.<sup>22</sup> Smatra se da će oko 2% bolesnika dobiti metastaze u jetri između 5. i 10. godine nakon dijagnoze KRK, zbog čega je definisan minimalni period praćenja od 10 godina.

### 1.2.3 Proces metastaziranja

Još je davne 1889. godine Stefan Padžet opisao teoriju semena i podloge (*engl.* “seed and soil”).<sup>25</sup> On je pretpostavio da metastaze u udaljenom organu nisu slučajan događaj, već da tumorske ćelije (seme) ciljano naseljavaju mikrookruženje udaljenog organa (podloga), te je zaključio da metastaze nastaju samo kada je odgovarajuće “seme” zasejano na odgovarajućoj “podlozi”.

Proces metastaziranja malignih ćelija u jetri karakterišu dve niše: premetastatska i post-invazivna. Premetastatska niša je regulisana faktorima koje sekretuje primarni tumor a oni regrutuju ne-parenhimske ćelije tkiva jetre: Kupferove ćelije, stelatne hepatične ćelije, supresorske ćelije porekla mijeloida i neutrofile. Postinvazivna niša se odigrava nakon ulaska malignih ćelija u jetru i deli se na 4 faze: mikrovaskularna; ekstravaskularna pre-angiogena, angiogena i faza rasta.<sup>26</sup>

*Mikrovaskularna faza.* Kada maligne ćelije dospeju u mikrocirkulaciju jetre, susreću se sa raznim ćelijama (Kupferove ćelije, ćelije prirodne ubice, sinusoidne endotelne ćelije) koje ih mogu eliminisati fagocitozom, lizom ili indukcijom apoptoze azotnim oksidom, interferonom  $\gamma$  ili faktorom tumorske nekroze  $\alpha$ . Maligne ćelije mogu se vezati svojim receptorima za endotelne ćelije, izbeći tumorocidne mehanizme i procesom dijapedeze i ekstravazacije mogu migrirati u ekstravaskularni Disse-ov prostor.

*Ekstravaskularna pre-angiogena faza.* Pod dejstvom proinflamatornih citokina, stelatne ćelije Disse-ovog prostora se aktiviraju i sekretuju kolagen i fibronektin, čime se formiraju “skele” za migraciju endotelnih ćelija, angiogenezu i rast ekstravaskularne metastaze. Glavnu ulogu imaju faktori tumorske nekroze  $\alpha$  i  $\beta$ .



*Angiogena faza.* Aktivirane stelatne ćelije, Kupferove ćelije i makrofagi udruženi sa tumorom oslobađaju angiogene faktore kao što su faktor rasta fibroblasta i vaskularni faktor rasta. Oni su okidači procesa neovaskularizacije.

*Faza rasta.* U fazi rasta maligne ćelije sekretuju citokine koji će inhibirati ili čak blokirati T ćelijski odgovor (CD4+ pomoćne limfocite i CD8+ citotoksične limfocite). Proliferacija malignih ćelija se odigrava pod kontrolom sledećih faktora: insulinu sličan faktor rasta, epidermalni faktor rasta, hepatocitni faktor rasta. Oni se vezuju za maligne ćelije i indukuju mitotsku aktivnost.

#### **1.2.4 Prognostički faktori i prediktivni markeri**

Bolesnici sa neresektabilnim metastazama u jetri bez primene sistemske terapije imaju izuzetno lošu prognozu i prosečno preživljavanje od 6 do 12 meseci. Razvoj sistemske terapije je omogućio bolju kontrolu i palijaciju uznapredovale bolesti a ukupno preživljavanje je produženo na 24-32 meseca, u zavisnosti od karakteristika tumora i primenjenih lekova.<sup>27,28</sup> Primenom hirurškog lečenja kao jedine potencijalno kurativne vrste tretmana, u kombinaciji sa drugim modalitetima, moguće je postići 5-godišnje preživljavanje i preko 50%.<sup>29</sup>

U preglednom radu portugalskih autora, analizirano je 18 prognostičkih skorova i jedan normogram, koji su obuhvatili 30 kliničkih i patohistoloških prognostičkih parametara.<sup>30</sup> Najzastupljeniji prognostički faktor je broj metastaza u jetri. Značajna je razlika u preživljavanju bolesnika sa solitarnom metastazom i sa multiplim metastazama. Pozitivan limfonodalni status je negativan prognostički prediktor. Tumorski marker CEA negativno utiče na prognozu, a prognostička granična vrednost mu je 200ng/mL. Kao značajni prognostički parametri uvršteni su: promer najveće metastaze, prisustvo ekstrahepatične bolesti, bilobarna distribucija bolesti, sinhrona prezentacija bolesti, interval od dijagnoze primarnog karcinoma do pojave metastaza, resekciona margina, stepen histološke diferentovanosti primarnog karcinoma, pozitivni limfni nodusi u hepatičnom slivu.

Idealni prognostički skor ne postoji. Jedan od najcitiranijih skorova je kreirao Fong.<sup>31</sup> Fong-ov skor obuhvata pet kliničkih varijabli: broj metastaza, promer najveće metastaze, nivo CEA, pozitivan limfonodalni status primarnog karcinoma i period od resekcije KRK do pojave metastaza u jetri. Sasaki i saradnici su predložili tzv. *Tumor Burden score* koji obuhvata samo dve varijable – promer najveće metastaze i broj metastaza u jetri, i pokazali njegovu odličnu

diskriminatornu snagu.<sup>32</sup> Svi skorovi imaju svoja ograničenja kao što su retrospektivni dizajn, veličina uzorka, zavisnost od aktuelnih terapijskih režima i drugi. Klinički značaj ovih skorova je upitan. Bolesnici u istom kliničkom stadijumu bolesti pokazuju različit ishod lečenja. Objašnjenje je da metastatsko tkivo u jetri poseduje visok stepen biološke heterogenosti. Upravo ta molekularna raznolikost karcinoma u istom stadijumu je uzrok različitog preživljavanja bolesnika i različitog odgovora na terapiju.

Grupa autora iz MD Anderson Cancer Centra u Teksasu je u preglednom radu opisala glavne karakteristike nekoliko biomarkera koji imaju prognostički značaj ali i prediktivni potencijal u odgovoru na sistemska terapiju.<sup>33</sup> *BRAF* je proteinska kinaza u mitogen-aktiviranom protein kinaza signalnom putu. Bolesnici sa *BRAF* mutiranim statusom imaju kraće preživljavanje i goru prognozu nakon potencijalno kurativnog hirurškog lečenja. Oni retko imaju metastaze ograničene na jetru zbog čega često razvijaju multiple metastaze u drugim organima nakon resekcije jetre. Mikrosatelitna nestabilnost je posledica oštećenja gena odgovornih za popravku DNK. Često je udružena sa *BRAF* mutacijom. U toku su opsežna istraživanja o primeni imunoterapije kod bolesnika sa visokim stepenom MSI. Mutacije *RAS* familije proto-onkogena (*KRAS*, *NRAS*, *HRAS*) su prisutne kod 35-45% kolorektalnih karcinoma. Mutacije u genu *KRAS* su odgovorne za rezistenciju na tretman antitelima na epidermalni faktor rasta. Svakako, bolesnici sa metastazama KRK u jetri koji su nosioci *RAS* mutacije imaju goru prognozu nakon resekcije jetre. Poznavanje *RAS* statusa je važno kod odluke o primeni preoperativne biološke terapije ali i u samom planiranju resekcije jetre. Mutiran *RAS* status je udružen sa većim procentom pozitivne hirurške margine što nam ukazuje na invazivnu prirodu *RAS* mutiranih metastaza. Gen *APC* sled mutacije aktivira Wnt molekularni put, što se dešava u ranoj fazi karcinogeneze KRK. Mutacije *APC* gena su prisutne i kod bolesnika sa metastazama KRK u jetri i povezane su sa prognozom nakon hirurškog lečenja.

### 1.2.5 Lečenje

U lečenju metastaza kolorektalnog karcinoma u jetri se koriste sledeće metode: resekcija jetre (hirurška metoda lečenja), sistemska terapija, lokalno-regionalni oblik lečenja (interventne radiološke procedure: termalna ablacija navođena ultrazvukom ili skenerom, transarterijska hemoembolizacija i hemioterapija (HT) hepaticnom arterijskom infuzijom) i palijativno zbrinjavanje.

### *Istorijska perspektiva*

*Sistemska terapija.* Tokom 90-ih godina i početkom 2000-ih, klinička praksa je podrazumevala primenu 5-Fluorouracila (5-FU) u kombinaciji sa leukovorinom. Studije su pokazale duže preživljavanje i bolji kvalitet života primenom ove terapije. U drugom delu ovog vremenskog perioda objavljene su studije koje su dokazale da dodatak dva citostatska leka, Oksaliplatina ili Irinotekana u sklopu preparata FOLFOX i FOLFIRI produžava period do progresije bolesti bolesnika sa metastatskim KRK. Ukupno preživljavanje je produženo sa 12 na 24 meseca.<sup>34</sup> Dalji korak u napretku sistemske terapije je bio uvođenje biološke terapije u kliničku praksu. Bevacizumab (monoklonsko antitelo na vaskularni faktor rasta), Cetuximab i Panitumumab (monoklonska antitela na epidermalni faktor rasta) su biološki lekovi koji se dodaju citostatskoj hemioterapiji i obezbeđuju duže ukupno preživljavanje i veći procenat bolesnika sa povoljnim odgovorom na sistemsku terapiju. U toku su bazična ispitivanja imunološke terapije a rezultati kliničkih studija se očekuju.

*Hirurško lečenje.* Prvi pokušaji da se resekira parenhim jetre zbog metastaza KRK su bili 70-ih i 80-ih godina prošlog veka. Uslov da se bolesnici sa metastatskim KRK podvrgnu resekciji je bio da ova procedura postane bezbedna i sigurna intervencija. Nakon što su objavljene serije sa malim gubitkom krvi tokom operacije, što je inače bio glavni razlog mortaliteta, indikaciona područja za resekciju jetre su mogla da se šire. Verovalo se u početku da je prisustvo metastaze znak diseminovane bolesti i da operacija na jetri nema efekta u lečenju. Međutim, autopsije su pokazale upravo suprotno, da kod određene grupe leševa, metastaze su bile prisutne samo u jetri. Tako da su 90-ih i početkom 2000-ih objavljene brojne serije sa velikim uzorkom koje su definitivno potvrdile kako sigurnost tako i efektivnost resekcije jetre u lečenju bolesnika sa metastazama KRK. Kao što je opisano u prethodnom pasusu, u tom periodu je aktuelizovano multimodalno lečenje pa su bolesnici primali sistemsku terapiju pre i/ili posle resekcije jetre. Uspeh lečenja je postao sve bolji, a dugoročno preživljavanje duže. Resekcija jetre je prepoznata kao zlatni standard u tretmanu kolorektalnih metastaza u jetri. Danas, ovaj koncept ostaje da važi. Resekcija jetre sa kurabilnom namerom je jedini oblik lečenja koji nudi mogućnost dugoročnog preživljavanja i potencijalno definitivno izlečenje.

Povoljni rezultati hirurškog lečenja su dobijeni analizom strogo selektovanih slučajeva. U početku je kriterijum za operativno lečenje bio prisustvo jedne metastaze do 3cm, potom do 5cm, a zatim se indikaciono područje širilo na do tri metastaze.<sup>35</sup> Značajan deo bolesnika koji nisu zadovoljavali ove kriterijume je bio lečen ili sistemsom terapijom ili palijativno, bez

izgleda za definitivnim izlečenjem. Formirani su različiti prognostički skorovi koji su pomagali kliničarima u selekciji bolesnika za operaciju, a na osnovu podataka o rasprostranjenosti metastaza. U kasnijim godinama bilobarna bolest, prisustvo ekstrahepatične bolesti i multiple metastaze nisu više bile jasne kontraindikacije za resekciju jetre. Dogodila se promena paradigme. Akcenat je pomeren sa onog što se uklanja prilikom resekcije na ono šta ostaje (tabela 5). Iz toga je proistekla definicija resektabilnosti metastaza koja se odnosi na volumen i funkciju parenhima jetre koja ostaje nakon resekcije. Parametri koji su bili kriterijumi resektabilnosti postaju prognostički faktori, opisani u jednom od prethodnih poglavlja.

**Tabela 5.** Tradicionalne i savremene indikacije za resekciju jetre kod kolorektalnih metastaza

Tradicionalne indikacije	Moderne (proširene) indikacije
Broj metastaza $\leq 3$ , unilobarne	Bez ograničenja u broju metastaza
Dijametar metastaza $\leq 5$ cm	Bez ograničenja u promeru metastaza
Bez ekstrahepatične bolesti	Resektabilna ekstrahepatična bolest
Resekciona margina $\geq 1$ cm	Negativna resekciona margina
Ograničen volumen rezidualne jetre	Moguća hipertrofija rezidualne jetre (PVO)*
Metahrone metastaze	Sinhronne i metahrone metastaze
Odsustvo makrovaskularne invazije	Vaskularne resekcije i rekonstrukcije

\*PVO, portovenska okluzija: embolizacija ili ligatura

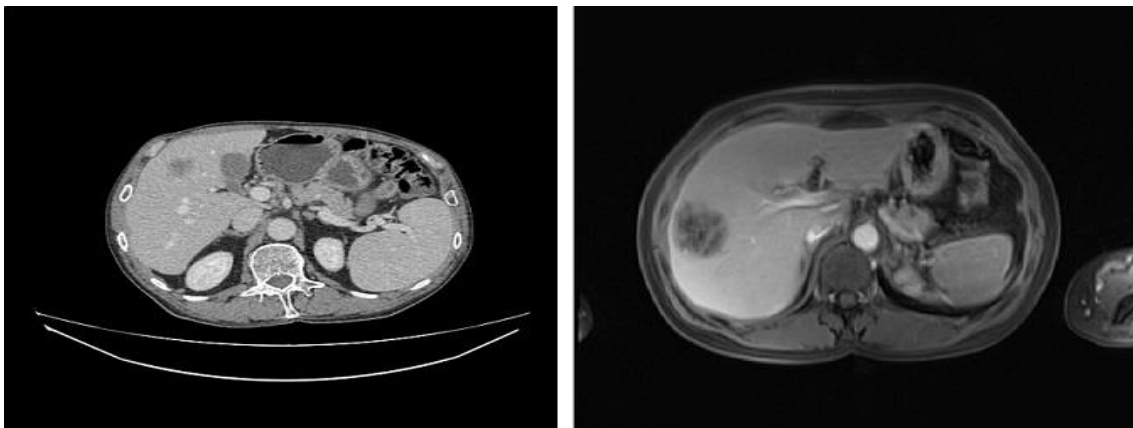
Zahvaljujući multidisciplinarnom pristupu i primeni različitih oblika lečenja koji su komplementarni, a gde resekcija zauzima centralno mesto, danas je moguće ostvariti ukupno 5-godišnje preživljavanje i preko 50%.<sup>29</sup> Preživljavanje je poboljšano i kod bolesnika sa metastazama u plućima ali i sa peritonealnom diseminacijom bolesti, zahvaljujući citoreduktivnoj hirurgiji i intraperitonealnoj hemioterapiji.

#### *Multidisciplinarni pristup u lečenju*

Odluku o lečenju donosi multidisciplinarni tim sačinjen od hirurga, onkologa, radiologa, gastroenterologa i patologa. Plan lečenja se donosi na osnovu dva ključna parametra: opšte zdravstveno stanje bolesnika i rasprostranjenost tumora koji se definiše kliničkim stadijumom bolesti-cTNM. Sve veći značaj u planiranju lečenja imaju i molekularni markeri koji pokazuju prognostički potencijal i osetljivost tumora na sistemsku terapiju. *KRAS* i *BRAF* su već uvedeni u kliničku praksu.

*Evaluacija bolesnika i utvrđivanje stadijuma bolesti.* Procena opšteg stanja bolesnika se sprovodi utvrđivanjem “performans” statusa, prisustva pridruženih bolesti, funkcionalnog statusa jetre i drugih vitalnih organa. cTNM stadijum se utvrđuje primenom vizuelizacionih, odnosno “imaging” metoda: kompjuterizovana tomografija (KT), magnetna rezonanca (MR) i pozitronska emisiona tomografija (PET).<sup>36</sup>

KT je najčešće primenjivana metoda u utvrđivanju stadijuma bolesti. Pre početka lečenja potrebno je uraditi KT pregled regija grudnog koša, trbuha i male karlice uz kontrastno pojačanje. Metastaze KRK se najjasnije vide u portnoj fazi kao hipodenzne lezije unutar kontrastom prebojenog parenhima jetre. KT ima ograničenu sposobnost detekcije kod lezija manjih od 10 mm i pored mogućnosti da debljina preseka bude 1 mm (slika 4, levo).



**Slika 4.** Presentacija solitarne hipodenzne metastaze u jetri u portovenskoj fazi na kompjuterizovanoj tomografiji (levo); presentacija metastaze u jetri magnetnom rezonancom uz primenu hepatospecifičnog kontrastnog sredstva (desno)

Osnovne karakteristike MR prezentacije metastaza su: hipointenzni signal u T1 sekvenci a hiperintenzni u T2, restrikcija difuzije u difuziono otežanoj sekvenci (DWI, *engl.* diffusion-weighted imaging) i hipoatenuacija u toku kontrastnog snimanja MR-a primenom kontrasta na bazi gadolinijuma (slika 4, desno). Prednost MR pregleda je mogućnost detekcije manjih lezija, bolja karakterizacija promena u slučaju nejasne dijagnoze, bolja procena odgovora metastaza nakon primene hemioterapije, veća senzitivnost u slučaju steatoze jetre ili post-hemioterapijskog oštećenja parenhima jetre (sindrom “plave jetre” nakon primene oksaliplatina). Mana mu je loša senzitivnost u detekciji ekstrahepatične bolesti pa se ne preporučuje kao prva dijagnostička metoda pri određivanju stadijuma bolesti.

PET skener koristi analog glukoze (18FDG) kao radiofarmak. Osnovna mera metaboličke aktivnosti tumora je standardizovana vrednost preuzimanja (*engl.* standardized uptake value, SUV). Glavna prednost je detekcija ekstrahepatičnih lezija sa senzitivnošću i do 97%. Ograničena je upotreba PET KT-a kod lezija manjih od 10mm i kod tumora koji proizvode mucin, čiji procenat nije zanemarljiv.

Imaging metode imaju značajnu ulogu u proceni odgovora na sistemsku terapiju ali i u praćenju bolesnika nakon sprovedenog radikalnog hirurškog lečenja. Odgovor tumora se procenjuje primenom RECIST kriterijuma.<sup>37</sup> RECIST definiše odgovor metastaze kao promenu veličine. Mogući odgovor je progresija bolesti, stabilna bolest, parcijalni odgovor i kompletan odgovor. Smatra se da bolji uvid u odgovor tumora na sistemsku terapiju daje analiza morfoloških, unutartumorskih promena. U tu svrhu prednost ima MR pregled.

KT pregled po standardnom protokolu omogućava softversku obradu podataka i izradu KR volumetrije jetre. KT volumetrija nije rutinski alat ali se primenjuje pre planirane velike resekcije jetre. Na osnovu ovog merenja, određuje se ukupni volumen jetre i volumen budućeg ostatka jetre, kao i njihov odnos. U većini centara u svetu minimalni volumen jetre koja ostaje je 25% a u slučaju oštećenja parenhima 30-40%. Neki autori savetuju da je odnos volumena jetre i ukupne telesne mase precizniji u proceni rizika od postoperativne insuficijencije jetre nakon velikih resekcija. Svakako, volumen jetre koja ostaje nije uvek odraz njene funkcije, posebno kod posthemioterapijskog oštećenja parenhima. Iz tih razloga se u planiranju velike resekcije jetre KT volumetrijska procena dopunjuje funkcionalnim testovima od kojih je najpoznatiji u svetu klirens indocijanin zelenog. Zahvaljujući tome, stopa postoperativne insuficijencije jetre zbog nedovoljnog volumena („small for size” sindrom) a samim tim i stopa postoperativnog mortaliteta su svedene na minimum.

*Selekcija bolesnika.* Nakon procene opšteg stanja bolesnika i cTNM stadijuma, hepatalni hirurg, kao deo multidisciplinarnog tima je dužan da definiše resektabilnost metastaza u jetri. Prema aktuelnoj definiciji, metastatska bolest u jetri je resektabilna ako može da se u celosti ukloni sa zdravom makroskopskom marginom a da pri tome ostanu minimum dva susedna segmenta jetre sa očuvanom vaskularizacijom i bilijarnom drenažom, ali i dovoljnom funkcijom.<sup>38</sup> Bolest u jetri se definiše kao resektabilna, potencijalno resektabilna i neresektabilna. Međutim, iako je resekcija jetre jedino potencijalno kurativno lečenje, neće svaki bolesnik sa tehnički resektabilnim metastazama u jetri imati benefit od hirurškog lečenja. U tom smislu je uloga ostalih članova tima, a posebno onkologa nezamenljiva.

Onkološka procena ima za cilj selekciju bolesnika sa većom verovatnoćom izlečenja. Onkolog uzima u obzir prisustvo ekstrahepatične bolesti, mutacioni status, biologiju tumora, rasprostranjenost metastaza u jetri kao i sve ostale kliničke, patološke i molekularne prognostičke faktore i predlaže formu lečenja.

*a) Lečenje resektabilnih metastaza*

*Sistemska terapija.* Preoperativna HT se može ordinirati na dva načina: a) neoadjuvantna HT za resektabilne metastaze i b) konverzionu HT za potencijalno resektabilne metastaze.

Neoadjuvantna HT za resektabilne metastaze ima za cilj da tretira mikrometastatsku bolest u jetri i van nje čime se eventualno smanjuje rizik od recidiva bolesti, odnosno produžava ukupno preživljavanje i preživljavanje do recidiva bolesti. U slučaju dobrog odgovora metastaza u vidu redukcije veličine, smanjuje se opsežnost planirane resekcije jetre. Prednost primene preoperativne terapije je mogućnost procene odgovora na primenjenu HT, što može biti korisno u planiranju daljeg lečenja. Period u kome se ordinira neoadjuvantna HT se nekada označava kao test vremena i nudi uvid u prirodu same maligne bolesti. Neoadjuvantna HT ima i svoje nedostatke. Progresija bolesti u toku terapije može prevesti stanje u neresektabilno. Kontraargument je podatak da je progresija u toku HT moguća u malom procentu bolesnika a pojedini autori smatraju da je progresija metastaza u toku HT svakako kontraindikacija za operativno lečenje. Primena neoadjuvantne HT nosi rizik od hepatotoksičnosti. Oksaliplatin dovodi do sindroma sinusoidne opstrukcije (SOS), patoanatomski “plava jetra” u 38% bolesnika, dok Irinotekan izaziva steatozu i steatohepatitis kod oko 9% slučajeva.<sup>39</sup> Hemoterapijom izazvano oštećenje jetre je rizik od porasta postoperativnog morbiditeta i mortaliteta. Da bi se smanjio ovaj efekat, savetuje se kratka kura HT i pauza u lečenju do resekcije jetre 4-6 nedelja. Treće, određen procenat lezija može nestati na imaging-u nakon HT. Takve promene se definišu kao nestale metastaze a pojava se definiše kao kompletan klinički odgovor. Samo jedan manji deo će biti i pravi, patološki odgovor, dok se preostale promene neće uočiti pri pregledu KT ili MR. Zbog toga ovakav ishod nije poželjan a može se sprečiti primenom kratke HT od 4-6 ciklusa.

Benefit neoadjuvantne HT i dalje je zasnovan na pretpostavkama, ne i na naučnim dokazima. Evropsko udruženje onkologa (ESMO) preporučuje da se odluka o primeni neoadjuvantne HT donese na osnovu tehničkih kriterijuma resektabilnosti i odnosa povoljnih i nepovoljnih prognostičkih faktora.<sup>40</sup> Hirurško lečenje se savetuje kod jasno resektabilne bolesti sa

povoljnom prognozom. Ako je resektabilnost upitna ili su dominantni nepovoljni prognostički faktori, savetuje se perioperativna terapija FOLFOX protokolom.

Konverzionu HT se primenjuje kod metastaza koje su definisane kao potencijalno resektabilne (15-30% bolesnika). Uloga konverzije HT je efekat smanjenja promera metastaza (*engl. downsizing*) koje omogućuje poštednu operaciju na jetri. Objektivni radiološki odgovor je moguć u skoro dve trećine bolesnika.<sup>41</sup> Pored standardnih terapijskih protokola FOLFOX ili FOLFIRI kod kojih je stopa konverzije 10-33%, u terapiju se uvode i biološki lekovi. Primena Bevacizumaba uz FOLFOX protokol je povećala radiološki odgovor i procenat bolesnika sa konverzijom u resektabilno stanje. Antitela na epidermalni faktor rasta, Cetuximab i Panitumumab se neefikasni kod nosioca KRAS mutacije. Efekat konverzije hemioterapije se procenjuje na svaka 4 ciklusa a u slučaju da se resektabilnost ne postigne ni nakon 12 ciklusa, potrebno je razmotriti promenu terapijskog pristupa.

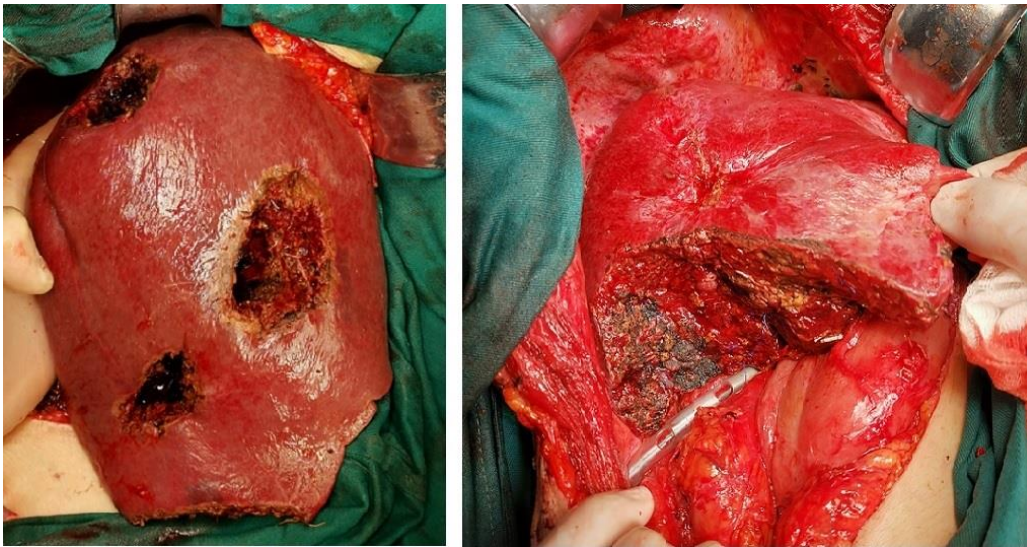
Primena adjuvantne HT nakon sprovedenog hirurškog lečenja ima za cilj da smanji mogućnost recidiviranja bolesti i prolongira ukupno preživljavanje. Primena adjuvantne HT je i dalje kontroverzna. Prema dostupnim naučnim dokazima, adjuvantna HT poboljšava preživljavanje bez recidiva bolesti ali ne i ukupno preživljavanje.<sup>42</sup>

*Hirurško lečenje.* Resekcija jetre je bezbedna metoda lečenja. Stopa mortaliteta nakon velikih resekcija je 1-5% a stopa težih komplikacija do 20%. Prosečno preživljavanje nakon resekcije jetre zbog metastaza KRK je 3.6 godine dok je stopa 5-godišnjeg i 10-godišnjeg preživljavanja oko 38% i 26%, respektivno.<sup>43</sup> Aktuelni problemi koji su nedovoljno definisani a utiču na izbor vrste i načina hirurškog lečenja su ponovljene resekcije jetre, značaj parenhim-poštednih operacija, minimalno invazivni pristup, resekciona margina, ekstrahepatična bolest i sinhrona prezentacija metastaza.

I pored napretka u hirurškom pristupu i primeni savremene sistemske terapije koji su doveli do poboljšanja dugoročnog ishoda lečenja, dve trećine bolesnika dobija recidiv bolesti u jetri u periodu do 3 godine od resekcije jetre sa kurativnom namerom. Oko 93% recidiva nakon resekcije jetre se dešava u prvih pet godina nakon operacije zbog čega se predlaže 10-godišnji period praćenja nakon operacije.<sup>44</sup> Recidiv bolesti nakon resekcije jetre se najčešće javlja u jetri (45%), plućima (18%) i drugim organima (14%).<sup>45</sup> Vreme do recidiva zavisi od broja metastaza, rezidualnog statusa resekcije jetre (R1) i sinhrono prezentacije bolesti. Ponovljene resekcije jetre su takođe dokazane kao bezbedne procedure koje mogu poboljšati ishod



lečenja kod određene grupe bolesnika (slika 5). Bolesnici lečeni ponovljenim resekcijama imaju slično dugoročno preživljavanje kao i oni sa jednom resekcijom.<sup>46</sup>



**Slika 5.** Parenhim-prezervirajuće resekcije jetre

Prva resekcija jetre zbog multiplih metastaza (levo). Druga (ponovljena) resekcija jetre (desno).

Klinički materijal Klinike za digestivnu hirurgiju Kliničkog centra Srbije

Parenhim-prezervirajuće resekcije jetre imaju ekvivalentnu sigurnost i obezbeđuju sličan onkološki ishod u poređenju sa anatomskim resekcijama. Zbog poštene parenhima, u slučaju intrahepatičnog recidiva, veći procenat bolesnika može biti podvrgnut re-resekciji jetre pa su poštedne resekcije udružene sa boljim 5-godišnjim preživljavanjem u ovoj grupi bolesnika. Zbog toga se parenhim-prezervirajuće operacije smatraju standardom hirurškog lečenja metastaza KRK u jetri, osim kada se ne razmatraju zbog anatomske lokalizacije bolesti.

Poslednje vreme karakteriše sve veći interes u oblasti laparoskopskih resekcija jetre i robotske hirurgije. Parenhim-prezervirajuće resekcije je moguće izvesti minimalno invazivnim pristupom. Stopa morbiditeta i 90-dnevnog mortaliteta su slične kao kod otvorene hirurgije.<sup>47</sup> Onkološki ishod je sličan između ove dve grupe operacija, s tim da laparoskopske operacije podrazumevaju brži funkcionalni oporavak, kraći ostanak u bolnici i manju cenu lečenja.<sup>48</sup>

Dugo postavljano pitanje je optimalna širina resekcione margine. Pravilo “10 milimetara” je napušteno kada je pokazano da različita širina negativne hirurške margine (R0) ne utiče na preživljavanje. Danas je poznato da je: preživljavanje R0 i R1 margine slično kod bolesnika koji su pokazali dobar radiološki odgovor nakon primene preoperativne HT; recidiv se

najčešće javlja van mesta hirurškog rada a ne kao lokalni recidiv; pozitivna margina je znak agresivne biologije tumora i zbog toga se smatra negativnim prognostičkim markerom.

Lečenje metastaza KRK u jetri u prisustvu ekstrahepatične bolesti (EHB) nije precizno definisano. EHB nije apsolutna kontraindikacija hirurgiji ali je snažan negativni prediktor dugoročnog ishoda lečenja. Prognoza bolesti zavisi od zahvaćenog organa. Metastaze u plućima imaju bolju prognozu u odnosu na peritonealne depozite ili udaljene limfne noduse.<sup>49</sup> Resekcija metastaza u jetri i EHB produžava život obolelih. Smatra se da zbog indolentne prirode plućnih metastaza, resekcija metastaza u jetri bez hirurškog lečenja plućnih promena produžava život u odnosu na HT. Iako su rezultati ohrabrujući, pravo definitivno izlečenje nakon resekcije metastaza u jetri i EHB je izuzetno retko.

Približno petina bolesnika sa metastazama KRK u jetri ima sinhrono metastaze, prisutne u trenutku dijagnoze KRK ili pre. Sinhrona prezentacija bolesti je znak nepovoljne biologije tumora i jasan nepovoljan prognostički znak. Odluka o lečenju koju donosi multidisciplinarni tim je izazovna zbog istovremenog prisustva primarnog karcinoma i metastaza i mora biti individualna na osnovu opšteg stanja bolesnika i statusa tumora. Naime, na odluku utiče da li je primarni karcinom asimptomatski ili pokazuje kliničku manifestaciju kao što je perforacija, opstrukcija ili krvarenje. Rasprostranjenost metastaza i opsežnost resekcije su bitni parametri u odlučivanju. Prema internacionalnom registru resekcija jetre “LiverMet Survey”, primena preoperativne HT kod resektabilnih metastaza ne obezbeđuje produženo 5-godišnje preživljavanje.<sup>50</sup> Hirurško lečenje se može sprovesti na tri načina: konvencionalnim pristupom, simultanom resekcijom i reverznim pristupom. Konvencionalni pristup obuhvata prvo resekciju primarnog karcinoma a potom resekciju jetre sa eventualnom HT između operacija. Mana ovog pristupa su dve operacije, dve hospitalizacije i mogućnost progresije metastaza u jetri između dve operacije. Simultana operacija podrazumeva uklanjanje celokupnog maligniteta u jednoj operaciji ali može biti udružena sa povišenim procentom komplikacija ili mortaliteta. Simultna operacija se razmatra kada je barem jedna operacija (resekcija kolorektuma ili resekcija jetre) manje kompleksna u tehničkom smislu. Međunarodna grupa eksperata predlaže da u slučaju asimptomatskog primarnog tumora se ordinira preoperativna HT a potom primeni simultana operacija ukoliko se ne planira kompleksna resekciona procedura na jetri.<sup>24</sup> Pristup “prvo jetra” ili reverzni pristup je opisan 2006. od strane švajcarskog hirurga G. Mente.<sup>51</sup> Ovaj pristup daje prednost tretmanu metastaza primenom inicijalne HT a potom resekcije jetre jer su metastaze u jetri faktor koji diriguje prognozu bolesti i glavni su uzrok umiranja bolesnika sa KRK. Nakon tretmana

metastatske bolesti, može se primeniti neoadjuvantna hemio-radioterapija primarnog karcinoma rektuma, ukoliko to stadijum bolesti zahteva. Za razliku od konvencionalnog pristupa, veći procenat bolesnika (oko  $\frac{3}{4}$ ) će kompletirati obe operacije i primarnog i metastatskog tumora primenom reverznog pristupa. U meta-analizi koja je poredila sva tri pristupa, nije dokazana prednost nijednog od ova tri tretmana u smislu kratkoročnog ili dugoročnog ishoda.<sup>52</sup> Zbog nedostatka medicinskih dokaza, tretman ovih kompleksnih bolesnika ostaje nejasan a odluka treba biti doneta od slučaja do slučaja na osnovu individualnih karakteristika.

#### *b) Lečenje potencijalno resektabilnih metastaza*

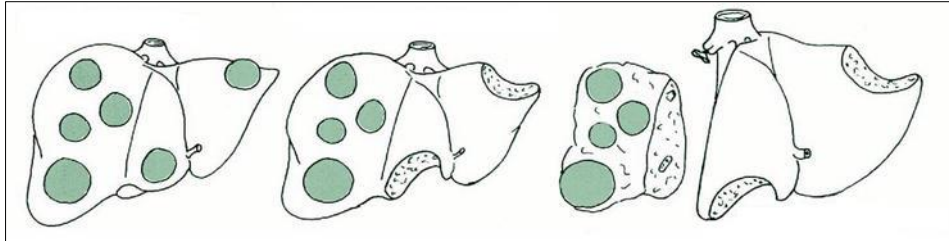
Kao što je prethodno navedeno, ovoj grupi pripada i do 30% bolesnika. Potencijalno ili granično resektabilne metastaze su one koje zbog broja i veličine zahtevaju ekstenzivnu resekciju nakon koje ne preostaje dovoljno volumena jetre. Prvi način u terapijskom pristupu ovim bolesnicima je primena konverzije terapije a potom eventualna resekcija u slučaju zadovoljavajućeg odgovora. Drugi način obuhvata metode kojima se indukuje hipertrofija planiranog ostatka jetre u kome nema tumora. Treći način je konkomitantna termalna ablacija metastaza kojom se štedi značajni volumen parenhima koji bi bio žrtvovan u slučaju resekcije.

Metode koje stimulišu hipertrofiju parenhima jetre su porto-venska okluzija (PVO), hepatektomija u dva akta (HDA) i udružena particija jetre i ligatura portne vene u hepatektomiji u dva akta (ALPPS).

Okluzija portne vene se postiže porto-venskom embolizacijom (PVE) ili portovenskom ligaturom (PVL). Metoda PVE je stara 30-ak godina. To je radiološka interventna procedura kojom se u toku aplikacije sredstva za embolizaciju obliteriše portni protok kroz jetru zahvaćenu tumorom i preusmerava u jetru bez tumora. Tako stvoreni impuls indukuje hipertrofiju parenhima jetre i za 40% a manje od 5% bolesnika neće ostvariti dovoljni prirast volumena i definitivno neće biti kandidati za hirurško lečenje. Mana ove procedure je potencijalna progresija metastatske bolesti u neemboliziranom delu jetre koji hipertrofiše, zbog čega se savetuje nastavak HT do resekcije.

HDA podrazumeva dve sekvencijalne operacije u cilju uklanjanja bilobarnih metastaza. U prvom aktu se ivičnim resekcijama uklanja maligna bolest iz dela jetre koji će definitivno biti sačuvan a u drugom aktu se sprovodi ekstenzivna hepatektomija kojom se uklanja veći preostali deo maligne bolesti iz jetre (slika 6). Neki autori predlažu i PVL u cilju dodatne

stimulacije hipertrofije dela jetre koji ostaje. Koncept je osmišljen 2002. a kasniji rezultati su pokazali da ovi bolesnici, i pored rasprostranjene bolesti ostvaruju slično preživljavanje kao i oni sa jednom operacijom na jetri.<sup>53</sup> Ipak, značajan deo bolesnika ne doživi drugi akt operacije zbog progresije bolesti ili nedovoljne hipertrofije jetre.



**Slika 6.** Ilustracija principa hepatektomije u dva akta

ALPPS procedura podrazumeva porto-vensku ligaturu i transekciju parenhima u prvom aktu, nakon koje sledi drugi akt resekcije dela jetre sa metastazama, 7-14 dana kasnije. Koncept je opisan 2012. od strane nemačkih autora.<sup>54</sup> Prednost ALPPS-a je veći stepen hipertrofije (76% vs 36% kod PVE), brža hipertrofija i veći procenat bolesnika kod kojih je urađen i drugi akt operacije (100% vs 77% kod PVE).<sup>55</sup> Ova procedura je ubrzo osporena zbog visokog procenta teških komplikacija od kojih su najvažnije bilijarna fistula i sepsa. Prema podacima internacionalnog ALPPS registra, 90-dnevni mortalitet je 8.8%, a kod  $\frac{3}{4}$  bolesnika uzrok smrti je insuficijencija jetre.<sup>56</sup> Onkološki rezultati su takođe sporni. Procenat recidiva u jetri je oko 15% nakon 9 meseci i 78% nakon skoro dve godine. Poređenjem bolesnika kod kojih je primenjen ALPPS sa onima koji su lečeni palijativno, nisu uočene prednosti hirurškog lečenja.<sup>57</sup>

Bolesnici sa multiplim bilobarnim metastazama mogu se lečiti i kombinacijom resekcije jetre i termalne ablacije tumora. Najčešće se primenjuju radiofrekventna ili mikrotalasna ablacija navođena intraoperativnim ultrazvukom. Procedura je svakako zavisna od iskustva hirurga i zahteva kompletnu ablaciju metastaze. Na ovaj način se mogu tretirati promene i do 20mm. Obično se primenjuje za promene do 10mm koje su lokalizovane u dubini parenhima jetre a čija bi resekcija značila žrtvovanje značajnog volumena jetre. Otežavajuća okolnost je blizak odnos tumora i glisonovog pedikla zbog moguće ireverzibilne lezije pedikla toplotom, i blizak odnos sa hepatičnom venom zbog fenomena hlađenja usled protoka venske krvi, što ograničava količinu toplote potrebne za destrukciju metastaze. Mikrotalasna ablacija je efikasnija za lezije u blizini većih krvnih sudova jer ne podrazumeva fenomen hlađenja. Bitno

je napomenuti da ovaj koncept znači privremenu dobru kontrolu bolesti, ne i kompletno izlečenje.

*c) Lečenje neresektabilnih metastaza*

Cilj lečenja definiivno neresektabilnih metastaza je dobra kontrola bolesti i zadovoljavajući kvalitet života. Nažalost, većina bolesnika se prezentuje neresektabilnim metastazama u trenutku dijagnoze bolesti. Terapija ovakvih bolesnika je usmerena na jetru jer proces u jetri diriguje dalji tok bolesti kod većine. U lečenju se mogu primeniti: termalna ablacija, intraarterijska terapija, stereotaktička radioterapija i sistemka palijativna HT.

Ablativne tehnike su obrađene u prethodnom poglavlju. Bitna karakteristika njihove primene kod neresektabilnih metastaza je da se mogu primeniti za multiple metastaze, promene i do 3cm, multietapno, ali u specijalizovanim centrima.

Intraarterijska terapija podrazumeva intraarterijsku aplikaciju citostatskog i/ili embolizacionog sredstva. Prvi način lečenja je intraarterijska HT. Ona znači ugradnju pumpe u hepaticnu arteriju i periodičnu aplikaciju citostatika. Time se smanjuju sistemski efekti citostatske terapije. Drugi metod je transarterijska hemo-embolizacija (TACE). Tokom navedene procedure se uvodi kateter u granu hepaticne arterije transfemoralnim pristupom i u njoj se aplikuje citostatik (najčešće se koriste cisplatin, doksorubicin, mitomicin i irinotekan) a potom sredstvo za embolizaciju (lipiodol). Procedura obezbeđuje visoku koncentraciju citostatika u jetri i ishemiju metastaza. TACE kao palijativna procedura ima za cilj bolju kontrolu bolesti u jetri kao i bolji kvalitet života. Alternativa TACE-u je selektivna interna radijaciona terapija u sklopu koje citostatik biva zamenjen radioobeležnim mikrosferama (Yttrium-90).

Stereotaktična radioterapija usmerava visoke doze zračenja na tumorsko tkivo dok štedi zdravo tkivo jetre. Preporuke su da se ona primenjuje kod bolesnika nepodesnih za hirurško lečenje ili ablaciju.

Uloga transplantacije jetre u lečenju neresektabilnih metastaza je danas neizvesna. Za sada je transplantacija jetre eksperimentalna, dok se ne pojave jasni naučni dokazi o uspešnosti u lečenju. Glavni ograničavajući faktor je nedostatak donora sa jedne strane, odnosno visok procenat recidiva bolesti sa druge strane.

### 1.3. Epitelno-mezenhimalna tranzicija

#### 1.3.1 Osnovi epitelno-mezenhimalne tranzicije

Epitelno-mezenhimalna tranzicija (EMT) je biološki proces u kome je polarizovana epitelna ćelija podvrgnuta nizu biohemijskih promena tokom kojih stiče fenotipske karakteristike mezenhimalne ćelije što uključuje povećani migratorni kapacitet, invazivnost, otpornost na apoptozu i pojačanu produkciju ekstracelularnog matriksa (ECM).<sup>58</sup> Program EMT je kompletiran degradacijom bazalne membrane i formiranjem mezenhimalne ćelije koja može da migrira iz epitela od koga potiče. Brojni molekularni procesi su angažovani u pokretanju EMT i u kompletiranju samog procesa uključujući: aktivaciju transkripcionih faktora, ekspresiju proteina na ćelijskoj površini, ekspresiju i reorganizaciju citoskeletalnih proteina, produkciju ECM-razgrađujućih enzima i promene u ekspresiji specifičnih malih RNK. Faktori uključeni u opisane procese se koriste kao biomarkeri prolaska ćelije kroz EMT.

U svom pionirskom radu iz 1995, Elizabet Hej je opisala proces epitelno-mezenhimalne transformacije ali je on kasnije zamenjen pojmom tranzicije jer je proces u osnovi reverzibilan.<sup>59</sup> Reverzni proces se označava kao mezenhimno-epitelna tranzicija (MET) i uključuje konverziju mezenhimne ćelije u epitelni derivat.

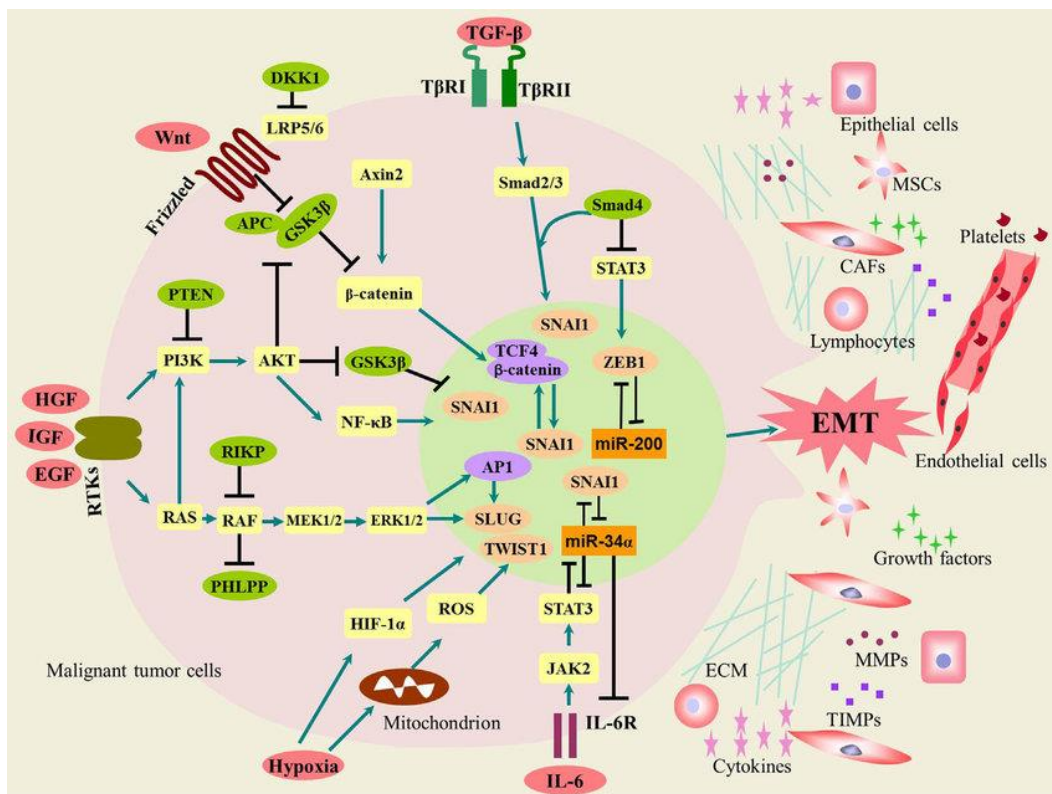
U zavisnosti od biološkog procesa u kojem se odvija, EMT se može podeliti u tri podgrupe: EMT u toku embriogeneze i razvoja organa, EMT u regeneraciji tkiva, fibrozi i zarastanju rana i EMT u karcinogenezi i metastaziranju. Prva dva tipa EMT-a nisu predmet ove analize.

*EMT u karcinogenezi.* Izražena proliferacija epitelnih ćelija i angiogeneza su osnova inicijacije i ranog rasta primarnog epitelnog karcinoma. U sledećoj etapi, maligno transformisane ćelije stiču invazivnost koja se manifestuje prodorom kroz bazalnu membranu. U poslednjoj fazi, maligne ćelije koje su probile bazalnu membranu imaju mogućnost metastatskog širenja. Aktivacija EMT programa je kritični momenat u sticanju malignog fenotipa epitelne ćelije. Ćelije koje su procesom EMT stekle fenotip mezenhimne ćelije se tipično nalaze u regiji pupljenja (*engl.* budding), odnosno u frontalnom delu invazije karcinoma. Smatra se da upravo one ulaze u invazija-metastaziranje kaskadu, koja podrazumeva lizu ekstracelularnog matriksa, intravazaciju, prenos cirkulacijom, ekstravazaciju, formiranje mikrometastaza i kolonizaciju ciljanog tkiva.<sup>60,61</sup> Poznato je da maligne ćelije nastale procesom EMT nakon migracije u ciljani organ gube svoj mezenhimalni fenotip u toku formiranja metastatskog tumora procesom MET. Metastatske

ćelije su podvrgnute MET-u zbog dejstva faktora mikrookruženja sa kojima se susreću nakon ekstravazacije u parenhim ciljanog organa. Može se zaključiti da je EMT centralni događaj u progresiji karcinoma od *in situ* faze do metastatskog stadijuma a da je MET prisutna u sledećem procesu kolonizacije udaljenog organa.

### 1.3.2 Uloga epitelno-mezenhimalne tranzicije u patogenezi kolorektalnog karcinoma

EMT je opisan kod različitih karcinoma uključujući karcinom dojke, prostate i KRK. Proces aktivacije gena uključenih u EMT kod KRK se može uprošćeno prikazati na sledeći način. Inicijalni događaj je vezivanje faktora rasta kao što su transformišući faktor rasta beta (TGF- $\beta$ ), epidermalni faktor rasta, fibroblastni faktor rasta, trombocitni faktor rasta, Wnt, integrini i drugi, za odgovarajući membranski receptor. Kompleks ligand-receptor aktivira kaskadnu reakciju aktivacije intracelularnih kinaza koje u ćelijskom jedru indukuju aktivaciju transkripcionih faktora. Transkripcioni faktori aktiviraju ekspresiju gena uključenih u EMT.<sup>62</sup> Opisano je najmanje 11 signalnih puteva aktivacije EMT u ćelijama KRK.<sup>63</sup> Najbolje opisani su TGF- $\beta$  i Wnt signalni put i tirozin-kinazni receptori. Uprošćeni prikaz signalnih puteva i tumorskog mikrookruženja koji regulišu EMT kod KRK su prikazani na slici 7.



**Slika 7.** Mreža signala i tumorsko mikrookruženje u procesu EMT kod kolorektalnog karcinoma<sup>64</sup>

TGF- $\beta$  vezivanjem za svoje ligande na površini indukuje fosforilaciju SMAD proteina a aktivirani SMAD2 i SMAD3 sa SMAD4 ulaze u ćelijsko jedro i regulišu SNAI1 ekspresiju. SMAD4 je važan negativan regulator ovog puta jer suprimira aktivaciju STAT3 koji dalje može da reguliše EMT i ZEB1 ekspresiju. Wnt signalni put promovise EMT inhibišući glikogen sintazu kinazu-3 u stabilizaciji  $\beta$ -katenina.  $\beta$ -katenin se translocira u jedro ćelije da bi angažovao TCF4 a potom transkripcijom i ZEB1 i SNAI1. Faktori rasta kao što su epidermalni, fibroblastni i hepatocitni faktor rasta vezivanjem za tirozin-kinazne receptore aktiviraju RAS-RAF-MEK1/2-ERK1/2 MAPK signalnu kaskadu. Kao posledica aktivacije ovog puta menja se ekspresija SNAI1, SLUG i TWIST1 i dalje reguliše proces EMT. Tumorsko mikrookruženje je kompleksna mreža signalnih molekula, komponenti ekstracelularnog matriksa, fizičkih noksi kao što je hipoksija i inflamatornih i imunih ćelija kao što su endotelne ćelije, epitelne ćelije, mezenhimalne stem/stromalne ćelije, fibroblasti i dr.

#### Biomarkeri EMT

Molekuli zastupljeni u procesu aktivacije EMT ili efektorni molekuli čija se ekspresija menja u toku EMT mogu poslužiti kao markeri samog procesa EMT. Dele se na stečene biomarkere i markere koji su prigušeni u tranziciji.<sup>65</sup> U narednom odeljku će biti opisana klasifikacija biomarkera i struktura onih biomarkera koji su predmet analize ove studije.

*Markeri ćelijske površine.* Ovu familiju čine kaderini i integrini. Prototip markera EMT je promena ekspresije E-kaderina. E-kaderin je kalcijum zavisni transmembranski glikoprotein koji posreduje u međućelijskoj adheziji. Vezujući se svojim intracelularnim domenom za  $\beta$ -katenin unutar citoplazme, formira kompleks direktno povezan sa aktinskim citoskeletom i na taj način uspostavlja polarnost ćelije i intercelularnu stabilnost, održavajući integritet epitelne ćelije i njenu funkciju.<sup>66</sup> E-kaderin je eksprimiran u epitelnim ćelijama a njegova ekspresija opada u EMT. Gubitak ekspresije E-kaderina u humanim karcinomima nastaje usled metilacije promotora gena *CDH1*, fosforilacije ili degradacije proteina i izmenjene regulacije transkripcionih faktora: Snail, Slug, Zeb1. Dakle, E-kaderin je marker koji ukazuje na epitelne karakteristike ćelije ali i važan faktor u malignoj transformaciji ćelije, invaziji i metastaziranju. Kliničke studije su pokazale prognostički značaj kako tkivne ekspresije proteina tako i rastvorljivog serumskog E-kaderina kod bolesnika sa KRK.<sup>67,68</sup>



*Citoskeletni markeri.* Najpoznatiji predstavnici su citokeratin, vimentin,  $\beta$ -katenin i  $\alpha$ -SMA. Vimentin je intermedijarni filamentni protein poreklom iz mezenhimalne ćelije, dok je njegova ekspresija u epitelnim ćelijama minimalna. Poremećena ekspresija vimentina u malignoj ćeliji epitelnog porekla rezultira rekonstrukcijom citoskeletnih proteina, čime se epitelna ćelija približava mezenhimalnoj u morfološkom smislu, a istovremeno postoje mobilnija i invazivnija. Izmenjena ekspresija vimentina je dokazana kod bolesnika sa KRK i doprinosi bržoj progresiji i lošoj prognozi bolesnika.<sup>69</sup>

*Proteini ekstracelularnog matriksa.* Fibronektin je glikoprotein ekstracelularnog matriksa sačinjen od dva polipeptidna lanca, povezana disulfidnim vezama. On je marker mezenhimalne diferencijacije ćelije. Fibronektin ima ulogu u ćelijskoj adheziji, rastu, migraciji i diferencijaciji. U studiji Yi-a, pokazana je veća ekspresija fibronektina u tumorskom tkivu kolorektalnog karcinoma u odnosu na zdravo okolno tkivo.<sup>70</sup> Takodje je dokazano da je veća ekspresija fibronektina u malignom tkivu negativno povezana sa prognozom. U *in vitro* uslovima izazvano smanjenje ekspresije fibronektina dovodi do značajno manje proliferacije i invazivnosti ćelijskih linija, što se predlaže kao potencijalno ciljno mesto eventualne antitumorske terapije.

*Transkripcioni faktori.* Familija Snail transkripcionih faktora ima važnu ulogu u patogenezi KRK. Snail je prepoznat kao supresor ekspresije E-kaderina ali on reguliše i mnoge druge procese EMT. Pojačana ekspresija Snail 1 i 2 korelira sa metastatskim potencijalom tumora *in vivo*.<sup>71</sup> Twist transkripcioni faktor može nezavisno od Snail da vrši represiju E-kaderina i ushodnu regulaciju fibronektina i N-kaderina.

Sve veći broj studija je pokazao da tumori sa pretpostavljenom EMT imaju određeni stepen rezistencije na konvencionalnu terapiju, što predstavlja važan klinički problem. Na primer, ćelije KRK sa povišenom ekspresijom SNAI koji je poznati induktor EMT, pokazuju povišenu rezistenciju na 5-fluorouracil.<sup>72</sup> Smatra se da epitelne ćelije pokazuju 7 puta veću hemosenzitivnost u odnosu na mezenhimalne ćelije, ukazujući na jaku povezanost između aktivacije EMT i rezistencije na lekove.<sup>73</sup> Mehanizmi rezistencije na lekove su delimično prepoznati ali njihovo bolje poznavanje nudi i nove terapijske mogućnosti. Mogućnost da se manipuliše procesom EMT (prevencija ili reverzija), može biti obećavajući pristup u sprečavanju metastaziranja, recidiviranja ili rezistencije na sistemsku terapiju.

### 1.3.3 Epitelno-mezenhimalna tranzicija u metastatskom kolorektalnom karcinomu

Kolonizacija metastatskog organa, odnosno klonalni rast se odigrava nakon invazije ciljanog organa karcinomskim ćelijama. Davno je registrovan dobro diferentovani epitelni fenotip u metastazi karcinoma.<sup>74</sup> Iz toga je proizišla teza da je za proliferaciju i diferencijaciju metastatskih ćelija u ciljanom organu potreban obrnuti proces MET. Koncept tranzitnog EMT-MET preokreta u metastazi je relativno skoro dokazan.<sup>75</sup> MET je nedovoljno razjašnjen proces i za razliku od EMT, identifikovano je samo nekoliko aktivatora ovog procesa. Pored toga što su osnovni mehanizmi procesa MET nedovoljno upoznati, zaostaju i nejasnoće kada i kako se proces u metastatskom organu aktivira, kako metastatske ćelije prevazilaze mehaničku prepreku neophodnu da uđu i kolonizuju tkivo ciljanog organa i zašto karcinomske ćelije biraju da se nasele u određenom ciljanom organu.

Regulatorni mehanizmi procesa EMT i MET u metastatskom tkivu koji zahtevaju robusnu transkripcionu kaskadu nisu dovoljno opisani u dosadašnjim istraživanjima. Takođe, istraživanja koja se bave ekspresijom proteina-efektora EMT ili MET u metastatskom tkivu su ograničena, a rezultati analize ekspresije odgovarajućih gena skoro da nedostaju u dostupnoj literaturi. Truant i saradnici su objavili rezultate istovremene analize tkivne proteinske ekspresije E-kaderina i ekspresije gena na transkripcionom nivou.<sup>76</sup> Autori su uporedili vrednosti u primarnom karcinomu i zdravoj mukozi kolona ali i vrednosti izmerene u metastatskom tkivu jetre i zdravom parenhimu. Pokazano je da je nivo E-kaderina viši u metastatskom tkivu jetre u odnosu na zdravi parenhim, dok razlike u primarnom tumoru i normalnoj mukozi kolona nisu uočene. U studiji Kima i saradnika je na isti način određena tkivna ekspresija E-kaderina imunohistohemijskom metodom i ekspresija odgovarajuće informacione RNK metodom reverzne transkripcije lančane reakcije polimeraze (*engl.* reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR).<sup>77</sup> Za razliku od prethodne, u ovoj studiji je analiza sprovedena na uzorku primarnog karcinoma i odgovarajuće metastaze na istim bolesnicima. Glavni zaključak studije je bio da ekspresija E-kaderina korelira sa nivoom iRNK u primarnom i metastatskom karcinomu.

## **2 CILJEVI ISTRAŽIVANJA**

1. Utvrditi prognostički značaj biomarkera epitelno-mezenhimalne tranzicije iz tkiva i seruma za pojavu ranog recidiva bolesti nakon resekcije jetre zbog metastatskog kolorektalnog karcinoma.
2. Utvrditi prognostički značaj kliničkih parametara (pol, starost, stadijum primarnog tumora, vreme detekcije metastaza, broj, veličina i distribucija metastaza, tumorskih markera CEA i karbohidrantni antigen (CA) 19-9 i preoperativna i postoperativna HT) za pojavu ranog recidiva bolesti nakon resekcije jetre zbog metastatskog kolorektalnog karcinoma.
3. Utvrditi prognostički značaj patohistoloških parametara (stepen diferentovanosti metastatskog tumora i rezidualni status) za pojavu ranog recidiva bolesti nakon resekcije jetre zbog metastatskog kolorektalnog karcinoma.

### **3 MATERIJAL I METODE**

#### **3.1 Dizajn studije**

##### **3.1.1 Vreme i mesto istraživanja**

Prospektivna, delom retrospektivna kohortna studija sprovedena je na Klinici za digestivnu hirurgiju – Prva hirurška, Klinički centar Srbije, Beograd, u periodu od 01. decembra 2016. do 20. februara 2020. godine.

Studija je odobrena od Etičkog komiteta Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

##### **3.1.2 Ispitanici**

Istraživanje je sprovedeno na uzorku od 30 bolesnika. Svi bolesnici su hirurški lečeni potencijalno kurativnom resekcijom jetre.

Primenjeni su kriterijumi za uključivanje:

1. Potencijalno kurativna resekcija jetre, simultano ili nakon radikalne resekcije primarnog karcinoma zbog metastatskog kolorektalnog karcinoma u jetri
2. Starost 18-90 godina u trenutku resekcije jetre
3. Potpisan informisani pristanak

Isključni kriterijumi su bili:

1. Prisustvo primarnog karcinoma ili konkomitantnih ekstrahepatičnih metastaza koje se neće tretirati kurativnom resekcijom procedurom simultano sa resekcijom jetre
2. Prethodno kurativno hirurško lečenje metastaza u jetri

##### **3.1.3 Parametri u istraživanju**

U studiji su registrovani i analizirani sledeći parametri svakog učesnika:

- a) demografski
  - pol i starost
- b) klinički

- klinički podaci o primarnom karcinomu: lokalizacija, neoadjuvantna hemio-radioterapija, adjuvantna HT, Duke's stadijum
- klinički podaci o metastazama KRK u jetri: vreme detekcije metastaza u odnosu na dijagnozu primarnog karcinoma, broj i veličina metastaza, lobarna distribucija metastaza, preoperativna vrednost tumorskih markera karcinoembriogeni antigen i karbohidrantni antigen 19-9, primena preoperativne i postoperativne hemioterapije, radiološki odgovor metastaza na preoperativnu hemioterapiju po RECIST kriterijumima<sup>37</sup>

c) pato-histološki

- pato-histološki podaci o primarnom karcinomu: T i N stadijum, broj analiziranih limfnih čvorova, vaskularna invazija, invazija limfatika, perineuralna invazija, rezidualni status
- pato-histološki podaci o metastazama KRK u jetri: stepen diferentovanosti metastatskog tumora i rezidualni status

d) genetički

- nivo ekspresije gena *CDH1*, *VIM* i *FNI* u malignom metastatskom tkivu u jetri i zdravom tkivu jetre neposredno uz metastazu i serumu.

### 3.1.4 Uzorkovanje biološkog materijala

Analiza molekularnih markera je urađena u serumu, malignom metastatskom tkivu u jetri i netumorskom tkivu jetre neposredno uz metastazu.

Serum je izdvojen iz krvi uzorkovane iz periferne vene bolesnika u periodu od sedam dana pre operacije do neposredno pre načinjenog hirurškog reza. Uzorkovana krv je koagulisala u trajanju od 15 minuta a onda je centrifugirana brzinom od 3500 obrtaja u minuti (rpm, od engl. revolution per minut), u toku 10 min. Dobijeni serum je zamrznut i čuvan na temperaturi -80°C do momenta izolacije RNK.

Metastatsko maligno tkivo i zdravo tkivo jetre su uzorkovani isecanjem sa preparata neposredno po završetku resekcije jetre. Biološki materijal je zatim momentalno uronjen u rastvor RNeasy® RNA Stabilization Solution (ThermoFisher Scientific, Valtam, SAD) i skladišten u zamrzivaču na temperaturi -80°C.

## 3.2 Genetička analiza

### Izolacija RNK

Metastatsko maligno tkivo i zdravo tkivo jetre su secirani na male delove i homogenizovani pre dodavanja 1 mL TRIzol reagensa (Thermo Fisher Scientific, Valtam, SAD). Ukupna RNK iz tkiva je ekstrahovana prema protokolu proizvođača, dok je RNK iz seruma ekstrahovana po sledećem protokolu: 1 mL TRIzol reagensa je dodat u 400  $\mu$ L seruma zajedno sa 1  $\mu$ L rastvora glikogena oslobođenog od nukleaza (engl. nuclease-free glycogen) koncentracije 1  $\mu$ g/ $\mu$ L. Smeša je vorteksovana 20 sekundi da se oslobodi žutih mehurića i ostavljena na sobnoj temperaturi 10 min. Nakon toga je dodato 200  $\mu$ L hloroforma. Neposredno po dodavanju hloroforma, epruveta je promućkana rukom 20 sekundi, ostavljena 15 min na sobnoj temperaturi i centrifugirana 12000 x g 15 min na 4°C. Približno 800  $\mu$ L gornje vodene faze je prebačeno u novu epruvetu i dodato je 1.2  $\mu$ L izopropanola. Smeša je ostavljena na sobnoj temperaturi 10 min i centrifugirana na 12000 x g 8 min na 4°C. Površinski sloj je pažljivo aspiriran i dodato je 1 mL 75% etanola. Epruveta je centrifugirana na 7500 x g 5 min na sobnoj temperaturi. Površinski sloj je uklonjen a talog je ostavljen da se suši 5 min. RNK talog je resuspendovan sa 20  $\mu$ L vode oslobođene od nukleaza (engl. nuclease-free water) i skladišten na -80°C. Koncentracija i čistoća ukupne RNK iz tkiva i seruma su određeni merenjem apsorbancije na 260 i 280 nm.

### Analiza ekspresije gena

Izolovana ukupna RNK je tretirana sa Ambion™ DNase I (RNase free) (ThermoFisher Scientific, Valtam, SAD) u prisustvu 10 x DNase pufera i ostavljena na 37°C, 30 min. DNase I je inaktivisana pomoću dvominutne inkubacije sa DNase inaktivacionim reagensom iz DNA-free™ DNA Removal Kit (ThermoFisher Scientific, Valtam, SAD). Smeša je centrifugirana na 10000 x g 1.5 min i površinski sloj koji sadrži RNK oslobođenu od DNK je prebačena u drugu epruvetu.

Ukupna RNK je reverzno transkriptovana pomoću High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster Siti, SAD) prema instrukcijama proizvođača. Smeša reverzne transkripcije je inkubirana: 10 min na 25°C, 120 min na 37°C i 5 min na 85°C. Komplementarna DNK (kDNK) je skladištena na -20°C do sledeće upotrebe.

Kvantitativni lančana reakcija polimeraze u realnom vremenu (qRT-PCR)

Za qRT-PCR je korišćen HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Mix Plus (ROX) (Solis BioDyne, Tartu, Estonija). Sekvence korišćenih oligonukleotidnih graničnika su prikazane u tabeli 6. Ekspresija gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaze (GAPDH) gena je korišćena kao endogena kontrola za normalizaciju relativne ekspresije gena *CDH1*, *FN1* i *VIM*.

**Tabela 6.** Sekvence korišćenih oligonukleotidnih graničnika<sup>78</sup>

<b>Gen</b>	<b>Oligonukleotidna sekvenca (5' -&gt; -3')</b>
<b>CDH1 forward</b>	TGCCCAGAAAATGAAAAAGG
<b>CDH1 reverse</b>	GTGTATGTGGCAATGCGTTC
<b>FN1 forward</b>	CAGTGGGAGACCTCGAGAAG
<b>FN1 reverse</b>	TCCCTCGGAACATCAGAAAC
<b>VIM forward</b>	GAGAACTTTGCCGTTGAAGC
<b>VIM reverse</b>	GCTTCCTGTAGGTGGCAATC
<b>GAPDH forward</b>	GTGAAGGTCGGAGTCAACG
<b>GAPDH reverse</b>	TGAGGTCAATGAAGGGGTC

Analiza qRT-PCR je urađena u 7500 Real-Time PCR System mašini (Applied Biosystems, Foster City, California, USA). PCR uslovi su bili sledeći: 50°C 2 min, 95°C 10 min, zatim 40 ciklusa na 95°C 15 sekundi i 60°C 60 sekundi. qRT-PCR reakcija za svaki uzorak je urađena u triplikatu. Podaci su dobijeni i analizirani pomoću softvera 7500 System Software. Podaci su prikazani kao prosek  $\Delta C_t$  vrednosti.

### 3.3 Praćenje bolesnika

Bolesnici uključeni u studiju su klinički praćeni godinu dana nakon resekcije jetre, u intervalima na tri meseca. Cilj praćenja je bio utvrđivanje pojave ranog recidiva bolesti. Rani recidiv bolesti je u ovoj studiji definisan kao recidiv u periodu od godinu dana nakon resekcije jetre. Recidiv bolesti se može javiti u regiji resekovanog primarnog karcinoma (lokalni recidiv), u jetri i/ili ekstrahepatično. Za dijagnostiku recidiva bolesti korišćene su standardne dijagnostičke procedure: merenje tumorskih markera CEA i CA 19-9 i transabdominalni ultrasonografski pregled na tri meseca; kompjuterizovana tomografija ili

magnetna rezonanca na šest meseci; PET/KT, kolonoskopija i rektoskopija, uslovno, u slučaju sumnje prethodne na recidiv bolesti.

Po završetku studijskog perioda, bolesnici su podeljeni u dve grupe: bolesnici bez recidiva bolesti i bolesnici sa recidivom bolesti. Prethodno navedeni studijski parametri su poređeni između ovih grupa.

### **3.4 Statistička analiza**

Deskriptivna statistička analiza

Za varijable izražene omernom skalom (numerička kontinuirana obeležja posmatranja) određene su mere centralne tendencije: aritmetička sredina i medijana, kao i mere varijabiliteta u uzorku: standardna devijacija, minimalna i maksimalna vrednost. Za testiranje hipoteze o normalnosti raspodele numeričkih kontinuiranih obeležja posmatranja korišćen je Kolmogorov-Smirnovljev test. Za obeležja sa normalnom raspodelom, jačina linearnog odnosa između dve varijable utvrđena je Pirsonovim koeficijentom linearne korelacije. Za obeležja koja odstupaju od normalne raspodele, primenjen je Spirmanov koeficijent korelacije rangova .

Varijable izražene nominalnom i ordinalnom skalom (kategorijalna obeležja posmatranja i rangovi) prikazane su apsolutnim brojevima i procentima.

Analiza kvantitativnih razlika

Numerička kontinuirana obeležja su poređena primenom Studentovog T testa. Obeležja koja odstupaju od normalne raspodele su poređena primenom Man-Vitnjevog U testa za dva nezavisna uzorka, odnosno primenom Vilkoksonovog testa ekvivalentnih parova za dva zavisna uzorka.

Za poređenje kategorijalnih obeležja primenjen je Pirsonov Hi kvadrat test (tablice kontigencije) ili Fišerov test.

ROC (*engl.* Receiver operating characteristic) kriva je kreirana za vrednosti ekspresije *CDH1*, *FNI* and *VIM* u metastatskom tkivu i serumu. Primenom Judenovog indeksa određene su kritične vrednosti (*engl.* cut-off) ekspresije gena. Na osnovu kritičnih vrednosti, bolesnici su podeljeni u dve grupe sa niskom i visokom ekspresijom.



Jednogodišnja verovatnoća preživljavanja bez recidiva bolesti određena je Kaplan-Majerovom metodom. Verovatnoće preživljavanja različitih grupa bolesnika su upoređene Log-rank testom. Univarijantna i multivarijantna analiza povezanosti potencijalno prediktivnih varijabli i zavisne varijable urađena je primenom Cox regresionog modela.

Rezultati su prikazani tabelarno i grafički.

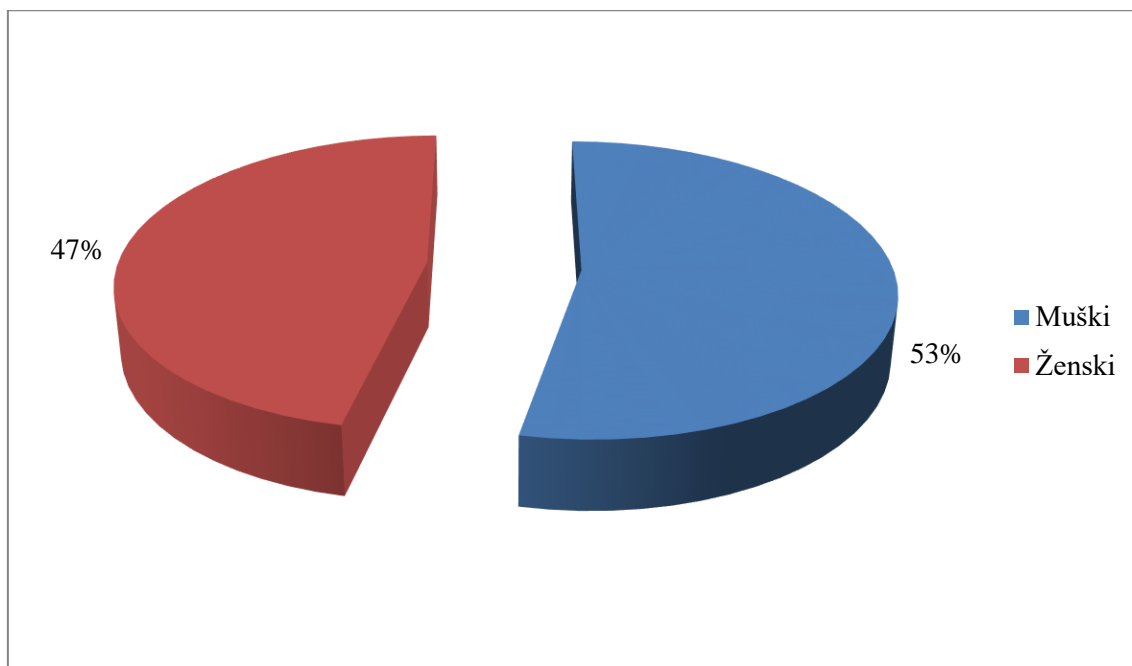
Nivo značajnosti za odbacivanje nulte hipoteze postavljen je na  $p < 0.05$ . Statistička analiza je urađena primenom statističkog programskog paketa SPSS, verzija 20.0 (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA).

## 4 REZULTATI

### 4.1 Karakteristike ispitivane grupe bolesnika

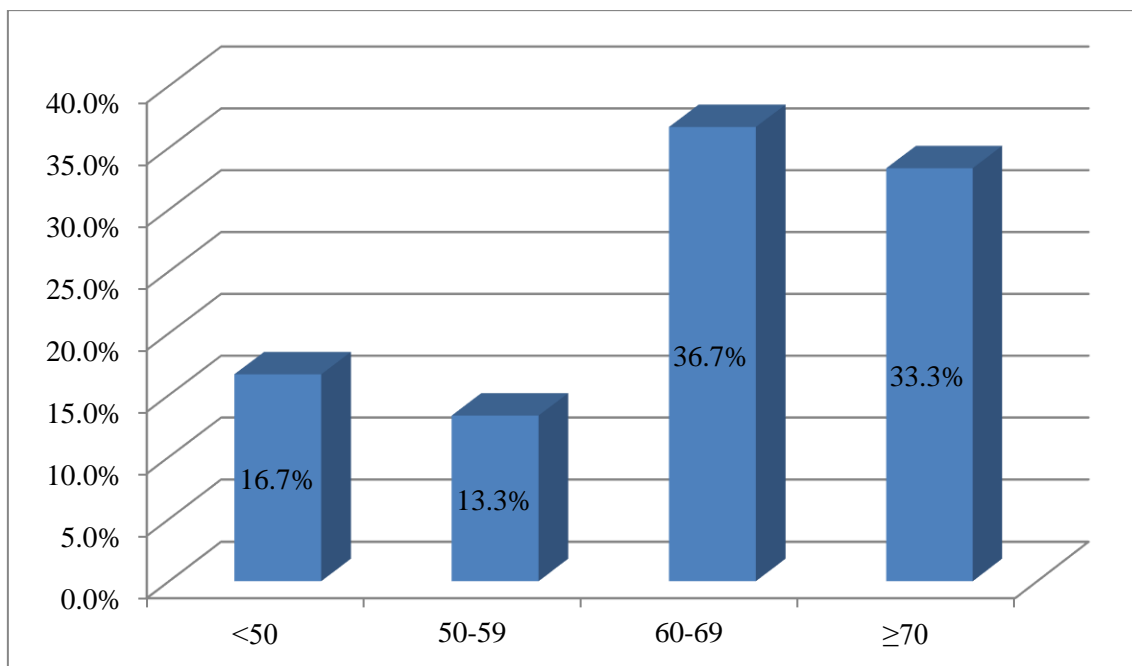
#### 4.1.1 Opšte karakteristike

Osnovni uzorak čini 30 bolesnika. U osnovnom uzorku je bilo 16 (53.3%) muškaraca i 14 (46.7%) žena (grafikon 1).



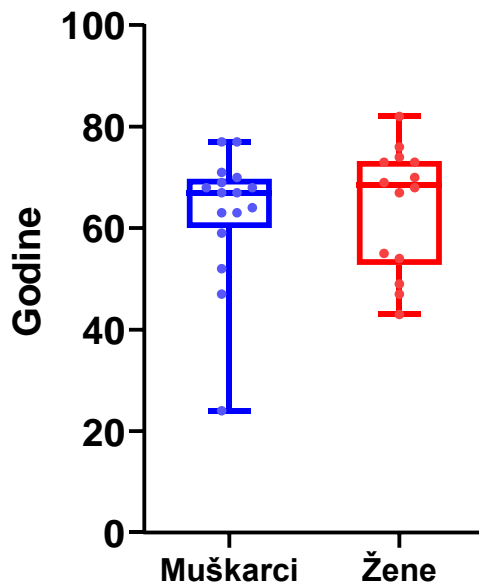
**Grafikon 1.** Distribucija bolesnika po polu

Prosečna starost bolesnika je bila  $63.50 \pm 12.46$  godina. Najmlađi bolesnik je imao 24 godine, a najstariji 84. Najveći broj bolesnika (36.7%) je bio u grupi od 60 do 69 godina (grafikon 2).



**Grafikon 2.** Distribucija bolesnika po starosti

Ispitanici čine homogeni uzorak po polu i starosti jer se prosečne starosti polnih grupa statistički ne razlikuju ( $p= 0.603$ ), (grafikon 3).

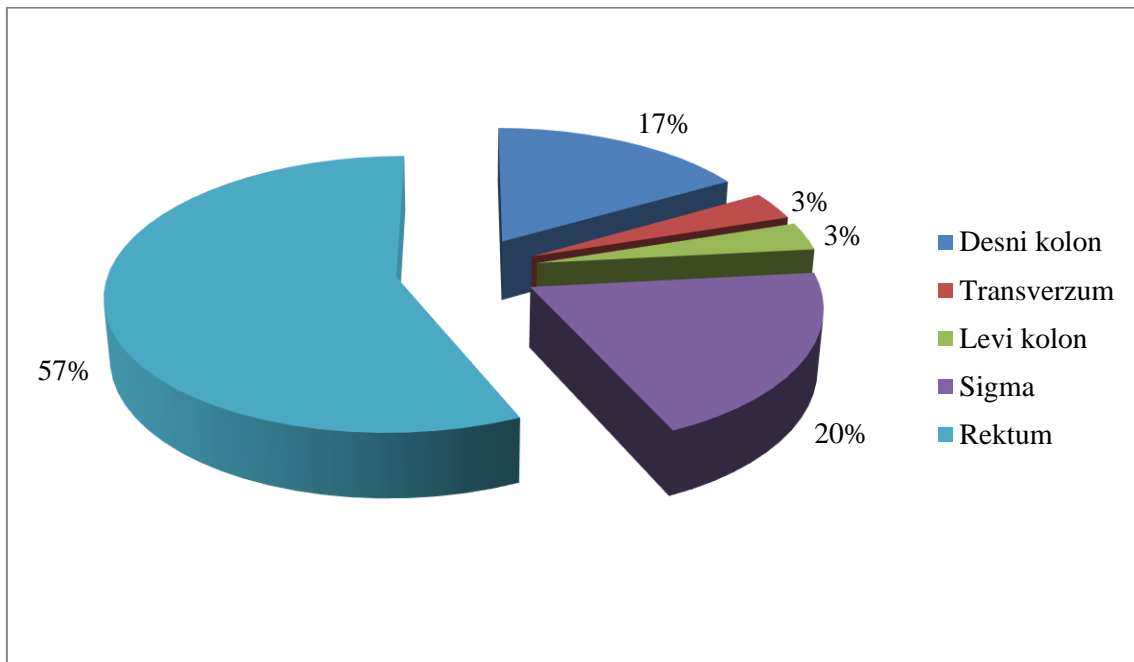


**Grafikon 3.** Distribucija bolesnika po polu i starosti

#### 4.1.2 Karakteristike primarnog karcinoma

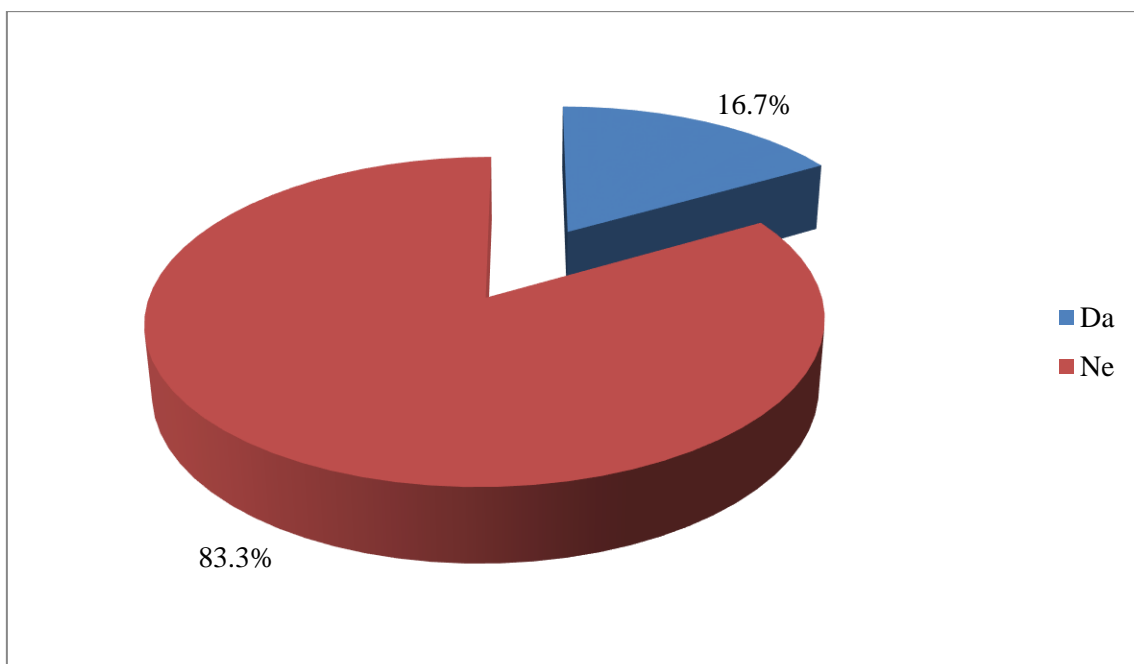
Distribucija bolesnika u odnosu na lokalizaciju primarnog karcinoma prikazana je na grafikonu 4. Kod 17 (57%) bolesnika je primarni karcinom bio lokalizovan na rektumu a kod

13 (43%) na kolonu. U odnosu na ukupan broj bolesnika, druga najčešća lokalizacija primarnog karcinoma je bila na sigmoidnom kolonu (20%).



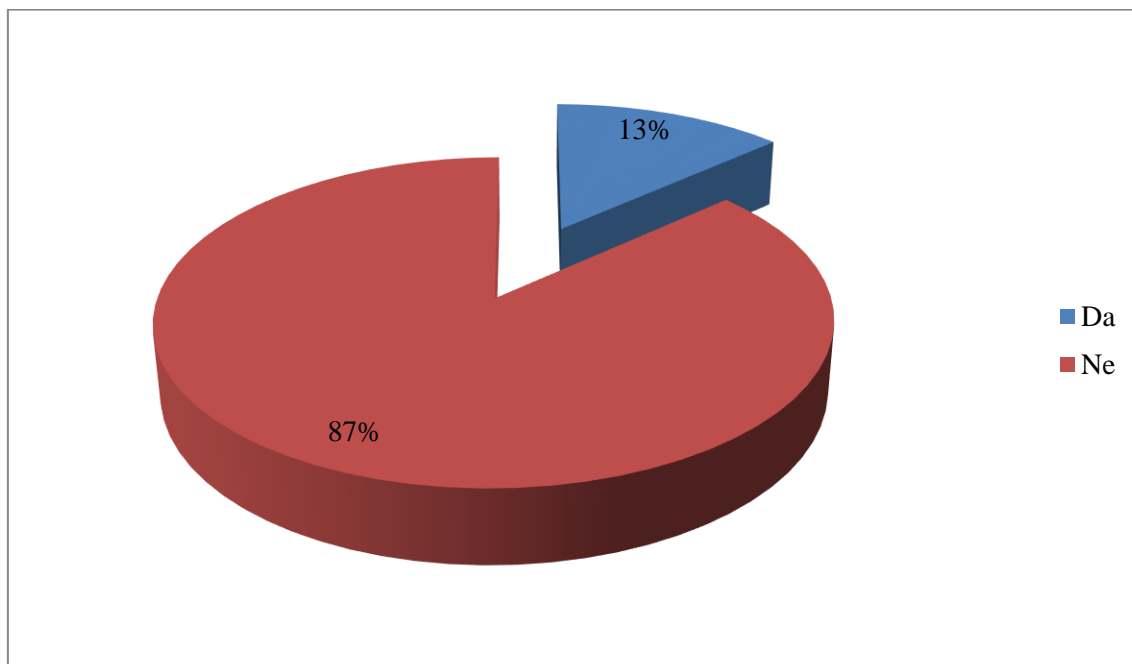
**Grafikon 4.** Distribucija bolesnika po lokalizaciji primarnog karcinoma

Neoadjuvantnu hemio-radioterapiju pre operacije primarnog karcinoma je primilo ukupno 5 (16.7%) bolesnika. U odnosu na broj bolesnika sa karcinomom rektuma, neoadjuvantna hemio-radioterapija je primenjena kod 29.4% bolesnika.



**Grafikon 5.** Neoadjuvantna hemio-radioterapija primarnog karcinoma

Adjuvantnu HT nakon operacije primarnog karcinoma je primilo ukupno 4 (13%) bolesnika (grafikon 6).



**Grafikon 6.** Adjuvantna hemioterapija primarnog karcinoma

Svi bolesnici koji su primili adjuvantnu HT su imali pozitivan limfonodalni status (pN1 ili pN2) primarnog karcinoma. Učestalost bolesnika sa pozitivnim limfonodalnim statusom (Tabela 7) se ne razlikuje u zavisnosti od primene adjuvantne hemioterapije ( $p=0.550$ ).

**Tabela 7.** Limfonodalni status (N) bolesnika sa adjuvantnom hemioterapijom

Limfonodalni status	Adjuvantna hemioterapija		Ukupno
	Da	Ne	
pN-	0	8	8
pN+	4	18	22
Ukupno	4	26	30

Pato-histološke karakteristike primarnog karcinoma detaljno su prikazane u tabeli 8. Bolesnici u Duke's stadijumu D su bili najzastupljeniji (73.3%). Ukupno 22 bolesnika u tom stadijumu je imalo sinhronu prezentaciju metastaza u jetri i primarnog karcinoma.

Uznappedovali stadijum primarnog karcinoma T3 i T4 je bio prisutan kod 29 (96.7%) bolesnika. Kod dva bolesnika je pato-histološkom obradom preparata utvrđeno postojanje više od jednog karcinoma: jedan bolesnik je imao dva karcinoma rektuma stadijuma T4a i T1; drugi bolesnik je imao dva invazivna karcinoma (T3b i T1) i tri karcinoma *in situ*, u sklopu familijalne adenomatozne polipoze kolona.

Positivan limfonodalni status N1 i N2 je bio zastupljen kod 22 (73.3%) bolesnika. Broj analiziranih limfnih čvorova je bio manji od 12 kod 5 (16.6%) bolesnika. Vaskularna invazija, invazija limfatika i perineuralna invazija su bili prisutni kod 80, 66.7 i 46.7% bolesnika, respektivno. Mikroskopski zdravu resekcionu marginu (R0 status) je imalo 90% bolesnika.

**Tabela 8.** Pato-histološke karakteristike primarnog karcinoma

Karakteristike	Broj bolesnika, N=30	%
Duke's stadijum		
A	1	3.3
B	2	6.7
C	5	16.7
D	22	73.3
T stadijum		
T1-2	1	3.3
T3-4	29	96.7
N stadijum		
N0	8	26.7
N1-2	22	73.3
Broj analiziranih limfnih čvorova		
<12	5	16.6
≥12	25	83.4
Vaskularna invazija		
V0	6	20.0
V1	24	80.0
Invazija limfatika		
L0	10	33.3
L1	20	66.7
Perineuralna invazija		

PN0	16	53.3
PN1	14	46.7
Rezidualni status		
R0	27	90.0
R1	3	10.0

Prikaz broja pozitivnih žlezda i ukupnog broja analiziranih dat je u tabeli 9. Medijana broja pozitivnih žlezda je 2.5, a analiziranih 19.

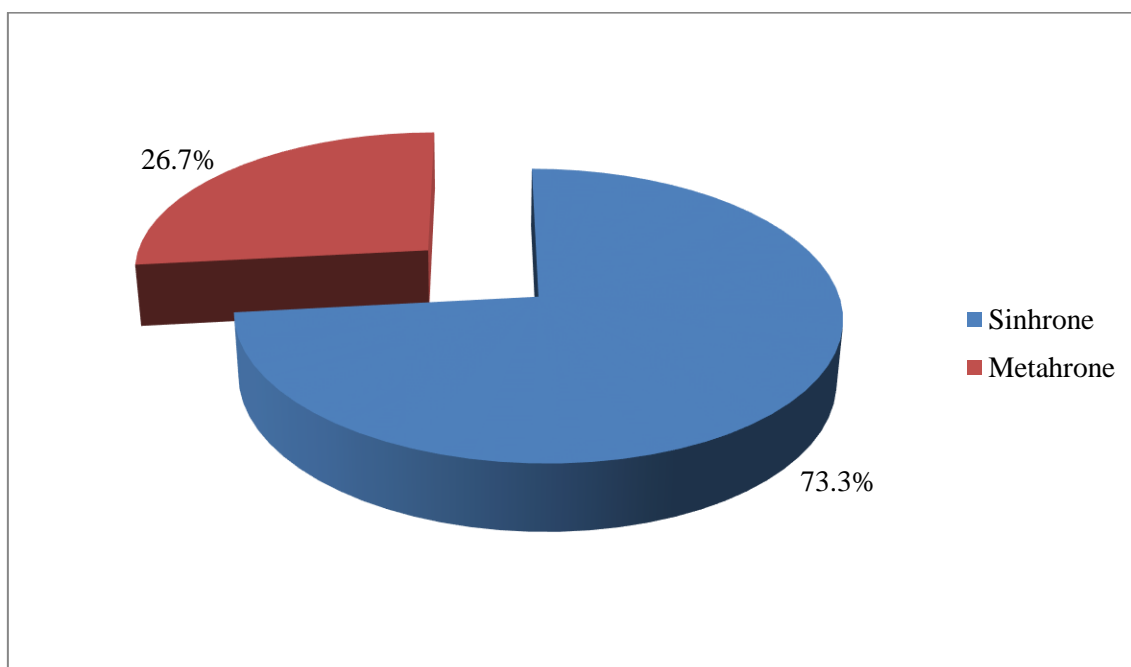
**Tabela 9.** Limfonodalni status primarnog karcinoma

	A.S	SD	Medijana	Minimum	Maksimum
Broj pozitivnih žlezda	4.0	5.73	2.5	0	28
Broj analiziranih žlezda	24.6	22.86	19.0	5	132

A.S, aritmetička sredina; SD, standardna devijacija

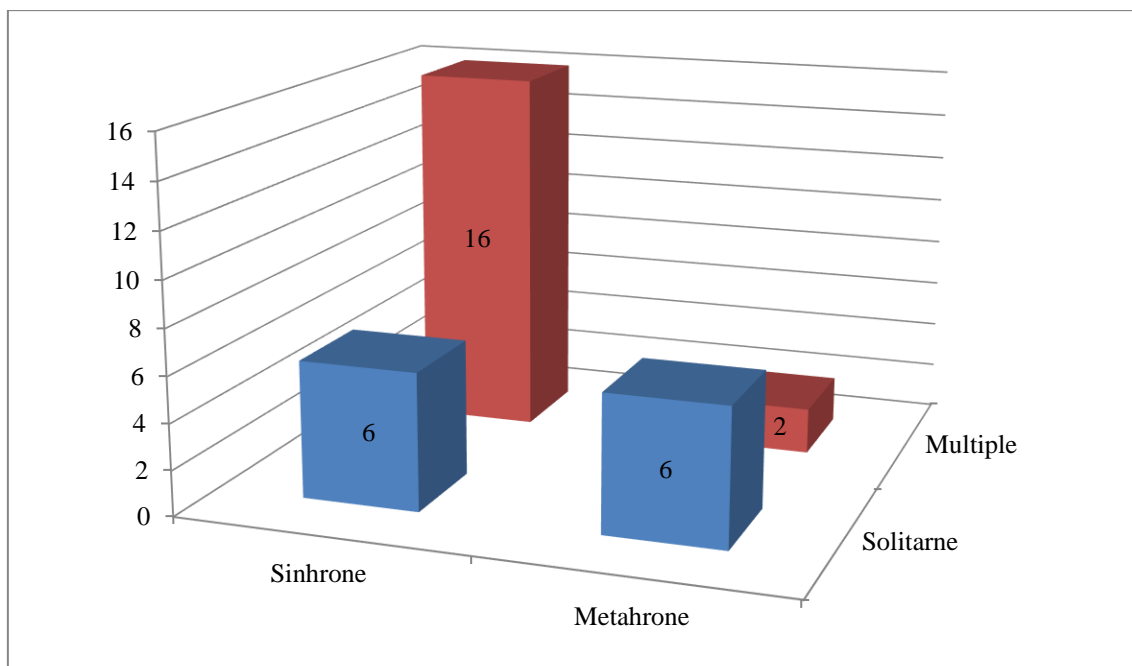
#### 4.1.3 Karakteristike metastaza kolorektalnog karcinoma u jetri

Sinhronne metastaze su bile prisutne kod 22 (73.3%) bolesnika (grafikon 7).



**Grafikon 7.** Vreme detekcije metastaza u odnosu na dijagnozu primarnog karcinoma

Multiple metastaze su bile statistički značajno zastupljenije od solitarnih kod bolesnika sa sinhronom prezentacijom bolesti u odnosu na metahrone,  $p=0.034$  (grafikon 8).



**Grafikon 8.** Distribucija sinhronih metastaza prema broju

Bolesnici sa sinhronim metastazama su češće primali preoperativnu hemioterapiju ( $p=0.035$ ) i imali bilobarnu distribuciju metastaza ( $p=0.035$ ) kao i više od tri metastaze ( $p=0.014$ ) u odnosu na bolesnike sa metahronim metastazama (tabela 10). Ove dve grupe bolesnika se nisu razlikovale u odnosu na stepen diferentovanosti tumora ( $p=0.682$ ) i zastupljenost metastaza sa maksimalnim dijametrom preko 50 mm ( $p=0.345$ ).

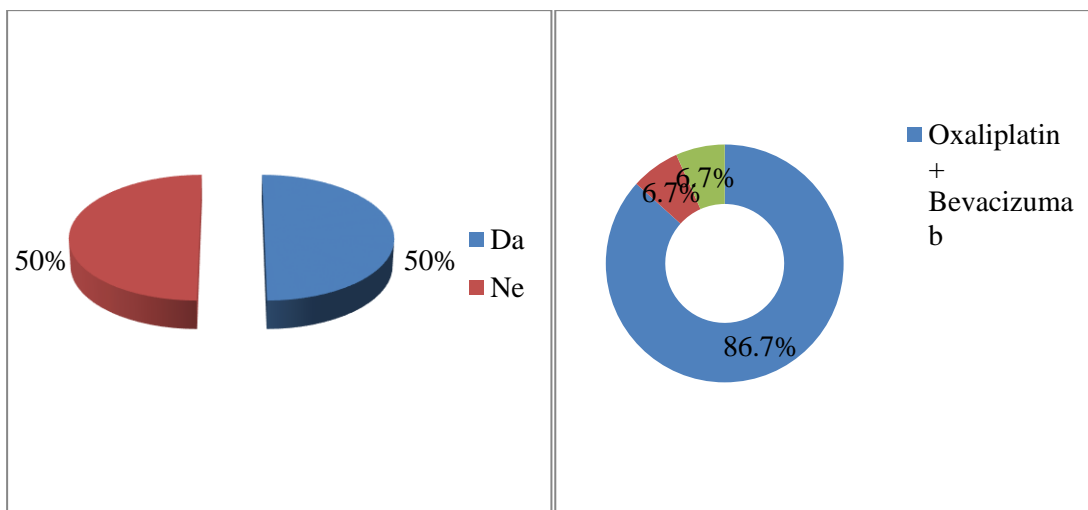


**Tabela 10.** Kliničko-patološke karakteristike sinhronih i metahronih metastaza

Karakteristike	Sinhrona metastaza n=22	Metahrona metastaza n=8	p
<b>Preoperativna HT</b>			
Da	14 (63.6)	1 (12.5)	0.035
Ne	8 (36.4)	7 (87.5)	
<b>Lobarna distribucija</b>			
Unilobarne	8 (36.4)	7 (87.5)	0.035
Bilobarne	14 (63.6)	1 (12.5)	
<b>Broj metastaza</b>			
≤3	11 (50)	8 (100)	0.014
>3	11 (50)	0	
<b>Maksimalni dijametar</b>			
≤50mm	18 (81.8)	5 (62.5)	0.345
>50mm	4 (18.2)	3 (37.5)	
<b>Stepen diferentovanosti</b>			
Dobro	10 (45.5)	5 (62.5)	0.682
Umereno	12 (54.5)	3 (37.5)	

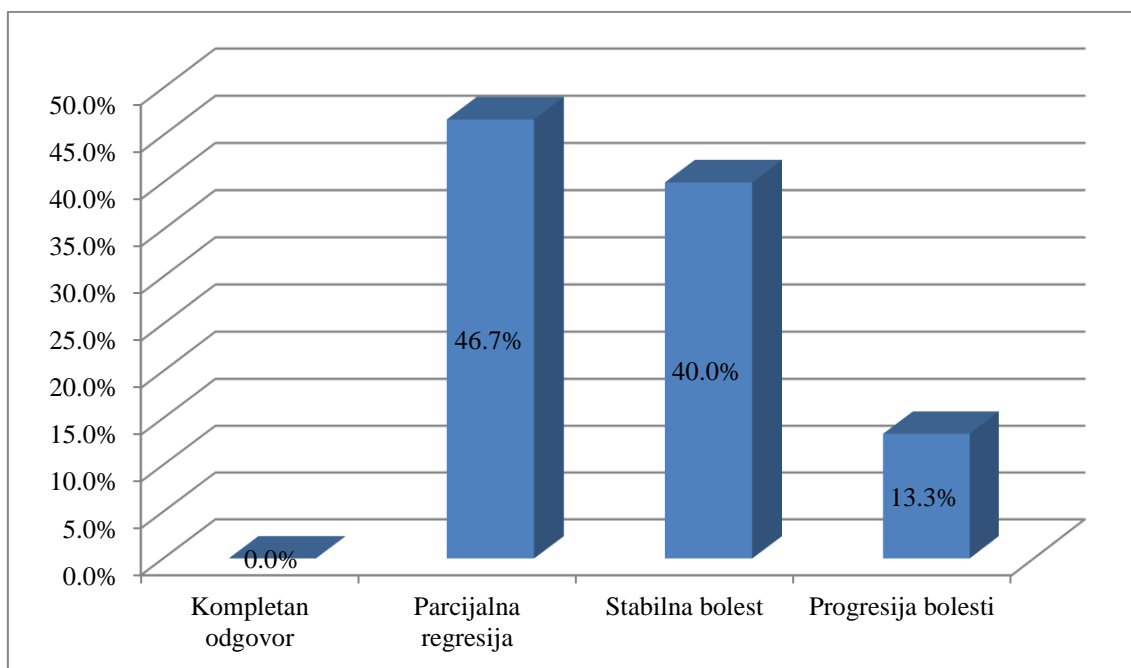
Vrednosti su izražene kao apsolutni broj (%); HT, hemioterapija

Preoperativnu hemioterapiju je primilo 15 (50%) bolesnika (grafikon 9). Hemioterapiju na bazi Oksaliplatina sa dodatkom biološkog agensa Bevacizumaba primilo je 87% bolesnika. Kod jednog bolesnika je hemioterapijsko lečenje započelo terapijom Oksaliplatina i Cetuksimaba a kod jednog bolesnika je ordinirana druga linija terapije Irinotekan i Cetuksimab, a nakon terapije Oksaliplatin i Bevacizumab (grafikon 10).



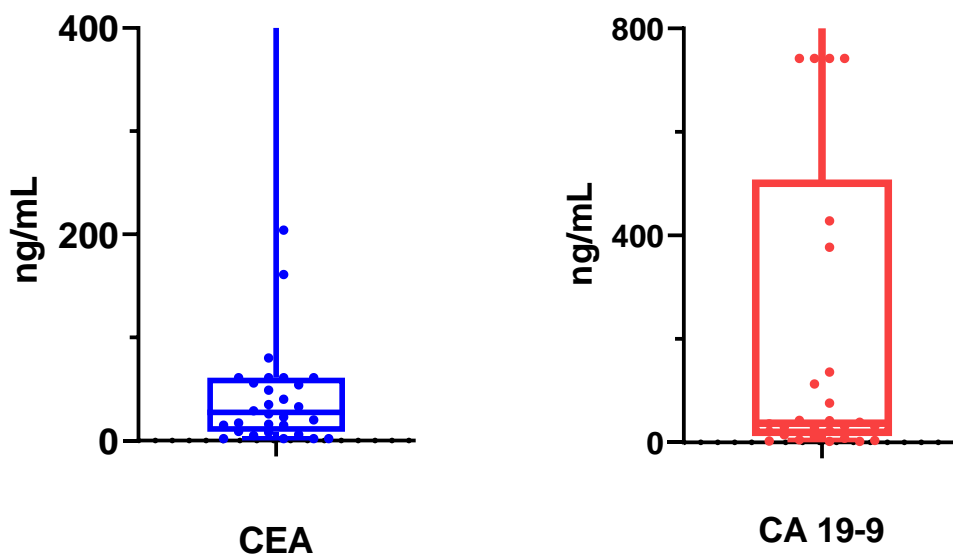
**Grafikon 9.** Preoperativna hemioterapija **Grafikon 10.** Vrsta preoperativne hemioterapije

Ni jedan od 15 bolesnika nije imao kompletan radiološki odgovor nakon primenjene HT (grafikon 11). Kod 46,7% bolesnika je registrovana parcijalna regresija a kod 40% stabilna bolest. Dvoje bolesnika je imalo progresiju bolesti na prvu liniju hemioterapije. Jedan od njih je dalje lečen hirurški a drugi je podvrgnut drugoj liniji HT.



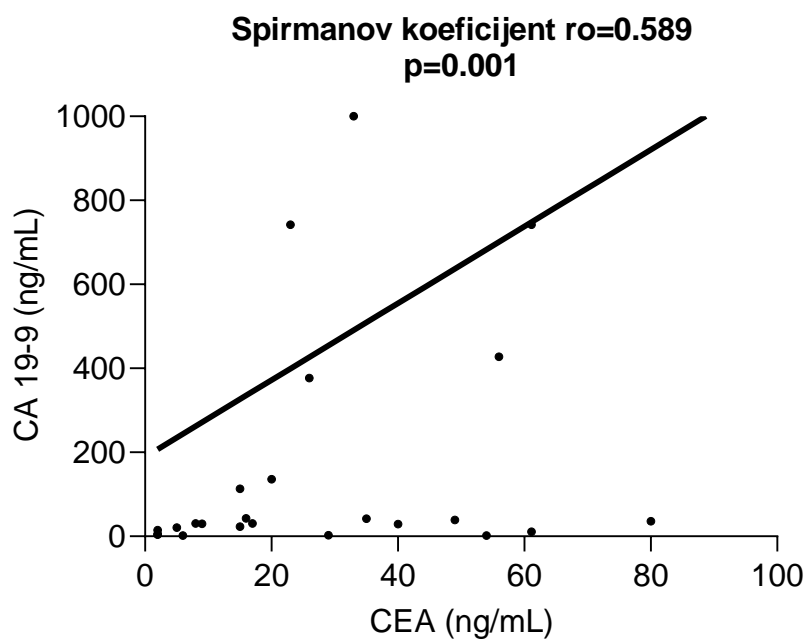
**Grafikon 11.** Odgovor metastaza na preoperativnu hemioterapiju

Medijana preoperativne vrednosti tumorskog markera CEA je bila 27.5 ng/mL (raspon, 2-704), a CA 19-9 37.5 (raspon, 2-12999), (grafikon 12).



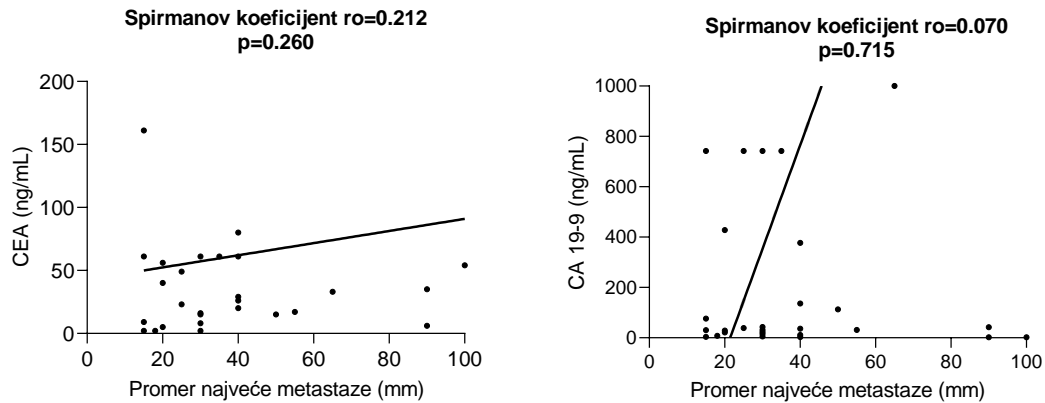
**Grafikon 12.** Preoperativne vrednosti tumorskih markera CEA i CA 19-9  
 CEA, karcinoembriogeni antigen; CA 19-9, karbohidrantni antigen 19-9

Vrednosti tumorskih markera CEA i CA 19-9 pokazuju pozitivnu, statistički značajnu korelaciju,  $p=0.001$  (grafikon 13).



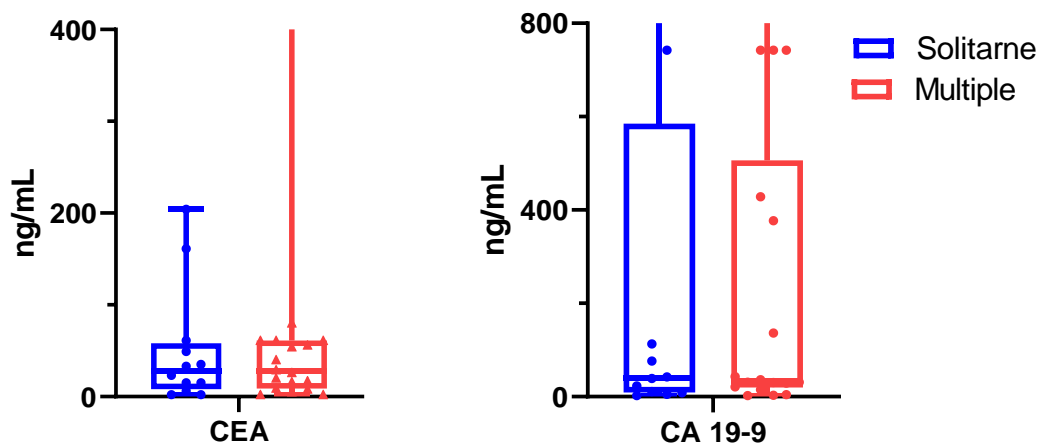
**Grafikon 13.** Korelacija vrednosti tumorskih markera CEA i CA 19-9

Vrednosti tumorskih markera CEA i CA 19-9 pokazuju pozitivnu korelaciju sa promerom najveće metastaze (grafikon 14), ali statistički značajna korelacija nije utvrđena ( $p=0.260$  i  $p=0.715$ , respektivno).



**Grafikon 14.** Korelacija promera najveće metastaze sa vrednostima tumorskih markera (levo: korelacija promera najveće metastaze i CEA; desno: korelacija promera najveće metastaze i CA 19-9)

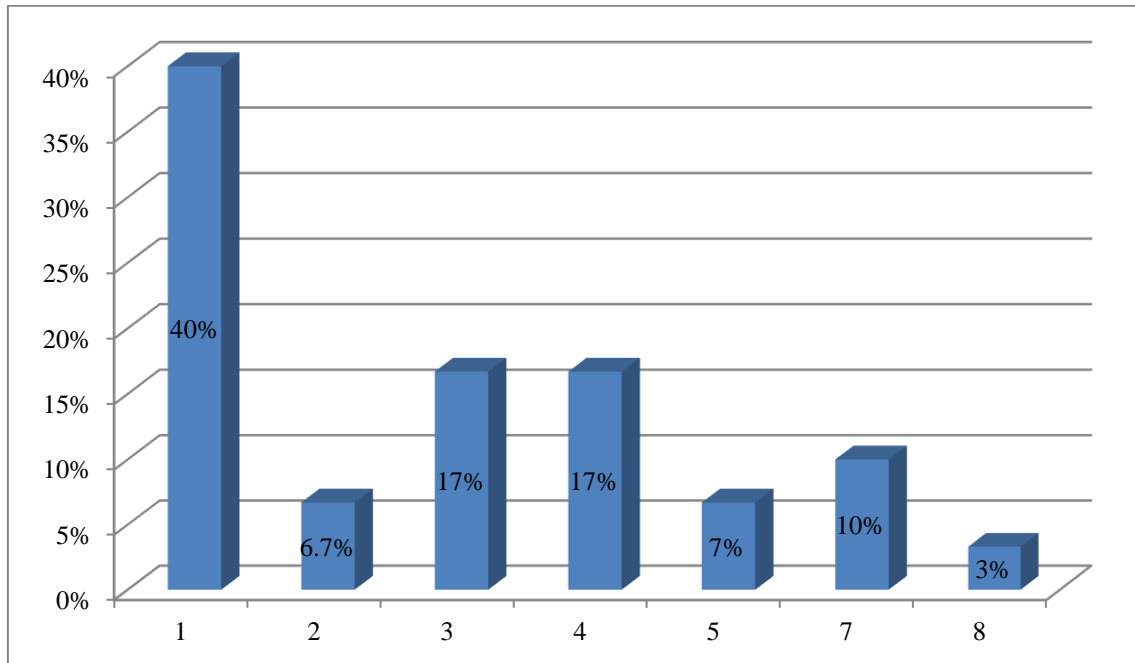
Vrednosti tumorskih markera se nisu razlikovale kod solitarnih i multiplih metastaza (CEA,  $p=0.815$ ; CA 19-9,  $p=0.966$ ) (grafikon 15).



**Grafikon 15.** Preoperativne vrednosti tumorskih markera kod solitarnih i multiplih metastaza

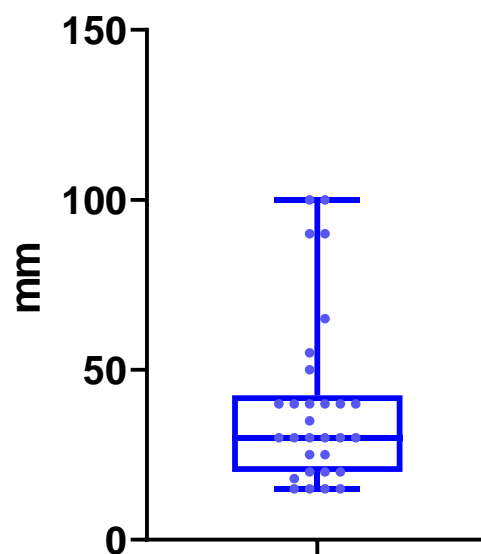
Preoperativne vrednosti tumorskih markera CEA i CA 19-9 se nisu razlikovale ni kod: unilobarnih i bilobarnih metastaza (CEA,  $p=0.983$ ; CA 19-9,  $p=0.383$ ) i blagog i umerenog stepena diferentovanosti metastatskog tumora (CEA,  $p=0.228$ ; CA 19-9,  $p=0.101$ ).

Ispitivani bolesnici su najčešće imali jednu metastazu, njih 40%. Kod 17% bolesnika je detektovano po tri, odnosno četiri metastaze. Dve metastaze, pet, sedam i osam su bile prisutne ređe. Distribucija broja metastaza u jetri je prikazana na grafikonu 16.



**Grafikon 16.** Distribucija bolesnika po broju metastaza

Medijana promera najveće metastaze je bila 30 mm (grafikon 17). Najmanja resecirana metastaza je bila 15 mm a najveća 100 mm.



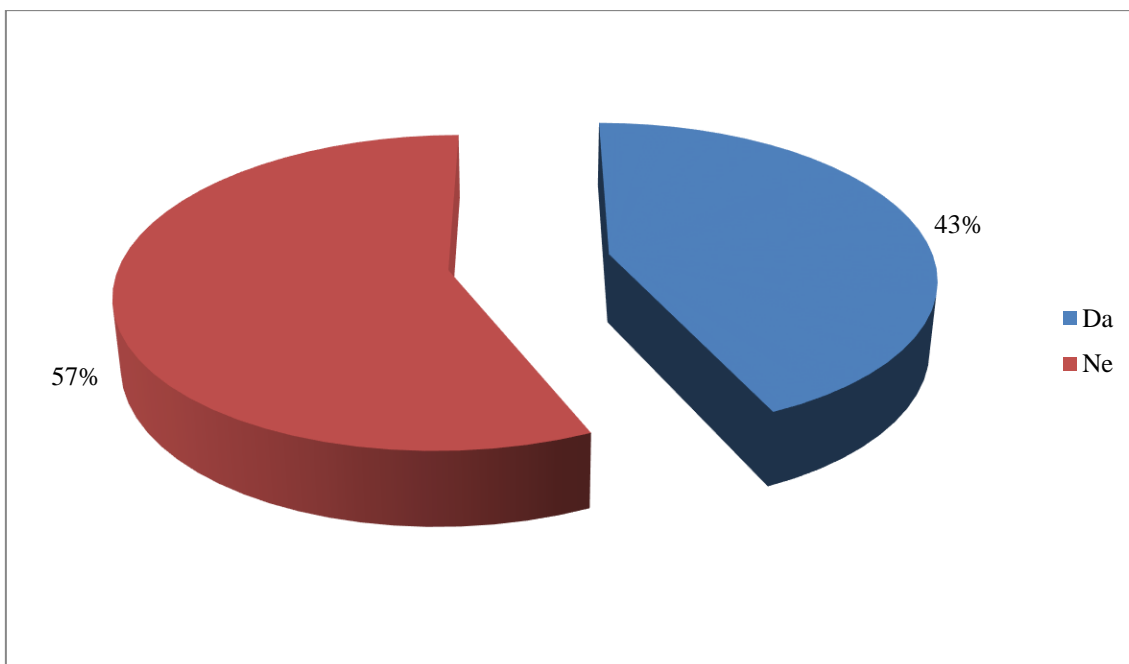
**Grafikon 17.** Promer najveće metastaze

Kliničko-patološke karakteristike metastaza u jetri su detaljno prikazane u tabeli 11. Bolesnici su najčešće imali više od jedne metastaze (60%). Većina bolesnika (63.3%) je imala tri ili manje od tri metastaze. Metastaze su kod polovine bolesnika bile bilobarno distribuirane. Promer najveće metastaze je bio 50mm i manji kod 23 bolesnika. Po 15 bolesnika je imalo dobro diferentovane i umereno diferentovane metastatske tumore. Pozitivna mikroskopska resekciona margina (R1) je bila prisutna kod 66.7%.

**Tabela 11.** Kliničko-patološke karakteristike metastaza u jetri

Karakteristike	Broj bolesnika	
	N=30	%
Solitarne	12	40.0
Multiple	18	60.0
Broj		
≤3	19	63.3
>3	11	36.7
Lobarna distribucija u jetri		
Unilobarne	15	50.0
Bilobarne	15	50.0
Promer najveće metastaze		
≤50mm	23	76.7
>50mm	7	23.3
Histološki gradus		
Dobro diferentovane (G1)	15	50.0
Umereno diferentovane (G2)	15	50.0
Rezidualni status		
R0	10	33.3
R1	20	66.7

Postoperativnu HT je primilo 43% bolesnika (grafikon 18).

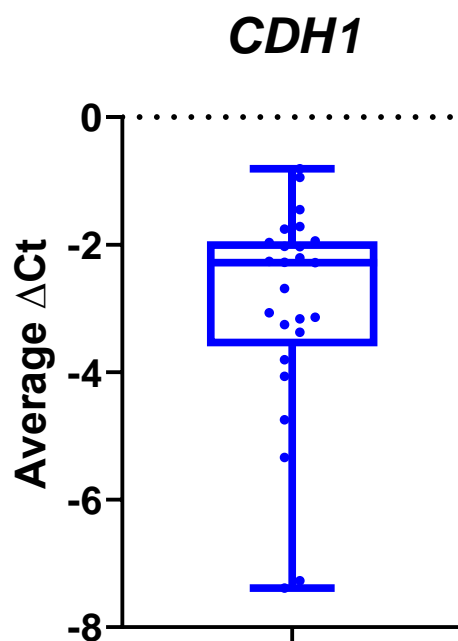


**Grafikon 18.** Postoperativna hemioterapija

## **4.2 Rezultati analize nivoa ekspresije genetičkih markera**

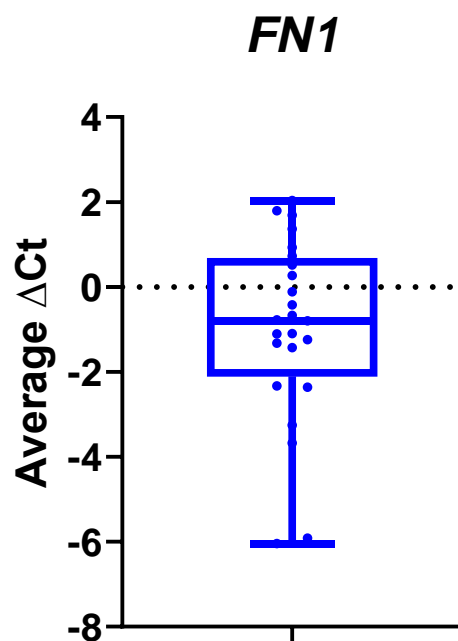
### **4.2.1 Nivo ekspresije u malignom metastatskom tkivu**

Ekspresija *CDHI* u malignom metastatskom tkivu jetre je određena kod 25 (83.3%) bolesnika. Medijana vrednosti  $\Delta Ct$  u malignom metastatskom tkivu je bila -2.28 a raspon -7.39- -0.81 (grafikon 19).



**Grafikon 19.** Ekspresija *CDH1* u malignom metastatskom tkivu jetre

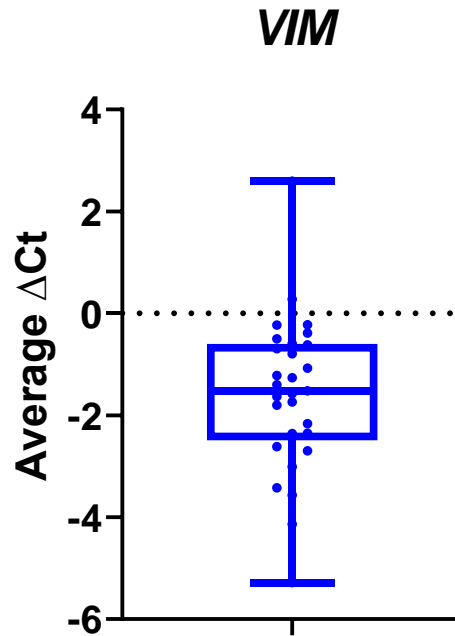
Ekspresija *FN1* u malignom metastatskom tkivu jetre je određena kod 24 (80%) bolesnika. Medijana vrednosti  $\Delta\text{Ct}$  u malignom metastatskom tkivu je bila -0.79 a raspon -6.06-2.03 (grafikon 20).



**Grafikon 20.** Ekspresija *FN1* u malignom metastatskom tkivu jetre



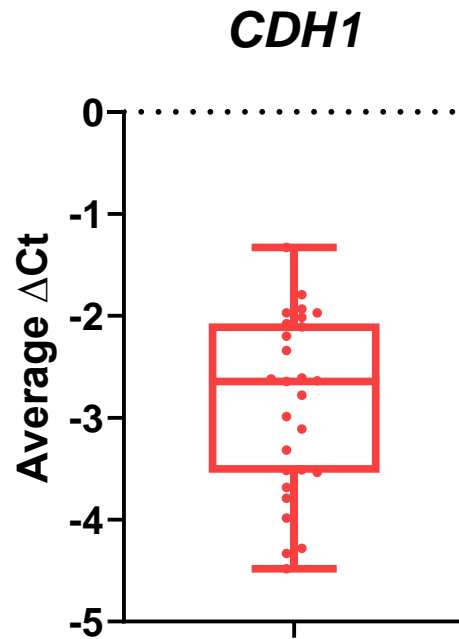
Ekspresija *VIM* u malignom metastatskom tkivu jetre je određena kod 29 (96.7%) bolesnika. Medijana vrednosti  $\Delta\text{Ct}$  u malignom metastatskom tkivu je bila -1.52 a raspon -5.28-2.59 (grafikon 21).



**Grafikon 21.** Ekspresija *VIM* u malignom metastatskom tkivu jetre

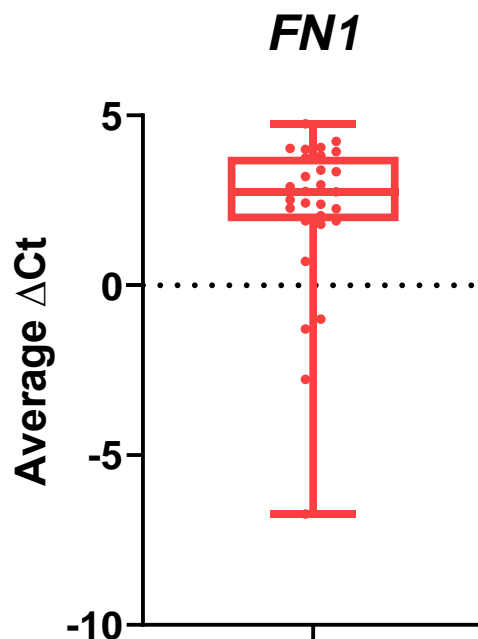
#### 4.2.2 Nivo ekspresije u zdravom tkivu jetre

Ekspresija *CDH1* u netumorskom tkivu jetre neposredno uz metastazu je određena kod 27 (90%) bolesnika. Medijana vrednosti  $\Delta\text{Ct}$  u netumorskom tkivu jetre neposredno uz metastazu je bila -2.64 a raspon -4.48- -1.33 (grafikon 22).



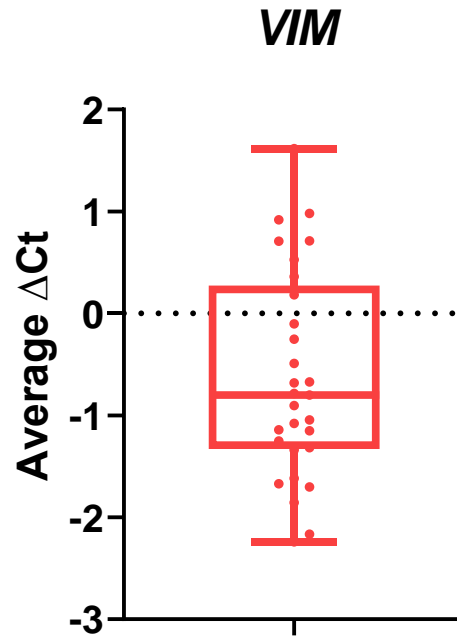
**Grafikon 22.** Ekspresija *CDH1* u netumorskom tkivu jetre neposredno uz metastazu

Ekspresija *FN1* u netumorskom tkivu jetre neposredno uz metastazu je određena kod 29 (96.7%) bolesnika. Medijana vrednosti  $\Delta\text{Ct}$  u netumorskom tkivu jetre neposredno uz metastazu je bila 2.75 a raspon -6.73-4.75 (grafikon 23).



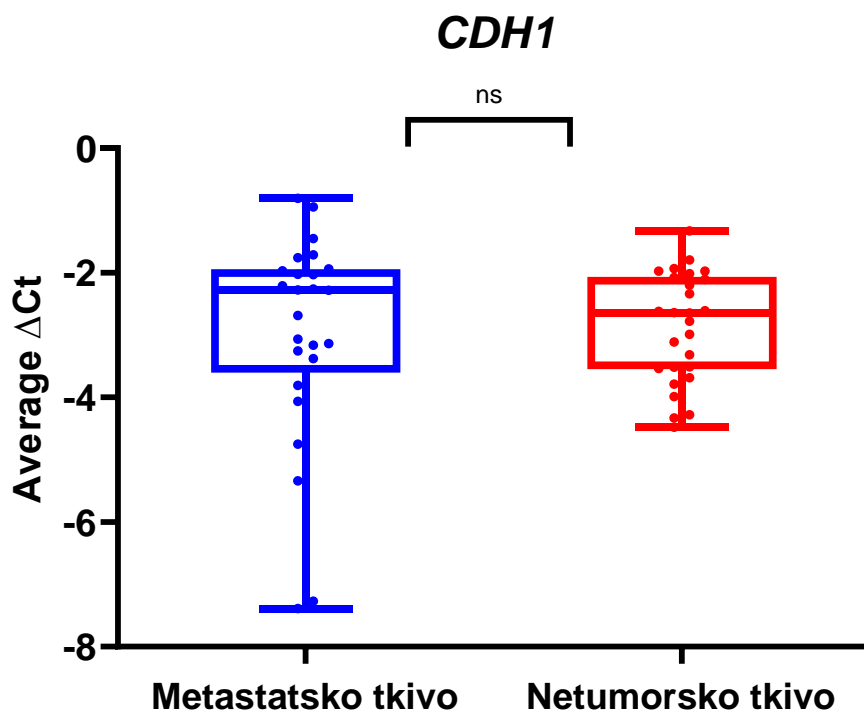
**Grafikon 23.** Ekspresija *FN1* u netumorskom tkivu jetre neposredno uz metastazu

Ekspresija *VIM* u netumorskom tkivu jetre neposredno uz metastazu je određena kod 29 (96.7%) bolesnika. Medijana vrednosti  $\Delta Ct$  u netumorskom tkivu jetre neposredno uz metastazu je bila -0.8 a raspon -2.24-1.61 (grafikon 24).



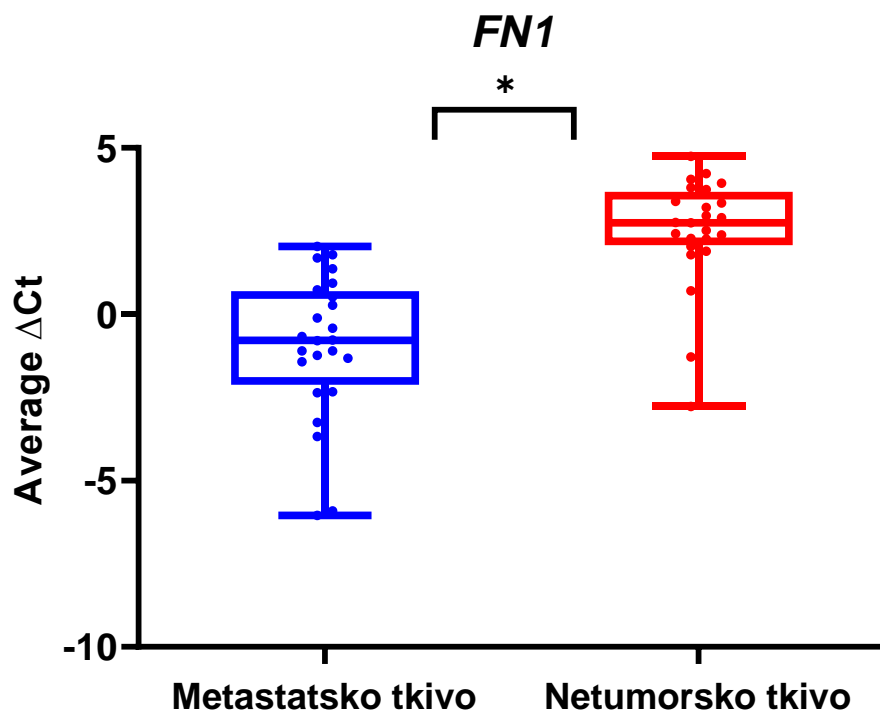
**Grafikon 24.** Ekspresija *VIM* u netumorskom tkivu jetre neposredno uz metastazu

Ekspresija *CDH1* u malignom metastatskom tkivu se statistički ne razlikuje u odnosu na ekspresiju u netumorskom tkivu jetre neposredno uz metastazu,  $p=0.989$  (grafikon 25).



**Grafikon 25.** Ekspresija *CDH1* u malignom metastatskom tkivu i netumorskom tkivu jetre neposredno uz metastazu  
ns, nema statistički značajne razlike

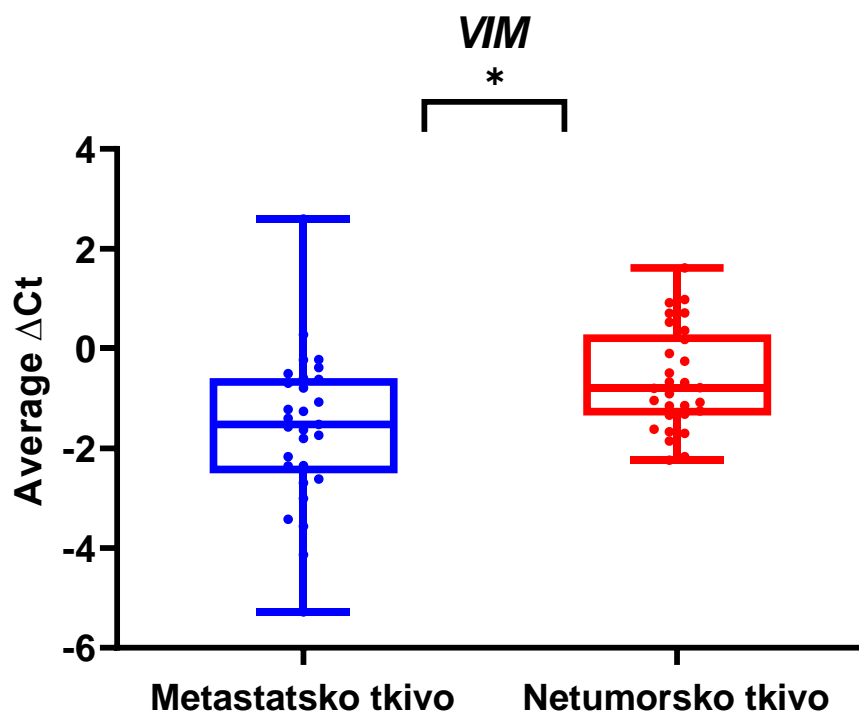
Prosečna ekspresija *FNI* u malignom metastatskom tkivu je bila statistički značajno manja od ekspresije u netumorskom tkivu jetre neposredno uz metastazu,  $p=0.003$  (grafikon 26).



**Grafikon 26.** Ekspresija *FN1* u malignom metastatskom tkivu i netumorskom tkivu jetre neposredno uz metastazu

\*,  $p < 0.05$

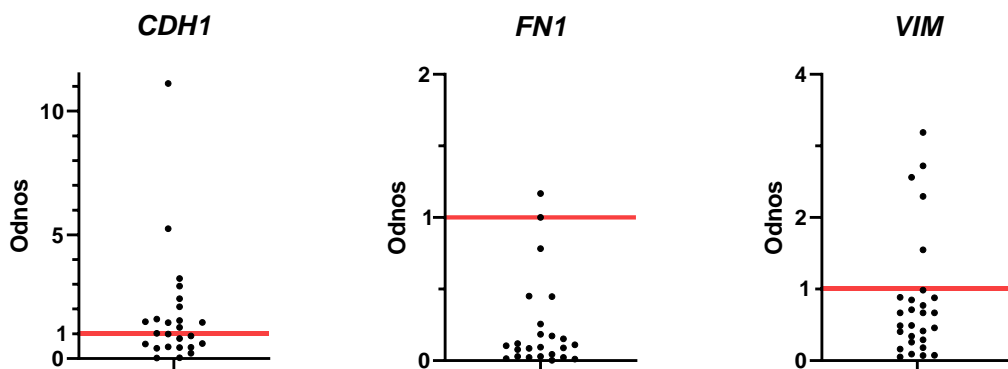
Prosečna ekspresija *VIM* u malignom metastatskom tkivu je bila statistički značajno manja od ekspresije u netumorskom tkivu jetre neposredno uz metastazu,  $p = 0.001$  (grafikon 27).



**Grafikon 27.** Ekspresija *VIM* u malignom metastatskom tkivu i netumorskom tkivu jetre neposredno uz metastazu

\*,  $p < 0.05$

Na osnovu ekspresije *CDH1*, *FN1* i *VIM* u malignom metastatskom tkivu jetre i netumorskom tkivu neposredno uz metastazu, određen je relativni odnos ovih parametara. Odnos ekspresije kod svakog bolesnika prikazan je na grafikonu 28 uz prikaz granične vrednosti 1 koja označava neizmenjenu ekspresiju u malignom metastatskom tkivu jetre u odnosu na netumorsko tkivo neposredno uz metastazu.



**Grafikon 28.** Odnos ekspresije *CDH1*, *FN1* i *VIM* u malignom metastatskom tkivu i netumorskom tkivu neposredno uz metastazu (1, granična vrednost)

Bolesnici kojima su određene ekspresije i u malignom tkivu i u netumorskom tkivu su na osnovu odnosa podeljeni u dve grupe:

- a) bolesnici sa sniženom ekspresijom u malignom tkivu u odnosu na netumorsko tkivo neposredno uz metastazu (odnos  $<1$ ) - “snižena ekspresija”,
- b) bolesnici sa povišenom ekspresijom u malignom tkivu u odnosu na netumorsko tkivo neposredno uz metastazu (odnos  $\geq 1$ ) – “povišena ekspresija”

Ekspresija *CDH1* i u malignom tkivu i u netumorskom tkivu je određena kod 25 bolesnika od kojih je 12 (48%) imalo sniženu ekspresiju a 13 (52%) povišenu ekspresiju.

Ekspresija *FN1* i u malignom tkivu i u netumorskom tkivu je određena kod 24 bolesnika a ekspresija *VIM* kod 29. Grupu sa sniženom ekspresijom *FN1* je činilo 22 (91.7%) bolesnika a grupu sa povišenom ekspresijom 2 (8.3%) bolesnika. Snižena ekspresija *VIM* je bila kod 24 (82.8%) a povišena kod 5 (17.2%) bolesnika.

Bolesnici sa povišenom *CDH1* ekspresijom u odnosu na sniženu ekspresiju su češće imali multiple metastaze ( $p=0.041$ ), bilobarnu distribuciju tumora ( $p=0.047$ ) i češće su primali preoperativnu hemioterapiju ( $p=0.005$ ). Navedene grupe se nisu razlikovale prema broju metastaza, promeru najveće metastaze, odgovoru na preoperativnu hemioterapiju, stepenu histološkog gradusa i rezidualnom statusu (R). Poređenje grupa je detaljno prikazano u tabeli 12.

**Tabela 12.** Kliničko-patološke karakteristike kod bolesnika sa sniženom i povišenom ekspresijom *CDHI*

Karakteristike	Snižena ekspresija	Povišena ekspresija	p
	<i>CDHI</i> n=12 (48)	<i>CDHI</i> n=13 (52)	
Solitarne	7 (58.3)	2 (15.4)	0.041
Multiple	5 (41.7)	11 (84.6)	
Broj			0.226
≤3	9 (75)	6 (46.2)	
>3	3 (25)	7 (53.8)	
Lobarna distribucija u jetri			0.047
Unilobarne	8 (66.7)	3 (23.1)	
Bilobarne	4 (33.3)	10 (76.9)	
Promer najveće metastaze			0.999
≤50mm	10 (83.3)	10 (76.9)	
>50mm	2 (16.7)	3 (23.1)	
Preoperativna hemioterapija			0.005
Da	2 (16.7)	10 (76.9)	
Ne	10 (83.3)	3 (23.1)	
Odgovor na hemioterapiju			0.214
Parcijalna regresija	2 (100)	5 (50)	
Stabilna bolest	0	3 (30)	
Progresija bolesti	0	2 (20)	
Histološki gradus			0.695
Dobro diferentovane (G1)	7 (58.3)	6 (46.2)	
Umereno diferentovane (G2)	5 (41.7)	7 (53.8)	
Rezidualni status			0.645
R0	3 (25)	2 (15.4)	
R1	9 (75)	11 (84.6)	

Vrednosti su izražene kao apsolutni broj (procenat)

Grupe bolesnika sa sniženom i povišenom *FNI* ekspresijom se nisu razlikovale prema kliničkim i patološkim parametrima prikazanim u tabeli 13.



**Tabela 13.** Kliničko-patološke karakteristike kod bolesnika sa sniženom i povišenom ekspresijom *FNI*

Karakteristike	Snižena ekspresija <i>FNI</i> n=22 (91.7)	Povišena ekspresija <i>FNI</i> n=2 (8.3)	p
Solitarne	10 (45.5)	0	0.493
Multiple	12 (54.5)	2 (100)	
Broj			0.163
≤3	14 (63.6)	0	
>3	8 (36.4)	2 (100)	
Lobarna distribucija u jetri			0.428
Unilobarne	11 (50)	0	
Bilobarne	11 (50)	2 (100)	
Promer najveće metastaze			0.999
≤50mm	16 (72.7)	2 (100)	
>50mm	6 (27.3)	0	
Preoperativna hemioterapija			0.199
Da	9 (40.9)	2 (100)	
Ne	13 (59.1)	0	
Odgovor na hemioterapiju			0.565
Parcijalna regresija	4 (44.4)	1 (50)	
Stabilna bolest	2 (22.3)	1 (50)	
Progresija bolesti	3 (33.3)	0	
Histološki gradus			1
Dobro diferentovane (G1)	11 (50)	1 (50)	
Umereno diferentovane (G2)	11 (50)	1 (50)	
Rezidualni status			0.054
R0	4 (18.2)	2 (100)	
R1	18 (81.8)	0	

Vrednosti su izražene kao apsolutni broj (procenat)

Grupe bolesnika sa sniženom i povišenom *VIM* ekspresijom se nisu razlikovale prema kliničkim i patološkim parametrima prikazanim u tabeli 14.

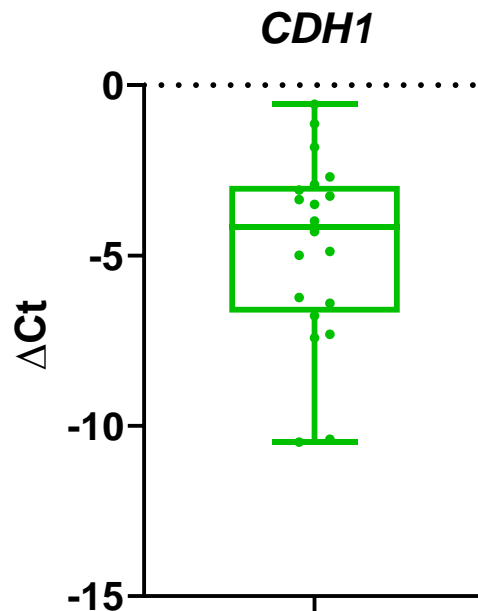
**Tabela 14.** Kliničko-patološke karakteristike kod bolesnika sa sniženom i povišenom ekspresijom *VIM*

Karakteristike	Snižena ekspresija <i>VIM</i>	Povišena ekspresija <i>VIM</i>	p
	n=24 (82.8)	n=5 (17.2)	
Solitarne	8 (33.3)	3 (60)	0.339
Multiple	16 (66.7)	2 (40)	
Broj			0.999
≤3	15 (62.5)	3 (60)	
>3	9 (37.5)	2 (40)	
Lobarna distribucija u jetri			0.651
Unilobarne	11 (45.8)	3 (60)	
Bilobarne	13 (54.2)	2 (40)	
Promer najveće metastaze			0.569
≤50mm	19 (79.2)	3 (60)	
>50mm	5 (20.8)	2 (40)	
Preoperativna hemioterapija			0.999
Da	12 (50)	2 (40)	
Ne	12 (50)	3 (60)	
Odgovor na hemioterapiju			0.122
Parcijalna regresija	7 (58.3)	0	
Stabilna bolest	3 (25)	2 (100)	
Progresija bolesti	2 (16.7)	0	
Histološki gradus			0.999
Dobro diferentovane (G1)	12 (50)	2 (40)	
Umereno diferentovane (G2)	12 (50)	3 (60)	
Rezidualni status			0.153
R0	9 (37.5)	0	
R1	15 (62.5)	5 (100)	

Vrednosti su izražene kao apsolutni broj (procenat)

### 4.2.3 Nivo ekspresije u serumu

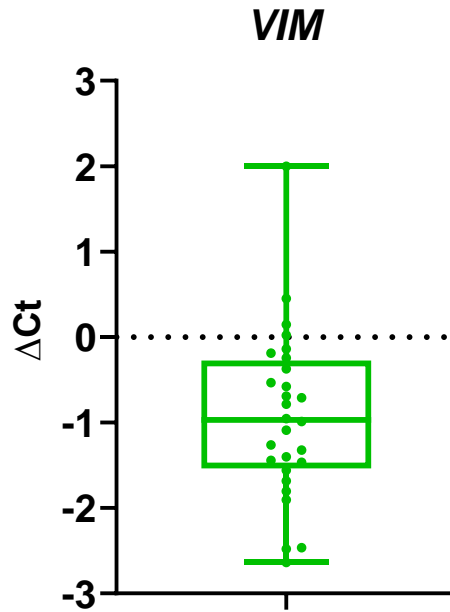
Ekspresija *CDH1* u serumu je određena kod 20 (66.7%) bolesnika. Medijana vrednosti  $\Delta Ct$  u serumu je bila -4.15 a raspon -10.48- -0.56 (grafikon 29).



**Grafikon 29.** Ekspresija *CDH1* u serumu

Ekspresija *FNI* u serumu nije detektovana ni kod jednog bolesnika.

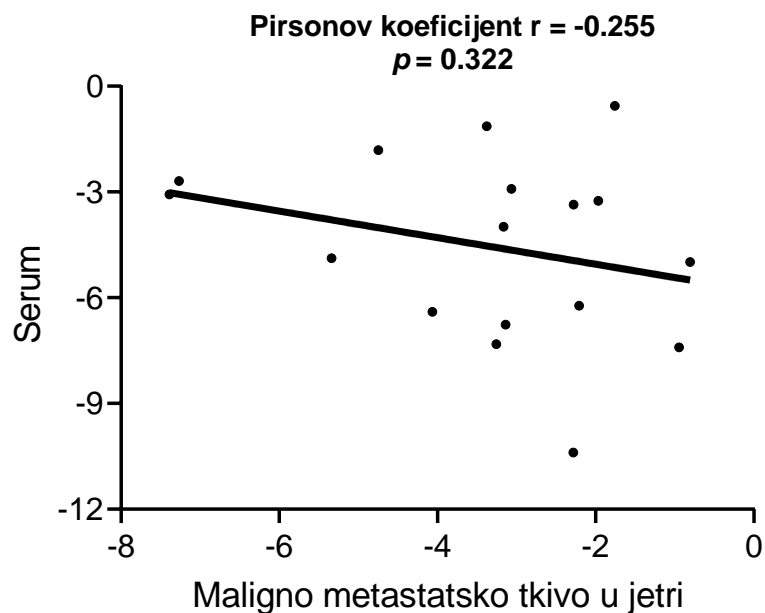
Ekspresija *VIM* u serumu je određena kod 28 (93.3%) bolesnika. Medijana vrednosti  $\Delta Ct$  u serumu je bila -0.97 a raspon -2.64-1.99 (grafikon 30).



Grafikon 30. Ekspresija *VIM* u serumu

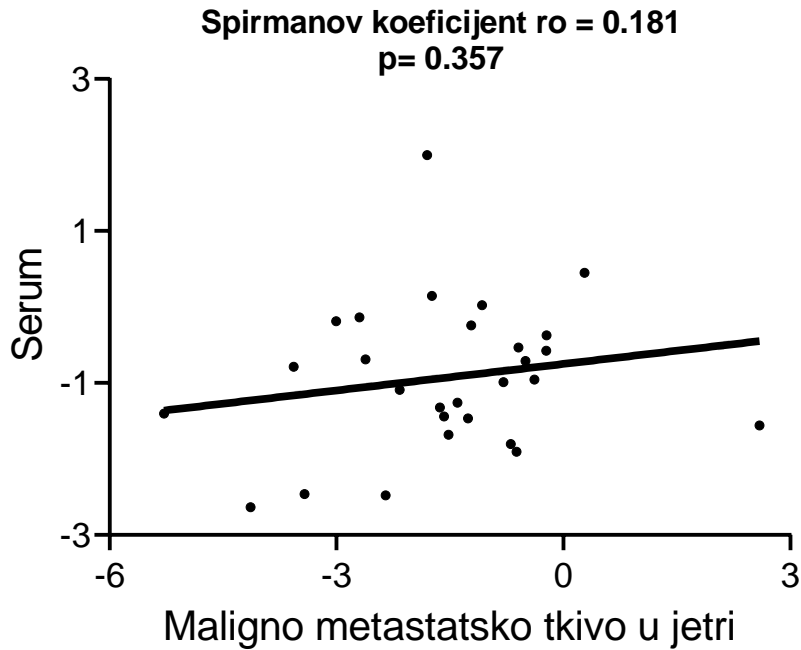
#### 4.3 Korelacija nivoa ekspresije genetičkih markera u tkivima

Ekspresija *CDH1* u malignom metastatskom tkivu jetre pokazuje negativnu korelaciju sa serumskom ekspresijom (Pirsonov koeficijent korelacije,  $r=-0.255$ ), ali statistička značajnost nije utvrđena,  $p=0.322$  (grafikon 31).



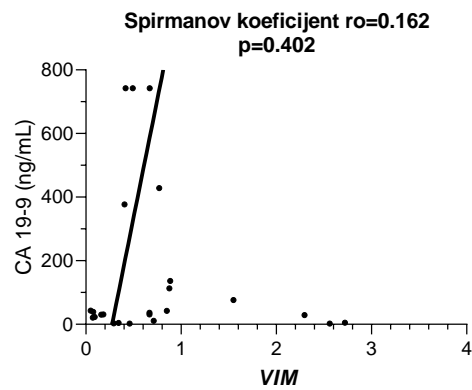
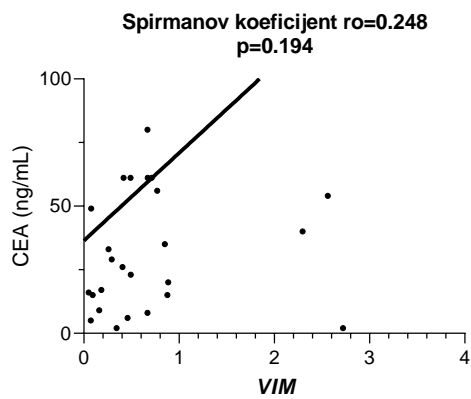
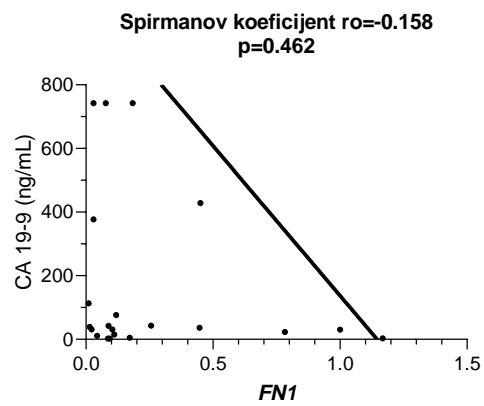
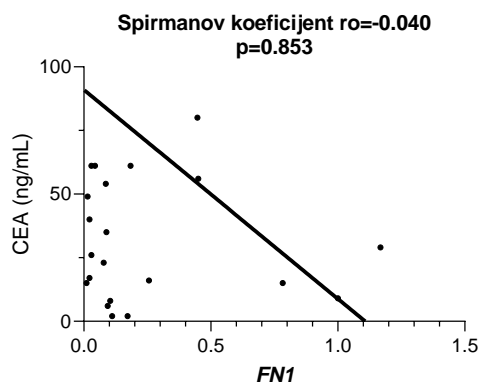
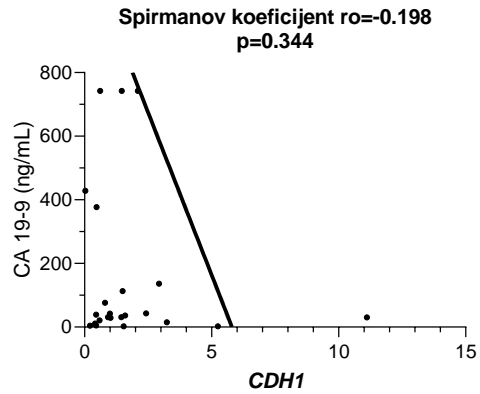
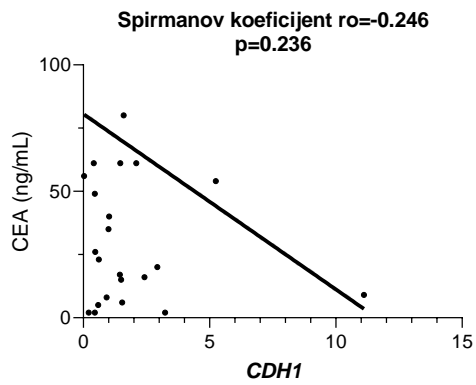
Grafikon 31. Korelacija nivoa ekspresije *CDH1* u malignom metastatskom tkivu jetre i serumu

Ekspresija *VIM* u malignom metastatskom tkivu jetre ne korelira značajno sa ekspresijom istog gena u serumu (Spirmanov koeficijent korelacije,  $r_o=0.181$ ;  $p=0.357$ ). Korelacija je rikazana na grafikonu 32.



**Grafikon 32.** Korelacija nivoa ekspresije *VIM* u malignom metastatskom tkivu jetre i serumu

Preoperativne vrednosti tumorskih markera CEA i CA 19-9 ne koreliraju sa ekspresijom *CDH1*, *FNI* i *VIM* u malignom metastatskom tkivu jetre. *CDH1* i *FNI* pokazuju negativnu korelaciju sa tumorskim markerima CEA i CA 19-9 dok *VIM* pokazuje pozitivan trend korelacije sa tumorskim markerima CEA i CA 19-9. Korelacija je ilustrovana na grafikonu 33 sa prikazanim vrednostima odgovarajućeg koeficijenta korelacije i nivoom značajnosti p.

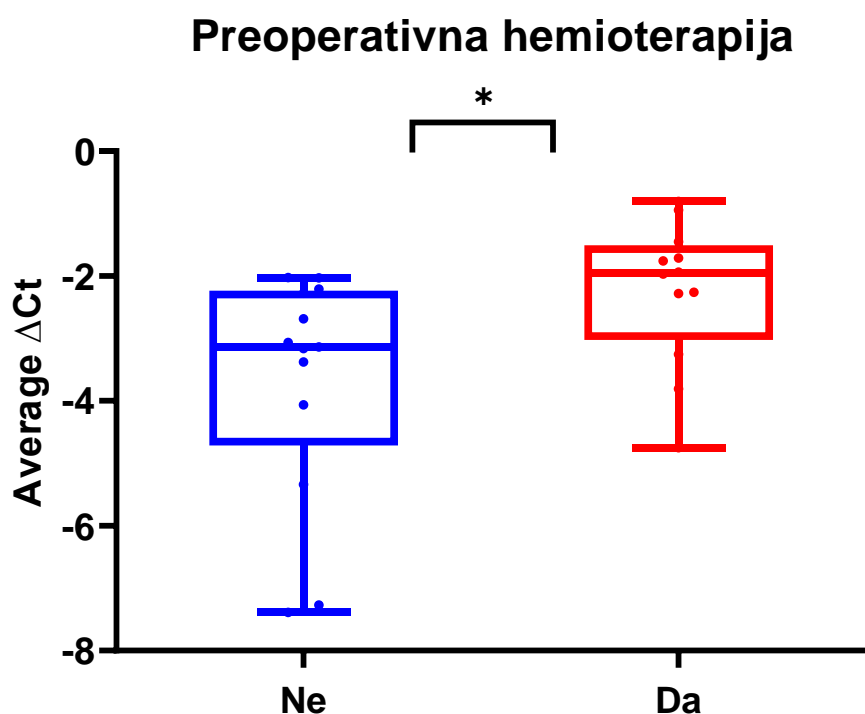


**Grafikon 33.** Korelacija ekspresije *CDH1*, *FN1* i *VIM* u malignom metastatskom tkivu jetre i tumorskih markera CEA i CA 19-9

#### 4.4 Nivo ekspresije u zavisnosti od odgovora na preoperativnu hemioterapiju

Preoperativnu HT je primilo 15 (50%) bolesnika. Sedam bolesnika je imalo parcijalnu regresiju metastaza nakon primene preoperativne HT, šest je imalo stabilnu bolest a kod dvoje bolesnika je registrovana progresija bolesti.

Prosečna vrednost ekspresije *CDHI* u malignom metastatskom tkivu je bila veća kod bolesnika koji su primili preoperativnu HT u odnosu na one koji nisu primili HT (-2.24 vs. -3.69,  $p=0.016$ ). Poređenje dve grupe je prikazano na grafikonu 34.



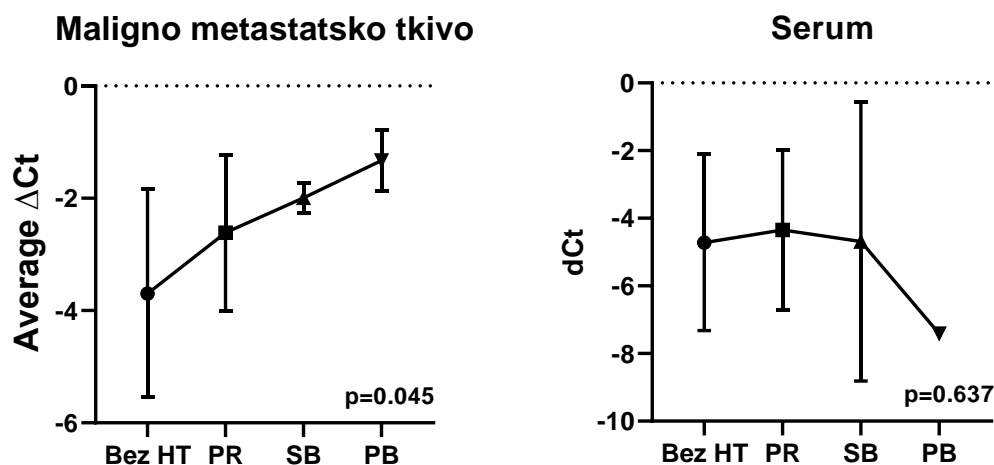
**Grafikon 34.** Ekspresija *CDHI* u malignom metastatskom tkivu u zavisnosti od primene preoperativne hemioterapije

\*,  $p<0.05$

Prosečne vrednosti ekspresije *FNI* i *VIM* u odgovarajućem malignom metastatskom tkivu su bile slične kod bolesnika sa i bez preoperativne HT. Prosečne vrednosti ekspresije *CDHI* i *VIM* u serumu su bile slične kod bolesnika sa i bez preoperativne HT.

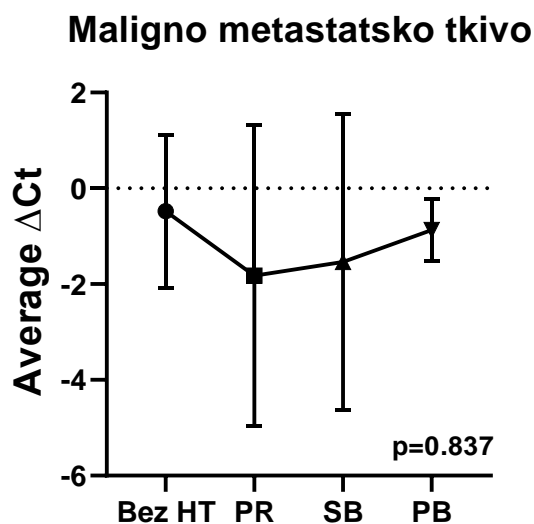
Prosečna vrednost  $\Delta Ct$  (SD) u malignom metastatskom tkivu kod bolesnika koji nisu primili preoperativnu HT je bila -3.69 (1.85); kod bolesnika sa parcijalnom regresijom -2.61 (1.39); sa stabilnom bolešću -1.99 (0.27); sa progresijom bolesti -1.33 (0.54). Poređenjem prosečnih

vrednosti ekspresije *CDHI* u malignom metastatskom tkivu kod bolesnika koji su ispoljili različit odgovor na preoperativnu hemioterapiju, uočena je statistički značajna razlika,  $p=0.045$ . Prosečne vrednosti ekspresije *CDHI* u serumu se nisu razlikovale među grupama (grafikon 35).



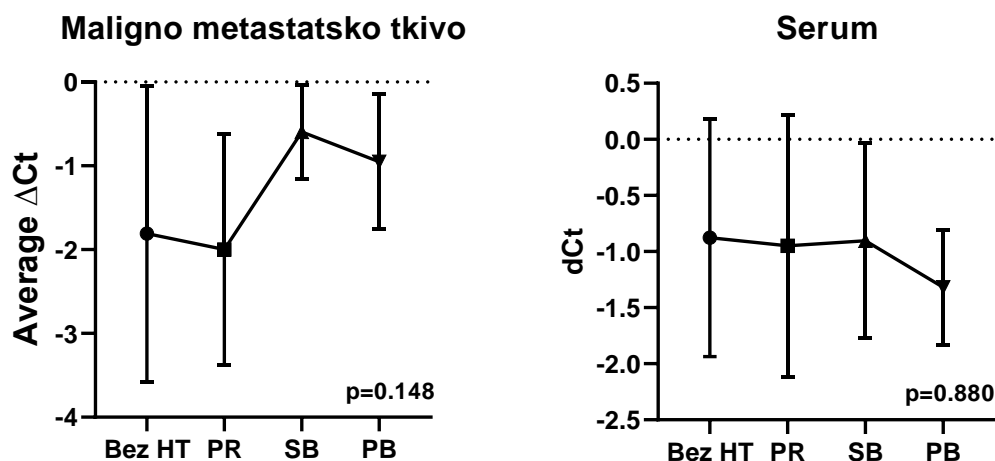
**Grafikon 35.** Ekspresija *CDHI* u zavisnosti od odgovora na preoperativnu hemioterapiju HT, hemioterapija; PR, parcijalna regresija; SB, stabilna bolest; PB, progresija bolesti

Prosečne vrednosti ekspresije *FNI* i *VIM* u malignom metastatskom tkivu kao i *VIM* u serumu se nisu razlikovale kod prethodno navedenih grupa. (grafikon 36 i grafikon 37)



**Grafikon 36.** Ekspresija *FNI* u zavisnosti od odgovora na preoperativnu hemioterapiju HT, hemioterapija; PR, parcijalna regresija; SB, stabilna bolest; PB, progresija bolesti





**Grafikon 37.** Ekspresija *VIM* u zavisnosti od odgovora na preoperativnu hemioterapiju HT, hemioterapija; PR, parcijalna regresija; SB, stabilna bolest; PB, progresija bolesti

#### 4.5 Predikcija ranog recidiva bolesti

Za vrednosti ekspresije *CDH1*, *FNI* i *VIM* u malignom metastatskom tkivu i serumu konstruisane su ROC (*engl.*, receiver operating characteristic) krive. Na osnovu ROC kriva konstruisane su granične (*engl.*, cut-off) vrednosti ekspresije u odgovarajućem tkivu. Karakteristike ROC kriva, granične vrednosti i njihove specifičnosti i senzitivnosti su detaljno prikazane za *CDH1*, *FNI* i *VIM* u malignom metastatskom tkivu i serumu u tabeli 15.

**Tabela 15.** Karakteristike ROC krive i granične vrednosti za ekspresiju u malignom metastatskom tkivu i serumu

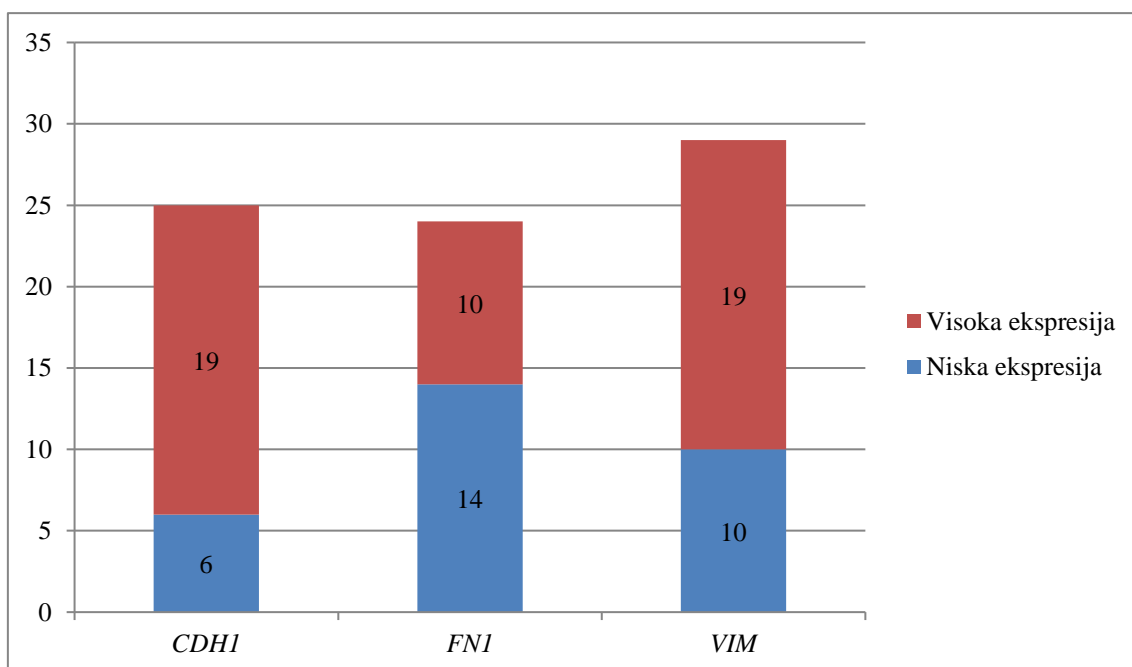
	Površina ispod krive (AUC)	95% interval poverenja	p	Granična vrednost	Senzitivnost (%)	Specifičnost (%)
<i>CDH1</i> u malignom tkivu	0.714	0.490-0.939	0.071	-3.59	54.5	99.9
<i>CDH1</i> u serumu	0.525	0.256-0.794	0.849	-3.16	44.4	81.8
<i>FNI</i> u	0.643	0.414-0.872	0.242	-0.54	60.0	71.4

malignom tkivu						
<i>VIM</i> u malignom tkivu	0.586	0.364-0.807	0.432	-1.98	50.0	60.0
<i>VIM</i> u serumu	0.595	0.377-0.812	0.394	0.26	92.3	40.0

ROC kriva, receiver operating characteristic (*engl.*) kriva; AUC, area under the curve (*engl.*)

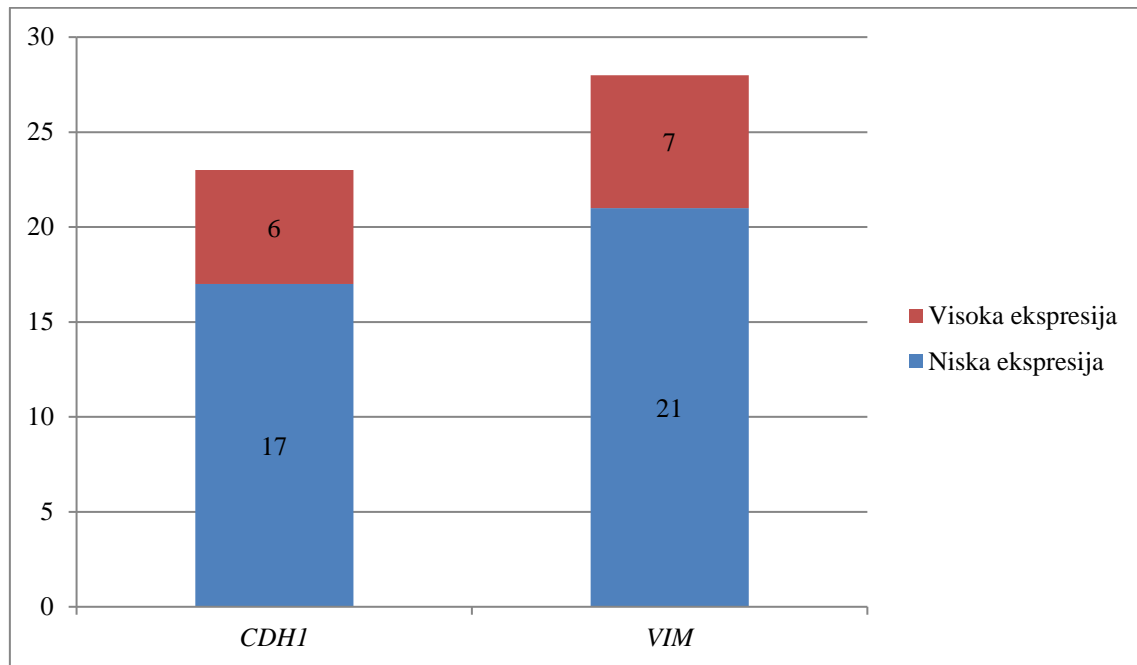
Na osnovu graničnih vrednosti, bolesnici su podeljeni u grupe sa niskom i visokom ekspresijom u malignom metastatskom tkivu jetre (grafikon 38) i serumu (grafikon 39).

Grupu sa niskom ekspresijom *CDH1* u malignom metastatskom tkivu jetre je činilo 6 (24%) bolesnika a sa visokom ekspresijom 19 (76%). Grupu sa niskom ekspresijom *FNI* u malignom metastatskom tkivu jetre je činilo 14 (58.3%) bolesnika a sa visokom ekspresijom 10 (41.7%), a kod *VIM* 10 (33.3%) u grupi sa niskom i 19 (63.3%) u grupi sa visokom ekspresijom.



**Grafikon 38.** Distribucija bolesnika sa niskom i visokom ekspresijom *CDH1*, *FNI* i *VIM* u malignom metastatskom tkivu

Grupu sa niskom ekspresijom *CDHI* u serumu je činilo 14 (70%) bolesnika a sa visokom ekspresijom 6 (30%), a kod *VIM* 21 (75%) u grupi sa niskom i 7 (25%) u grupi sa visokom ekspresijom.



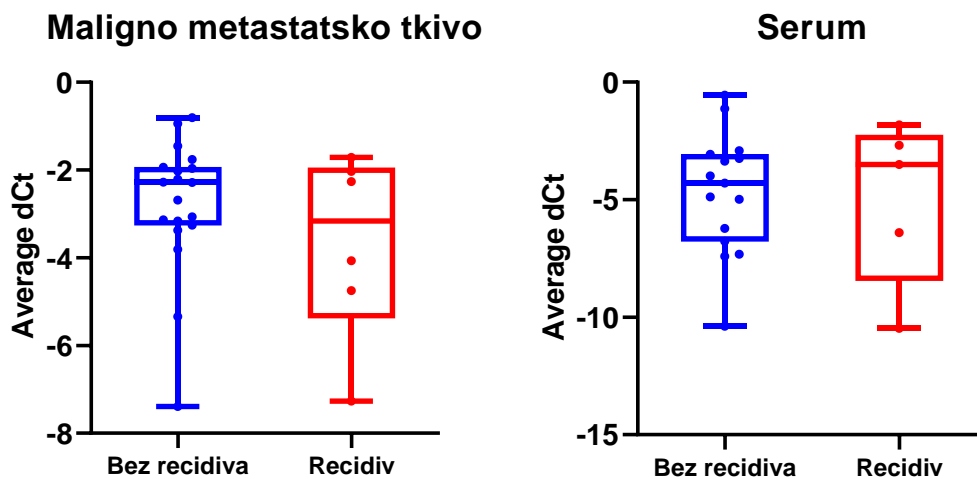
**Grafikon 39.** Distribucija bolesnika sa niskom i visokom ekspresijom *CDHI* i *VIM* u serumu

Bolesnici su praćeni 12 meseci. Troje bolesnika (30%) je dobilo recidiv bolesti do šestog meseca praćenja: prvi i drugi bolesnik nakon četiri meseca od operacije jetre a treći šest meseci nakon operacije.

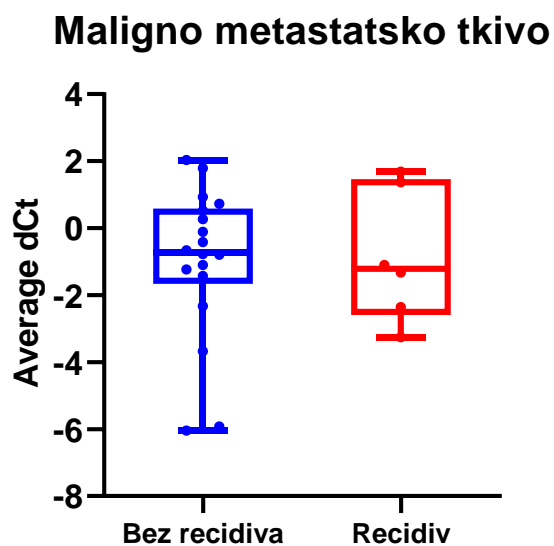
Prosečna ekspresija *CDHI* u malignom metastatskom tkivu jetre se nije razlikovala kod bolesnika sa i bez recidiva bolesti nakon šestomesečnog perioda praćenja,  $p=0.483$  (grafikon 40). Ekspresija *CDHI* u serumu se takođe nije razlikovala kod grupa sa i bez recidiva bolesti ( $p=0.705$ ).

Ekspresija *FNI* u malignom metastatskom tkivu jetre je bila slična kod bolesnika sa i bez šestomesečnog recidiva,  $p=0.359$  (grafikon 41).

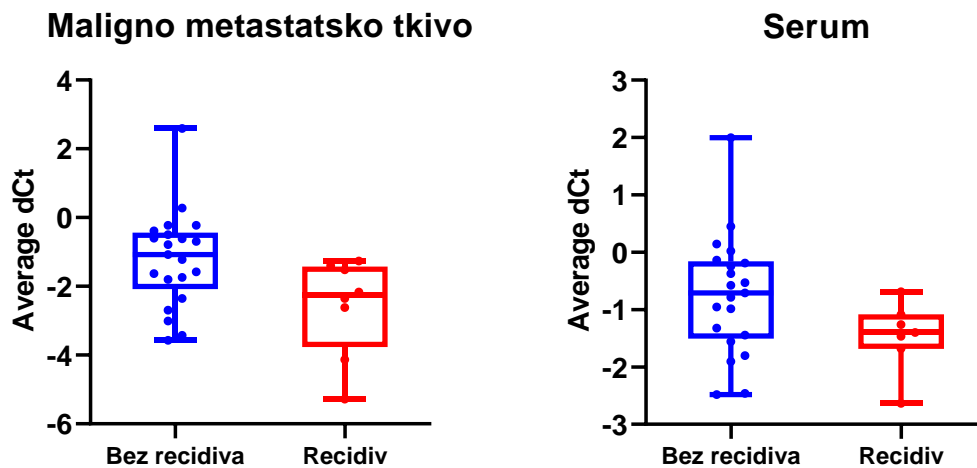
Ekspresija *VIM* u metastatskom malignom tkivu je bila viša kod bolesnika bez recidiva bolesti nego kod bolesnika bez recidiva ( $p=0.038$ ). Ekspresija u serumu se nije razlikovala u zavisnosti od pojave šestomesečnog recidiva bolesti ( $p=0.929$ ). Distribucija vrednosti ekspresije *VIM* kod ovih grupa je ilustrovana na grafikonu 42.



**Grafikon 40.** Ekspresija *CDHI* kod bolesnika sa i bez recidiva u šestomesečnom praćenju



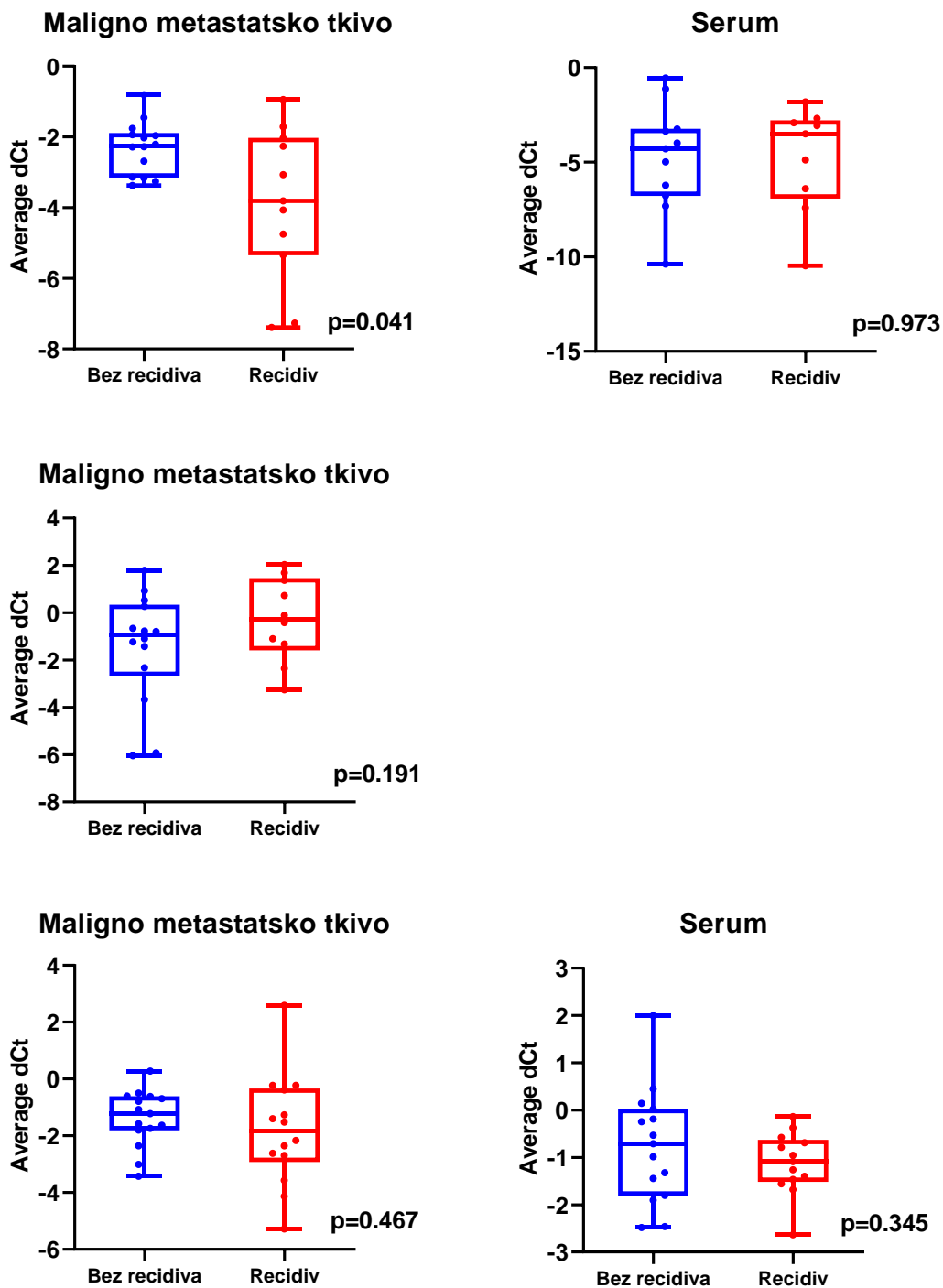
**Grafikon 41.** Ekspresija *FNI* kod bolesnika sa i bez recidiva u šestomesečnom praćenju



**Grafikon 42.** Ekspresija *VIM* kod bolesnika sa i bez recidiva u šestomesečnom praćenju

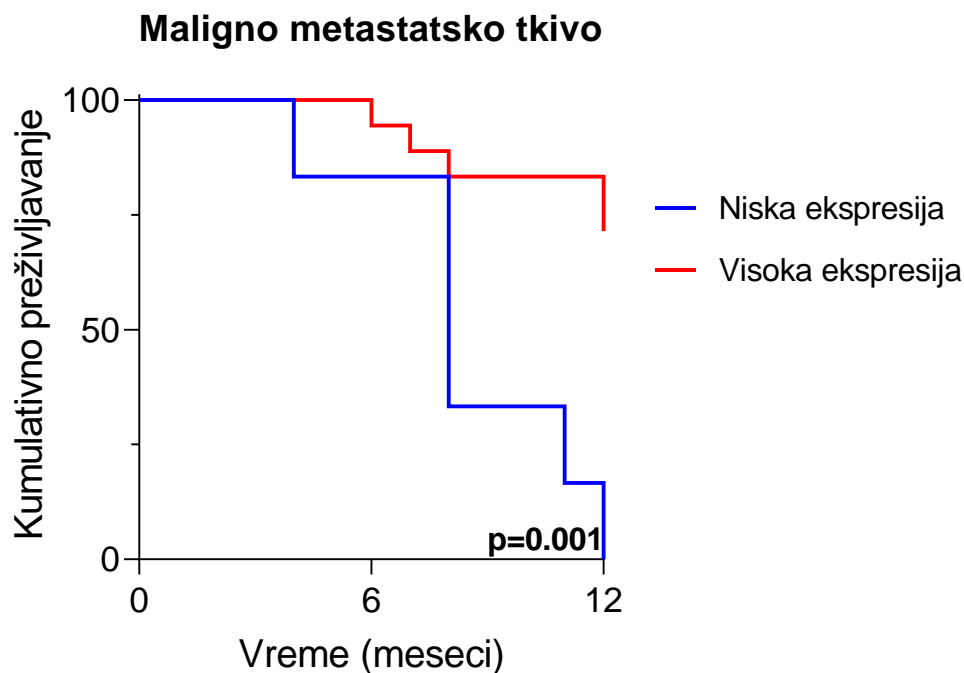
Recidiv bolesti je registrovan kod 14 (46.7) bolesnika nakon dvanaestomesečnog perioda praćenja. Medijana perioda do recidiva 14 bolesnika je bila 8 meseci (raspon, 4-12).

Prosečna ekspresija *CDH1* u malignom metastatskom tkivu je bila veća u grupi bez recidiva ( $p=0.041$ ), dok se ekspresija *CDH1* u serumu nije razlikovala u obe grupe ( $p=0.973$ ). Ekspresija *FNI* i *VIM* u malignom metastatskom tkivu kao i serumu se nije razlikovala kod bolesnika sa i bez recidiva bolesti nakon 12 meseci praćenja. Prosečne vrednosti i distribucija ekspresija u metastatskom tkivu i serumu su detaljno prikazane na grafikonu 43. Za svako poređenje je istaknut nivo značajnosti  $p$  na samom grafikonu.



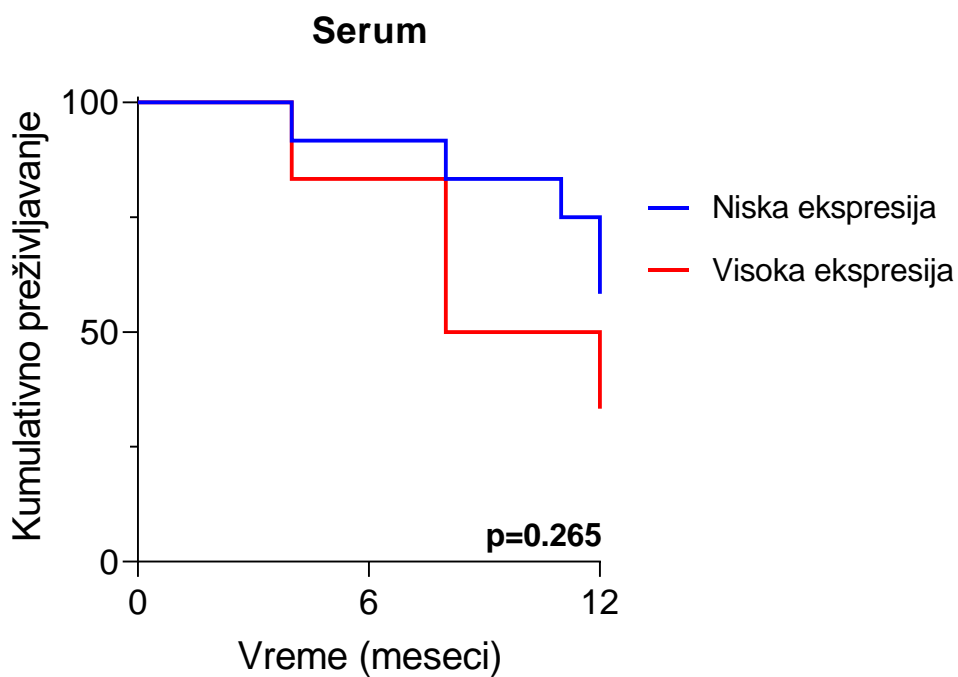
**Grafikon 43.** Ekspresija *CDHI*, *FNI* i *VIM* u malignom metastatskom tkivu i serumu kod bolesnika sa i bez recidiva bolesti nakon 12 meseci praćenja

Jednogodišnje preživljavanje bez recidiva bolesti kod bolesnika sa visokom ekspresijom *CDHI* u malignom metastatskom tkivu jetre je bilo 83%, a kod bolesnika sa niskom ekspresijom 17%. Grupa bolesnika sa visokom ekspresijom *CDHI* je imala statistički značajno duže jednogodišnje preživljavanje bez recidiva bolesti,  $p=0.001$  (grafikon 44).



**Grafikon 44.** Jednogodišnje preživljavanje bez recidiva bolesti u zavisnosti od ekspresije *CDH1* u malignom metastatskom tkivu jetre

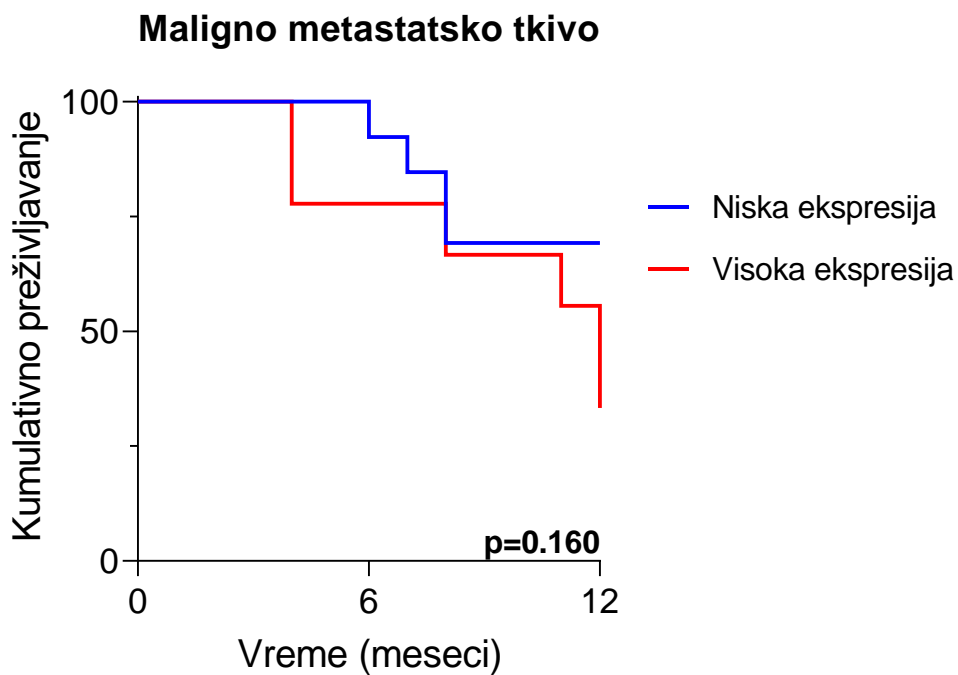
Jednogodišnje preživljavanje bez recidiva bolesti kod bolesnika sa visokom ekspresijom *CDH1* u serumu je bilo 50%, a kod bolesnika sa niskom ekspresijom 76%. Grupe bolesnika sa visokom i niskom ekspresijom *CDH1* su imale slično jednogodišnje preživljavanje bez recidiva bolesti,  $p=0.265$  (grafikon 45).



**Grafikon 45.** Jednogodišnje preživljavanje bez recidiva bolesti u zavisnosti od ekspresije *CDH1* u serumu

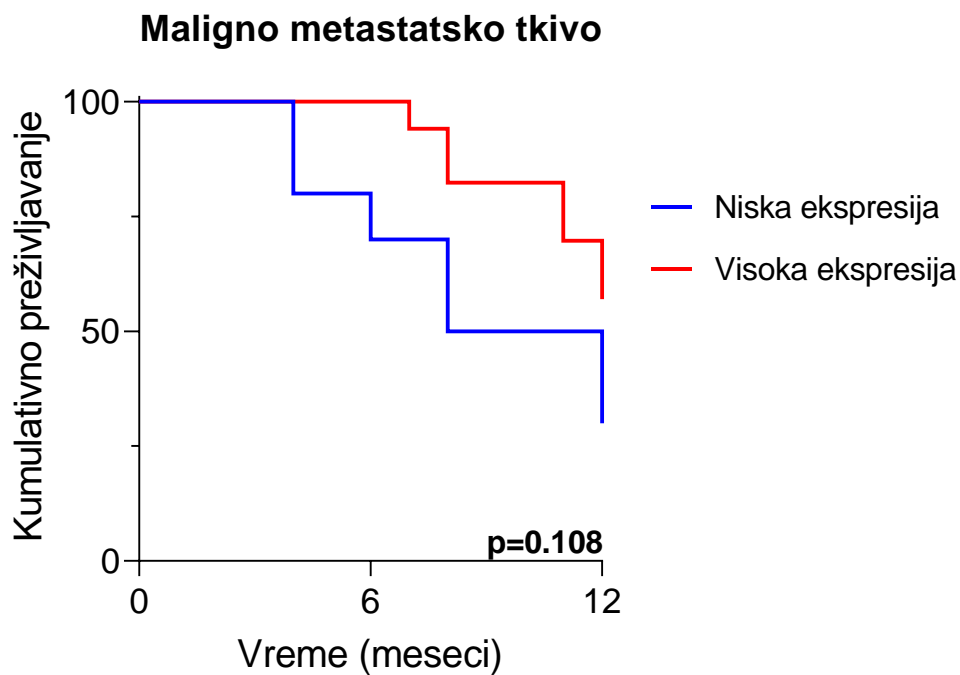
Jednogodišnje preživljavanje bez recidiva bolesti kod bolesnika sa visokom ekspresijom *FNI* u malignom metastatskom tkivu jetre je bilo 56%, a kod bolesnika sa niskom ekspresijom 68%. Nije bilo razlike u jednogodišnjem preživljavanju bez recidiva bolesti,  $p=0.160$  (grafikon 46).





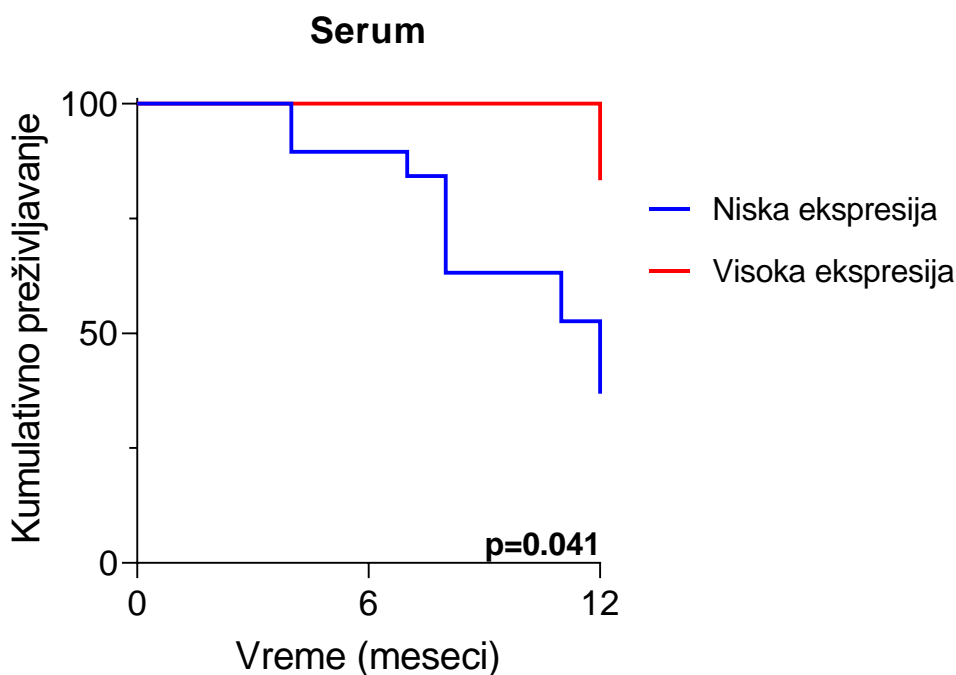
**Grafikon 46.** Jednogodišnje preživljavanje bez recidiva bolesti u zavisnosti od ekspresije *VIM* u malignom metastatskom tkivu jetre

Jednogodišnje preživljavanje bez recidiva bolesti kod bolesnika sa visokom ekspresijom *VIM* u malignom metastatskom tkivu jetre je bilo 70%, a kod bolesnika sa niskom ekspresijom 50%. Nije bilo razlike u jednogodišnjem preživljavanju bez recidiva bolesti,  $p=0.108$  (grafikon 47).



**Grafikon 47.** Jednogodišnje preživljavanje bez recidiva bolesti u zavisnosti od ekspresije *VIM* u malignom metastatskom tkivu jetre

Jednogodišnje preživljavanje bez recidiva bolesti kod bolesnika sa visokom ekspresijom *VIM* u serumu je bilo 100%, a kod bolesnika sa niskom ekspresijom 53%. Grupa bolesnika sa visokom ekspresijom *VIM* je imala značajno duže jednogodišnje preživljavanje bez recidiva bolesti,  $p=0.041$  (grafikon 48).



**Grafikon 48.** Jednogodišnje preživljavanje bez recidiva bolesti u zavisnosti od ekspresije *VIM* u serumu

Univarijantnom analizom je testiran prognostički značaj kliničkih, patoloških i genetičkih parametara za pojavu ranog recidiva bolesti godinu dana nakon resekcije jetre. Bolesnici sa kasnim T stadijumom bolesti, T3 i T4 su imali manji (za 96.3%) rizik od pojave ranog recidiva bolesti ( $p=0.020$ ). Porast vrednost *CDH1* u malignom metastatskom tkivu jetre za jednu mernu jedinicu umanjuje rizik od pojave ranog recidiva bolesti za 33.9%. (tabela 16). Pri multivarijantnoj analizi (rani i kasni T stadijum i vrednost *CDH1* u malignom metastatskom tkivu jetre), vrednost *CDH1* u malignom metastatskom tkivu jetre je nezavisni prediktor ranog recidiva bolesti: Hazard ratio 0.661, 95% interval poverenja 0.477-0.916 a  $p=0.013$ .

**Tabela 16.** Univarijantna i multivarijantna analiza potencijalnih prognostičkih faktora ranog recidiva nakon resekcije jetre zbog metastaza kolorektalnog karcinoma

	Univarijantna analiza			Multivarijantna analiza		
	HR	95% CI	<i>p</i>	HR	95% CI	<i>p</i>
Starost (> 65 godina)	1.275	0.427-3.806	0.663			
Pol	1.158	0.405-3.309	0.784			
Primarni tumor (T3 i T4)	0.037	0.002-0.592	0.020	1	1-1	1
Primarni tumor (N1 i N2)	2.393	0.535-10.69	0.253			
Metahrone metastaze	0.329	0.073-1.477	0.147			
Multiple metastaze	1.527	0.509-4.580	0.450			
Broj metastaza ( $\geq 3$ )	1.075	0.335-3.443	0.904			
Bilobarna distribucija metastaza	1.261	0.442-3.601	0.664			
Promer najveće metastaze ( $\geq 50$ mm)	0.766	0.213-2.750	0.683			
Preoperativna HT	0.854	0.295-2.469	0.771			
Postoperativna HT	0.853	0.191-3.814	0.835			
CEA	1.001	0.990-1.013	0.800			
CA 19-9	1	1-1	0.197			
Histološki gradus (G2)	1.623	0.543-4.848	0.386			
Rezidualni status (R1)	0.744	0.249-2.221	0.596			
<i>CDHI</i> u malignom metastatskom tkivu	0.661	0.477-0.916	0.013	0.661	0.477-0.916	0.013
<i>CDHI</i> u serumu	0.914	0.681-1.227	0.549			
<i>FNI</i> u malignom metastatskom tkivu	1.266	0.838-1.912	0.262			
<i>VIM</i> u malignom metastatskom tkivu	0.842	0.563-1.259	0.403			
<i>VIM</i> u serumu	0.721	0.413-1.259	0.250			

HR, Hazard ratio, CEA, karcinoembriogeni antigen; CA 19-9, karbohidrantni antigen 19-9

## 5 DISKUSIJA

Osvrtom na kliničke i patološke karakteristike primarnog karcinoma i metastaza karcinoma u jetri, može se zaključiti da analizirani uzorak karakteriše prisustvo većine onih parametara koji ukazuju na uznapredovalu malignu bolest, odnosno prisutni su negativni prognostički parametri koji nepovoljno utiču na preživljavanje bez recidiva bolesti i ukupno preživljavanje.

U studijskom uzorku većina bolesnika je imala uznapredovali T stadijum, T3 i T4, pozitivan limfonodalni status i prisutnu limfatičnu i vaskularnu invaziju. Bolesnici sa ranim T stadijumom – T1 i T2 a bez limfonodalnih i udaljenih metastaza su u stadijumu I bolesti, dok oni sa stadijumom T3 i T4 imaju stadijum II bolesti. TNM sistem gradiranja bolesti ukazuje jasno na različito preživljavanje u odnosu na stadijum bolesti.<sup>79</sup>

Većina učesnika studije je imala sinhronu prezentaciju bolesti, multiple metastaze distribuirane bilobarno u jetri. U slučaju sinhrono prezentacije metastaza, 50% bolesnika je imalo četiri i više tumora, većina je imala maksimalni promer metastaza preko 50 mm a umereni stepen diferencijacije je bio češći u odnosu na blagu diferencijaciju. Navedeni prognostički markeri su u prethodnim studijama pokazani kao negativni prediktori preživljavanja i perioda do pojave recidiva bolesti.<sup>80</sup>

Značajno prisustvo negativnih prognostičkih parametara u ispitivanom uzorku bolesnika može objasniti relativno visok procenat ranog recidiva bolesti. Naime, 14 bolesnika je razvilo klinički evidentan recidiv bolesti nakon jednogodišnjeg perioda praćenja. Troje od njih je imalo evidentan recidiv već nakon 6 meseci od resekcije jetre. Iz literature je poznato da verovatnoća pojave recidiva opada vremenom nakon operacije a da je najveća verovatnoća recidiva u prve tri godine nakon radikalnog hirurškog lečenja. U studiji Nierop-a i saradnika, prosečno vreme do recidiva bolesti je bilo 8 meseci nakon radikalne resekcije jetre.<sup>81</sup>

U prikazanoj studiji je analizirana ekspresija tri gena uključena u proces EMT-a u malignom metastatskom tkivu jetre, netumorskom tkivu jetre neposredno uz metastazu i u serumu bolesnika sa metastazama KRK u jetri.

Panel od tri gena je izabran na osnovu prethodnih naučnih izveštaja koji su pokazali klinički značaj *CDH1*, *FNI* i *VIM* kod bolesnika sa KRK. U studiji Palaghia i saradnika, analizirana je ekspresija E-kaderina u primarnom KRK, zdravoj sluznici kolona i u metastatskim limfnim nodusima.<sup>82</sup> Pokazana je veća stopa abnormalne ekspresije E-kaderina u primarnom

karcinomu i metastatskim nodusima u odnosu na normalnu sluznicu. Fibronektin jasno pokazuje povišenu ekspresiju u tkivu KRK kao i u ćelijskim linijama poreklom od karcinoma kolona, a nivo ekspresije korelira kako sa stadijumom tumora, tako i sa dugoročnom prognozom bolesnika.<sup>70</sup> Vimentin se može smatrati potencijalnim prognostičkim markerom i terapijskom metom jer je pokazano da povišena ekspresija vimentina doprinosi progresiji i lošoj prognozi bolesnika sa KRK-om.<sup>69</sup>

Prikazana analiza je ukazala na nekoliko bitnih karakteristika ekspresije *CDHI*, *FNI* i *VIM* kod bolesnika sa metastazama KRK-a. Ekspresija *CDHI* je detektovana kod 80.3, 90 i 66.6% bolesnika u malignom metastatskom tkivu jetre, netumorskom tkivu jetre neposredno uz metastazu i u serumu, respektivno. Bolesnici sa povišenom ekspresijom u malignom tkivu u odnosu na netumorsko tkivo su imali češće multiple metastaze i bilobarnu distribuciju bolesti. Ekspresija *CDHI* u serumu nije bila u korelaciji sa ekspresijom u malignom metastatskom tkivu jetre. Bolesnici sa povišenom ekspresijom *CDHI* u malignom metastatskom tkivu jetre su imali duže jednogodišnje preživljavanje bez recidiva bolesti, a nivo ekspresije *CDHI* je nezavisni prediktor jednogodišnjeg preživljavanja bez recidiva bolesti. Ekspresija *FNI* u serumu nije detektovana ni kod jednog bolesnika. Ekspresija *FNI* u malignom metastatskom tkivu jetre je manja u odnosu na ekspresiju u netumorskom tkivu jetre neposredno uz metastazu ali nije udružena sa pojavom šestomesečnog i jednogodišnjeg recidiva bolesti. Ekspresija *VIM* je detektovana u svim uzorcima kod preko 90% bolesnika i razlikuje se nivo ekspresije u malignom metastatskom tkivu i netumorskom tkivu jetre. Povišena ekspresija u serumu je povezana sa dužim jednogodišnjim preživljavanjem bez recidiva bolesti.

Za analizu ekspresije *CDHI*, *FNI* i *VIM* je primenjena qRT-PCR metoda. Većina studija iz literature je analizirala potencijalne biomarkere proteinske strukture na dva načina: primenom metode imunohistohemije za analizu tkivne ekspresije, ili primenom kompetitivne ELISA metode (*engl.* Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) za određivanje koncentracija u plazmi. Danas je pažnja naučne javnosti usmerena na ćelijske nukleinske kiseline i slobodno cirkulišuće nukleinske kiseline (*engl.* cell-free nucleic acids-cfNAs). U grupu cfNAs se ubrajaju: DNK, informaciona (*engl.* messenger) ribonukleinska kiselina (iRNK) i male (*engl.* micro) RNK (miRNK), i prisutne su u visokim koncentracijama u krvi bolesnika sa karcinomom. Metode koje se najčešće koriste za detekciju ćelijskih i cirkulišućih nukleinskih kiselina su qRT-PCR, mikroerej (*engl.* microarray) i duboko sekvencioniranje.<sup>83</sup>

Slobodne cirkulišuće nukleinske kiseline su prvi put identifikovane 1948.g. u radu Mandela i saradnika.<sup>84</sup> Chan i saradnici su predložili da se cfDNK Epštajn-Bar virusa koriste u skriningu nazofaringealnog karcinoma.<sup>85</sup> cfNAs vode poreklo od malignih ćelija koje su podvrgnute programiranoj ćelijskoj smrti - apoptozi ili nekrozi. Tkivni makrofagi fagocituju nekrotične i apoptotične maligne ćelije i nakon digestije oslobađaju cfNAa u cirkulaciju.<sup>86</sup> Tumorske ćelije koje cirkulišu u krvi kao i mikrometastatski depoziti u udaljenim organima kao što su kostna srž ili jetra takođe mogu biti izvor cfNAs. Nukleinske kiseline imaju različito vreme polu-života u krvi od 15 min do nekoliko sati. Jetra i bubrezi su organi koji imaju ulogu da uklone cfNAs iz krvi.<sup>87</sup> cfNAs mogu biti specifičnije, preciznije i informativnije od proteinskih biomarkera. Takođe, cfNAs iz periferne krvi su lako dostupne uzorkovanju i mogu poslužiti kao minimalno invazivno dijagnostičko sredstvo. Naime, uzorkovanje krvi u cilju analize cfNAs se označava kao "tečna biopsija" i može zameniti biopsiju tkiva kao invazivnu proceduru. cfNAs su prisutne i u drugim, lako dostupnim telesnim tečnostima kao što su ispljuvak i pljuvačka. Nivo cfNAs može imati značaja u ranom otkrivanju karcinoma, određivanju stadijuma bolesti, proceni prognoze bolesti, predviđanju terapijskog odgovora i u praćenju bolesnika nakon specifičnog lečenja.

Visoke koncentracije cfNAs su zabeležene kod bolesnika sa karcinomima ali se povišene vrednosti mogu naći i u drugim patološkim stanjima kao što su inflamatorne bolesti ili benigni tumori.

Male RNK su do sada dosta opsežno ispitivane kod bolesnika sa KRK. Njihov prognostički značaj je jasno potvrđen u nekoliko studija. Plazma miR-21 diferencira bolesnika sa KRK od zdrave kontrole sa senzitivnošću od 90%.<sup>88</sup> Serumski nivo miR-92a-1 je povišen kod bolesnika sa KRK i korelira sa agresivnim kliničkim karakteristikama obolelih.<sup>89</sup> U meta-analizi Gao-a i saradnika su serumska miR141 i tkivna miR21, miR181a, miR224 i miR126 pokazale prognostički značaj kod bolesnika sa KRK, a među njima serumska miR141 i tkivna miR224 su pokazane kao snažni prognostički biomarkeri.<sup>90</sup>

Za razliku od miRNK, iRNK su skromno istražene u ulozi biomarkera. Predstavljena studija je među retkim koja se bavi analizom slobodnih cirkulišućih iRNK za *CDH1*, *FNI* i *VIM* kod metastatskog KRK u jetri.

Ova studija je registrovala snižene vrednosti tkivne iRNK u malignom metastatskom tkivu jetre za *FNI* i *VIM* u odnosu na netumorsko tkivo jetre neposredno uz metastazu. Niknami i

saradnici su ispitivali značaj ekspresije *FNI* i *VIM* na proces invazije i metastaziranja kod bolesnika sa KRK.<sup>91</sup> U tkivima, ekspresija *FNI* i *VIM* značajno raste u stromalnim ćelijama dok vimentin opada u epitelnim ćelijama kolona. Dalje, izmenjena ekspresija *FNI* i *VIM* se registruje kod različitih kliničkih karakteristika. Nađena je povišena ekspresija oba gena kod starijih bolesnika a fibronektin je imao povišenu ekspresiju kod većeg stadijuma tumorske bolesti. Autori su u ovoj publikaciji analizirali tkivo primarnog karcinoma, dok analize ekspresije navedenih gena u metastatskom tkivu nisu nađene u literaturi. Obrnut odnos ekspresije gena u našoj studiji u odnosu na rezultate obrade primarnog karcinoma zahteva kompleksnu analizu i za sada se samo može pretpostaviti. Naime, Chaffer i saradnici su izneli pretpostavku da se u toku invazije udaljenog organa malignim ćelijama iz primarnog karcinoma mokraćne bešike, odigrava obrnuti proces, mezenhimalno-epitelna tranzicija u toku kojeg ćelije stiču karakteristike epitelnog fenotipa, pokazujući sniženu ekspresiju vimentina.<sup>92</sup> I drugi autori su pokazali da se izgleda dešava proces MET-a nakon invazije ciljanog organa i formiranja udaljenih metastaza.<sup>93,94</sup>

Ekspresija *CDHI* u malignom metastatskom tkivu je povišena u odnosu na netumorsko tkivo jetre ali statistički značajna razlika nije uočena. Studije koje ispituju nivo cfRNK za *CDHI* kod bolesnika sa KRK nedostaju u aktuelnoj literaturi. U pilot studiji Ionescu-a i saradnika analiziran je prognostički značaj panela gena, među kojima je i *CDHI*.<sup>95</sup> Primenjena je qRT-PCR metoda. Utvrđena je ekspresija u zdravom tkivu kolona i malignom tkivu kod bolesnika sa KRK. Dobijene vrednosti su upoređene sa kliničkim i patološkim karakteristikama i drugim biološkim faktorima. Ekspresija *CDHI* je bila slična u zdravom tkivu kolona kao i u karcinomu. Truant i saradnici su proširili analizu ekspresije *CDHI* na metastatsko tkivo u jetri.<sup>76</sup> Istovremeno je urađena analiza ekspresije u zdravom tkivu kolona i primarnom karcinomu. Primenjena je qRT-PCR analiza kao i u našoj studiji. Autori su zaključili da nema razlike u ekspresiji između tumorskog tkiva i okolne zdrave sluznice kolona. Nivo ekspresije nije u korelaciji sa TNM stadijumom tumora. Ekspresija *CDHI* u metastatskom tkivu iz jetre je bila povišena u odnosu na zdravo tkivo. Interesantno, vrednosti ekspresije u metastazi su bile u korelaciji sa stadijumom odgovarajućeg primarnog karcinoma. Povišena ekspresija u metastazama je bila udružena sa nižom verovatnoćom od pojave ekstrahepatične bolesti nakon resekcije jetre.

Izmerene granične vrednosti ekspresije gena koje značajno odstupaju od prosečnih se eventualno mogu objasniti prisustvom varijanti analiziranih gena, čije ispitivanje nije obuhvaćeno ovim istraživanjem. Profilisanjem genoma tumora u cilju razvoja precizne



medicine, nedavno su detektovane dve patogene germinativne varijante u genu *CDHI* kod bolesnika sa uznapredovalim KRK.<sup>96</sup> Smatra se da je 6% KRK izazvano nasleđivanjem retkih germinativnih mutacija u sklopu tzv. gena podložnosti uključujući gene odgovorne za FAP, HNPKRK i MYH-udružena polipoza. Deo populacije koji poseduje germinativnu varijaciju ovih gena jasno pokazuje povišen rizik od razvoja KRK, dok oboleli nosioci varijacija imaju drugačiju dugoročnu prognozu od bolesnika sa sporadičnom formom bolesti. Analizom ovih genetičkih varijanti bave se studije vezanosti nasleđivanja koje identifikuju patogene varijante unutar porodica sa većim brojem obolelih a sa ciljem utvrđivanja gena odgovornih za nasledne oblike bolesti. Mnogo zastupljeniji oblik bolesti je sporadična forma KRK. Istraživanje genetičke osnove sporadičnih KRK se sprovodi pomoću genomske studije povezanosti (*engl.* genome-wide association studies, GWAS) koje su dale izuzetan doprinos u upoznavanju humanog genotipa odgovornog za razvoj KRK od 2000-ih do sada. Analizom čitavih genoma velikog broja bolesnika i zdravih osoba, notiraju se genetičke varijante koje su česte u populaciji a imaju nisku penetrabilnost i pojedinačno ostvaruju slabi efekat. U pitanju su tačkaste genetičke varijante (*engl.* single nucleotide variants, SNVs). SNVs su takodje nedvosmisleno dokazane kao faktori udruženi sa individualnim rizikom od KRK i prognozom bolesti.<sup>97</sup> Inicijalno je utvrđeno 14 regiona (lokusa) udruženih sa rizikom od KRK i dokazana veza između SNVs genotipa i prognoze KRK.<sup>98</sup> Nedavno su identifikovane tačkaste varijante na 83 regiona udruženih sa KRK u populaciji evropskih naroda.<sup>99</sup> Studija je izdvojila jednu tačkastu varijantu (rs12597188) u genu *CDHI* kao najznačajniju (~12% bolesnika je homozigot za mali alel ove genetičke varijante). Nosioci ove varijante su imali lošiju prognozu bolesti sa prosečnim skraćenjem očekivanog trajanja života od 5 meseci kao i loš odgovor tumora na hemioterapiju. Opisana varijanta je identifikovana u promotoru gena *CDHI* i pokazano je da utiče na ekspresiju gena.

Nivo ekspresije je upoređen kod različitih grupa ispitanika koje su formirane na osnovu različitih kliničko-patoloških karakteristika bolesnika. U tom cilju, bolesnici su podeljeni u zavisnosti od odnosa ekspresije u malignom metastatskom tkivu i netumorskom tkivu jetre. Nađeno je da su bolesnici kod kojih je ekspresija u malignom tkivu veća u odnosu na netumorsko tkivo imali češće multiple metastaze i bilobarnu bolest. Oni su češće bili podvrgnuti preoperativnoj hemioterapiji. Sva tri rezultata ukazuju da je povišena ekspresija *CDHI* povezana sa većim volumenom malignog metastatskog tkiva u jetri. Indirektno se može zaključiti da je prognoza takvih bolesnika lošija.

Ova studija je analizirala nivo ekspresije *CDHI*, *FNI* i *VIM* u serumu bolesnika sa metastazama KRK. Nivo ekspresije *CDHI* i *VIM* u serumu je detektovan kod 20 (66.7%) i 28 (93.3%) bolesnika, respektivno. U ovoj studiji serumska *FNI* iRNK nije detektovana ni kod jednog bolesnika. Nemogućnost detekcije *FNI* iRNK u serumu bolesnika ne može se objasniti tehničkim razlogom u toku merenja. Naime, *GAPDH* je detektovan u tkivu i serumu kod svih bolesnika čime je potvrđen kvalitet uzorka.

Nivo ekspresije pojedinačnih RNK transkripata se može kvantifikovati qRT-PCR metodom u različitim telesnim tečnostima kao što su krv, pljuvačka ili semena tečnost, a u različitim vremenskim trenucima od momenta uzorkovanja i skladištenja. Poznato je da svaki RNK transkript pokazuje jedinstveni obrazac razgradnje tokom vremena pod zadatim fizičkim uslovima deponovanja, kao što su temperatura, vlaga i dr. Uopšteno, miRNK pokazuju viši stepen stabilnosti u toku vremena pod istim uslovima i u istim telesnim tečnostima u odnosu na iRNK, zbog svoje veličine.<sup>100</sup> Iako su pojedini autori detektovali RNK u krvi uzorkovanoj i skladištenoj pre 16 pa čak i 23 godine, studije pokazuju da je poluživot RNK u biološkim tečnostima u proseku znatno kraći.<sup>101,102</sup> Pojedine miRNK se mogu detektovati nekoliko meseci pa i godinu dana od skladištenja dok iRNK, kao nestabilniji molekuli pokazuju vreme poluraspada od nekoliko nedelja do par meseci. Monitoring ekspresije RNK u biološkom tkivu u vremenu omogućio je da se za pojedine RNK molekule utvrdi obrazac razgradnje, pa se na osnovu toga može odrediti i vrsta tkiva iz kog potiče RNK molekul, vreme od skladištenja tkiva (starost tkiva) pa čak i postmortalni interval ili mehanizam smrti u forenzici.<sup>103</sup>

Na osnovu rezultata ove studije se ne može reći da fibronektin ne postoji u serumu bolesnika sa metastazama KRK. Naprotiv, fibronektin postoji u serumu bolesnika obolelih od KRK i može biti koristan biomarker.<sup>104</sup>

Poseban akcenat u studiji je stavljen na serumske vrednosti ekspresije analiziranih gena, iako ekspresija *FNI* nije detektovana ni kod jednog bolesnika. Očekivani rezultat studije je bio da utvrdi različitu ekspresiju gena u malignom metastatskom tkivu i zdravom tkivu jetre a da nivo ekspresije u metastatskom tkivu korelira sa izmerenim vrednostima u serumu. Time bi bio potvrđen prethodno detaljno opisan značaj cfNAs u krvi i mogućnost široke primene markera kako i dijagnostici tako i u lečenju. Nažalost, analiza 30 bolesnika sa metastazama KRK u jetri nije pokazala značajnu korelaciju serumske ekspresije i nivoa ekspresije u malignom tkivu jetre za *CDHI* i *VIM*. Kako je u pitanju pilot projekat i analiza malog broja

bolesnika, istraživanja odnosa serumske i tkivne ekspresije moraju biti nastavljena u bolje dizajniranim i većim studijama kako bi se definitivno okarakterisala ta veza. Osnova za takvo uverenje su izveštaji drugih autora koji su dizajnirali slične studije ali na drugim vrstama cirkulišućih RNK kod bolesnika sa KRK. Jedna od takvih studija je analizirala serumski nivo HMGA2 iRNK kao markera KRK.<sup>105</sup> Autori su dokazali povišenu ekspresiju markera u serumu bolesnika sa KRK ali i pozitivnu korelaciju sa vrednostima markera u tkivima.

Vrednosti poznatih tumorskih markera CEA i CA 19-9 koje su određivane kod bolesnika pre resekcije jetre su pokazale značajnu međusobnu korelaciju. Ovakav odnos je shvaćen kao validacija značaja tumorskih markera u krvi bolesnika te je korelacija navedenih markera proverena sa vrednostima ekspresije ispitivanih gena u svim uzorcima tkiva i seruma. Korelacije nisu potvrđene ni u jednom slučaju.

Prezentovana studija je potvrdila prognostički značaj ekspresije *CDHI* u malignom metastatskom tkivu jetre u predikciji pojave ranog recidiva bolesti nakon resekcije jetre. Nivo ekspresije *CDHI* u malignom metastatskom tkivu jetre je nezavisni prediktor recidiva bolesti nakon godinu dana od resekcije jetre. Bolesnici sa povišenom serumskom ekspresijom *VIM* su ostvarili duže jednogodišnje preživljavanje bez recidiva bolesti ali nivo ekspresije ovog gena u serumu nije dokazan kao prediktor ranog recidiva. Za razliku od ekspresije *CDHI* u malignom metastatskom tkivu, nivo *VIM* ekspresije u serumu je pokazao relativni prognostički značaj u predikciji ranog recidiva bolesti.

Pedeset odsto bolesnika uključenih u ovu analizu je primilo preoperativnu hemioterapiju. Poredili smo nivo ekspresije ispitivanih gena u sva tri biološka materijala kod bolesnika koji nisu primili hemioterapiju pre operacije i kod bolesnika koji su pokazali različit radiološki odgovor na hemioterapiju. Utvrđeno je da ekspresija *CDHI* u malignom metastatskom tkivu se razlikuje kod prethodno navedenih grupa bolesnika. Inače, konvencionalna HT u svetu pa i kod nas podrazumeva primenu dve vrste terapijskih režima: FOLFOX i FOLFIRI, koje su kombinacija 5-Fluorouracila sa Oksaliplatinom i Irinotekanom. Na ovaj citostatski dublet se dodaju biološki agensi Bevacizumab ili Cetuksimab. Najveći deo ispitanika je primio hemioterapiju FOLFOX, Bevacizumab. Druzhkova i saradnici su ispitivali hemosenzitivnost KRK na osnovu glavnog markera EMT-a, E-kaderina.<sup>106</sup> Analiza je urađena na ćelijskim linijama HT29 i HCT116 humanog adenokarcinoma kolona i na 14 kratkoročnih kultura iz tumora pacijenata. E-kaderin pozitivne kulture su bile rezistentnije na citostatike: 5-FU, Oksaliplatin i Irinotekan. Nemački autori su ispitivali senzitivnost KRK na biološku terapiju

Cetuksimabom, koji ostvaruje efekat na nivou receptora epidermalnog faktora rasta.<sup>107</sup> Odsustvo terapijskog odgovora na Cetuksimab je bio udružen sa niskom ekspresijom E-kaderina. Autori su zaključili da je E-kaderin potencijalno novi prediktivni marker terapijskog odgovora KRK na Cetuksimab. Nalaz naše studije o različitoj *CDHI* ekspresiji u različitim kliničkim odgovorima na hemioterapiju je osnova za dalja bazična *in vitro* i *in vivo* istraživanja na polju hemosenzitivnosti KRK. Pronalazak markera hemosenzitivnosti je od krucijalnog značaja za same bolesnike jer se time terapija može prilagoditi pojedincu i izbeći mnogi neželjeni efekti hemioterapije koja nema antitumorsku aktivnost. Kvalitet života bolesnika bi bio neuporedivo bolji. Na drugoj strani, to bi značilo velike uštede za zdravstvene sisteme širom sveta.

Analizirajući biološku terapiju kao dodatak citostatskoj terapiji, najveći broj bolesnika je primio Bevacizumab. Bevacizumab je po strukturi rekombinantno monoklonsko antitelo koje inhibiše proces angiogeneze blokirajući vaskularni endotelni faktor rasta (VEFR). VEFR je molekul proteinske strukture koji stimuliše angiogenezu u mnogim bolestima među kojima je i KRK. Bevacizumab je bio prvi dostupni inhibitor angiogeneze u Sjedinjenim Američkim Državama.

Različita ekspresija *CDHI* u malignom metastatskom tkivu kod bolesnika sa i bez preoperativne HT se može tumačiti dvostruko. Prvo, bolesnici koji su primili preoperativnu HT su imali uznapredovaliju stadijum bolesti pa je izmenjena ekspresija *CDHI* posledica biološki agresivnije forme bolesti. Drugo, postoje dokazi da Bevacizumab utiče na proces EMT kroz razne mehanizme kojima moduliše ekspresiju *CDHI*. Kao što je detaljno opisano u uvodnom delu, jedan od najznačajnijih signalnih puteva je TGF $\beta$  signalni put koji posreduje u procesu EMT. Pokazano je da VEFR direktno inhibiše EMT koji je posredovan TGF $\beta$  signalnim putem kod bubrežne intersticijalne fibroze.<sup>108</sup> VEFR podstiče proces EMT kroz razne mehanizme kod karcinoma dojke i pluća čime se stimuliše proces invazije i metastaziranja što sveukupno vodi ka agresivnijoj prirodi tumora.<sup>109,110</sup> Iako je efekat VEFR i njegovih receptora jasno okarakterisan u endotelnim ćelijama, uloga VEFR u funkciji i preživljavanju tumorskih ćelija ostaje nerazjašnjena. Samuel i saradnici su 2011. dokazali ulogu VEFR u preživljavanju tumorske ćelije i modulaciji osetljivosti ćelije na hemioterapiju.<sup>111</sup> Isti autori su pokazali da gubitak ekspresije VEFR značajno umanjuje ćelijsku proliferaciju, stimuliše apoptozu i naglašava hemosenzitivnost tumorskih ćelija KRK. Važno je naglasiti da navedeni efekti nisu bili posredovani autokrinom ili parakrinom funkcijom pošto neutralizacija ekstracelularnog VEFR-a ili inhibicija kinazne aktivnosti

VEFR receptora Bevacizumabom ne utiče na preživljavanje tumorske ćelije. Ova otkrića sugeriraju da je intracelularni efekat VEFR nezavistan od interakcije VEFR-VEFR receptor. Dakle, uloga VEFR u ćelijama KRK preko novog intrakrinog mehanizma se značajno razlikuje od prethodno dokazane autokrine ili parakrine uloge VEFR u angiogenezi. Navedena intrakrina aktivnost VEFR-a je posredovana aktivnošću brojnih tirozin-kinaznih receptora. Inhibicija intrakrine funkcije VEFR signalizacije snažno redukuje migraciju i invaziju ćelija KRK.<sup>112</sup> Na osnovu pretpostavljene primarne aktivnosti Bevacizumaba na endotelne ćelije, očekivalo se da će primena terapije usmerene na VEFR značajno produžiti preživljavanje bolesnika sa KRK. Međutim, kliničke studije nisu pokazale očekivani efekat anti-VEFR terapije. Konačno, potrebno je usmeriti nova istraživanja na detaljno razotkrivanje intracelularne aktivnosti VEFR zbog snažnijeg efekta na migratornu sposobnost i invazivnost tumorske ćelije nego što je anti-angiogeno dejstvo.

Brojne studije su ispitivale prognostički značaj markera EMT kod primarnog karcinoma a nakon potencijalno kurativnog hirurškog lečenja. Qu i saradnici su imunohistohemijski analizirali nivo E-kaderina u 223 parafinska preparata resecciranog kolorektalnog karcinoma u stadijumu II i III.<sup>113</sup> Bolesnici sa sniženom ekspresijom su ostvarili kraće ukupno preživljavanje i preživljavanje bez recidiva bolesti. Takođe je E-kaderin dokazan kao nezavisni prediktor dugoročnog ishoda. Pošto su odredili ekspresiju CD44 i MSH2 na istom biološkom materijalu, autori su konstruisali prediktivni normogram koji je istovremeno eksterno validiran. Egipatski autori su analizirali ekspresiju E-kaderina kod mucinoznih i nemucinoznih formi adenokarcinoma kolorektuma.<sup>114</sup> Registrovana je povišena ekspresija kod nemucinoznih formi ali ekspresija E-kaderina nije uticala na dugoročnu prognozu bolesti.

Nekoliko autora je analiziralo povezanost ekspresije E-kaderina u metastatskom tkivu KRK u jetri i dugoročnu prognozu nakon resekcije jetre. Nakashima i saradnici su analizirali ekspresiju E-kaderina imunohistohemijskom metodom u metastatskom tkivu jetre.<sup>115</sup> Bolesnici sa očuvanom ekspresijom E-kaderina su pokazali tendenciju ka dužem preživljavanju u odnosu na bolesnike sa negativnom ekspresijom ali statistički značajne razlike nije bilo. Isti autori su nekoliko godina kasnije objavili rezultate dobijene na većem uzorku i tom prilikom objavili povezanost ekspresije E-kaderina i preživljavanja bez recidiva bolesti.<sup>116</sup> Hrvatski autori su analizirali takođe imunohistohemijsku ekspresiju E-kaderina kao markera metastatskog potencijala KRK kod 40 prethodno nelečenih bolesnika.<sup>117</sup> Imunohistohemijski indeks E-kaderina je bio visoko pozitivan u 87.5% uzoraka KRK, 67.7% limfnih nodusa i 77.5% metastaza u jetri. I pored zadovoljavajućeg nalaza, povezanost nivoa

ekspresije u KRK, limfnim nodusima i metastazama u jetri i ukupnog preživljavanja nije uočena.

Iako su brojne studije ukazale na brojne mehanizme efekta izmenjene ekspresije *CDHI* na proces tumorigeneze, invazivnosti i metastaziranja, translaciona istraživanja koja bi potvrdila klinički značaj ovih procesa nedostaju. Kao što je prethodno opisano, ogromna većina publikacija je ispitivala tkivnu proteinsku ekspresiju markera EMT u tumorskom tkivu KRK, dok studije o ekspresiji cirkulišućih i tkivnih iRNK povezanih sa procesom EMT u KRK nedostaju.

Meta-analiza Du-a i saradnika je obuhvatila 11 publikacija i 1969 slučajeva KRK.<sup>69</sup> Autori su u svom istraživanju uključili i podatke iz baze TCGA (engl. The Cancer Genome Atlas). Povišena ekspresija Vimentina je jasno udružena kako sa ukupnim preživljavanjem tako i sa preživljavanjem bez recidiva bolesti. Povišena ekspresija je takođe povezana sa većim TNM stadijumom i sa pozitivnim limfonodalnim statusom. Podaci dobijeni analizom TCGA baze su bili konzistentni sa literaturnim. Povišena ekspresija Vimentina je povezana sa kraćim ukupnim preživljavanjem bolesnika. Ovi podaci se odnose na ekspresiju Vimentina u primarnom karcinomu debelog creva. Analiza ekspresije u metastatskom tkivu jetre nedostaje. Stoga su potrebne nove i veće studije koje bi potvrdile rezultate dobijene u ovoj analizi.

Ova studija je kreirana kao pilot studija. Pozitivni prognostički značaj *CDHI* koji je utvrdila ova analiza otvara mogućnost daljeg ispitivanja ovog markera na većem broju ispitanika, uz duži period praćenja, kako bi se dobili jači medicinski dokazi o značaju ekspresije *CDHI* u dugoročnoj prognozi bolesti. U delu prezentovane analize pokazan je različiti nivo ekspresije *CDHI* u malignom metastatskom tkivu bolesnika sa drugačijim odgovorom na preoperativnu hemioterapiju. Ovakav rezultat bi mogao biti uvod u dalja istraživanja o osetljivosti karcinomskih ćelija na citostatske i biološke lekove koji su trenutno u kliničkoj praksi. U savremenoj eri, poznavanje hemosenzitivnosti je od krucijalne važnosti u sprovođenju koncepta personalizovane terapije u lečenju malignih bolesti. Dobijeni rezultati nude i perspektivu da se paleta genetičkih ispitivanja proširi u zavisnosti od novih saznanja jer se uzorkovani biološki materijali trajno čuvaju u odgovarajućim uslovima.

Cilj ove studije je bio da proceni prognostički značaj biomarkera EMT: *CDHI*, *FNI* i *VIM* za pojavu recidiva bolesti nakon kurativnog tretmana. Utvrđivanje nivoa ekspresije gena koji imaju prognostički značaj može biti deo izrade genskog profila kod svakog bolesnika u

svakodnevnoj kliničkoj praksi. Poznavanje genskog profila karcinoma omogućuje individualni pristup u lečenju. Iz toga proizilazi mogućnost personalizovane medicine koja podrazumeva primenu prilagođenog oblika lečenja pojedinca, na osnovu poznavanja njegovih jedinstvenih bioloških karakteristika. Poznavanjem bioloških karakteristika tumora a samim tim i prognoze bolesti svakog bolesnika pojedinačno, mogu se izbeći brojni neželjeni efekti one terapije koja neće doprineti lečenju pojedinca. Takav pristup značajno doprinosi boljem kvalitetu života lečenih i finansijskoj uštedi zdravstvenog sistema.

Prikazana studija ima nekoliko nedostataka. Mali uzorak je glavni nedostatak. Studija je zamišljena kao pilot projekat analize panela tri gena na manjem broju bolesnika kako bi se na osnovu inicijalnih rezultata preciznije usmerila dalja istraživanja na većem uzorku. Drugi nedostatak studije je kratak period praćenja bolesnika od godinu dana.

## 6 ZAKLJUČCI

1. Studijski uzorak odlikuje prisustvo nepovoljnih prognostičkih kliničkih i patohistoloških parametara: uznapredovali TNM stadijum primarnog karcinoma, sinhrona prezentacija metastaza u jetri, multiple metastaze promera preko 50 mm, bilobarna distribucija i nepovoljan histološki gradus metastatskog tkiva
2. Ekspresija *CDHI*, *FNI* i *VIM* je detektovana u malignom metastatskom tkivu jetre kod 80.3, 80 i 96.7% ispitanika, respektivno.
3. Ekspresija *CDHI* u serumu je detektovana kod 66.6% bolesnika a ekspresija *VIM* kod 93.3%, dok ekspresija *FNI* nije detektovana ni kod jednog bolesnika u serumu.
4. Ekspresija *FNI* i *VIM* u malignom metastatskom tkivu jetre je manja u odnosu na ekspresiju u netumorskom tkivu jetre neposredno uz metastazu, dok je ekspresija *CDHI* slična u oba biološka materijala.
5. Ekspresija *CDHI* i *VIM* u serumu ne korelira sa ekspresijom u malignom metastatskom tkivu jetre.
6. Tumorski markeri CEA i CA 19-9 su u međusobnoj pozitivnoj korelaciji ali ne koreliraju sa ekspresijom *CDHI*, *FNI* i *VIM* u malignom metastatskom tkivu, netumorskom tkivu jetre i serumu.
7. Veća ekspresija *CDHI* u malignom tkivu u odnosu na netumorsko tkivo je udružena sa prisustvom multiplih metastaza i bilobarnom distribucijom bolesti.
8. Povišena ekspresija *CDHI* u malignom metastatskom tkivu jetre je povezana sa dužim jednogodišnjim preživljavanjem bez recidiva bolesti.
9. Nivo ekspresije *CDHI* je nezavisni prediktor jednogodišnjeg preživljavanja bez recidiva bolesti.
10. Povišena ekspresija *VIM* u serumu je povezana sa dužim jednogodišnjim preživljavanjem bez recidiva bolesti.
11. Klinički i patološki parametri nemaju prognostički značaj u predikciji ranog recidiva bolesti kako pri univarijantnoj tako i pri multivarijantnoj analizi



## 7 LITERATURA

1. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. Nov 2018;68(6):394-424.
2. Cancer IAFRo. Cancer Fact Sheets. <http://gco.iarc.fr/today/fact-sheets-cancers>. Accessed 07/2020.
3. Arnold M, Sierra MS, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality. *Gut*. Apr 2017;66(4):683-91.
4. Mattiuzzi C, Sanchis-Gomar F, Lippi G. Concise update on colorectal cancer epidemiology. *Ann Transl Med*. Nov 2019;7(21):609.
5. American Cancer Society. Colorectal cancer. <https://www.cancer.org/cancer/colon-rectal-cancer>. Accessed 07/2020.
6. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*. Jun 1 1990;61(5):759-67.
7. Brosens RP, Oomen JL, Glas AS, van Bochove A, Cuesta MA, Engel AF. POSSUM predicts decreased overall survival in curative resection for colorectal cancer. *Dis Colon Rectum*. Jun 2006;49(6):825-32.
8. Siskova A, Cervena K, Kral J, Hucl T, Vodicka P, Vymetalkova V. Colorectal Adenomas-Genetics and Searching for New Molecular Screening Biomarkers. *Int J Mol Sci*. May 5 2020;21(9).
9. Sansregret L, Vanhaesebroeck B, Swanton C. Determinants and clinical implications of chromosomal instability in cancer. *Nat Rev Clin Oncol*. Mar 2018;15(3):139-50.
10. Rawla P, Sunkara T, Barsouk A. Epidemiology of colorectal cancer: incidence, mortality, survival, and risk factors. *Prz Gastroenterol*. 2019;14(2):89-103.
11. Burkitt DP. Epidemiology of cancer of the colon and rectum. *Cancer*. Jul 1971;28(1):3-13.

12. Japanese Society for Cancer of the C, Rectum. Japanese Classification of Colorectal, Appendiceal, and Anal Carcinoma: the 3d English Edition [Secondary Publication]. *J Anus Rectum Colon*. 2019;3(4):175-95.
13. Fleming M, Ravula S, Tatishchev SF, Wang HL. Colorectal carcinoma: Pathologic aspects. *J Gastrointest Oncol*. Sep 2012;3(3):153-73.
14. Tong GJ, Zhang GY, Liu J, et al. Comparison of the eighth version of the American Joint Committee on Cancer manual to the seventh version for colorectal cancer: A retrospective review of our data. *World J Clin Oncol*. Nov 10 2018;9(7):148-61.
15. Cantlie J. On a new arrangement of the right and left lobes of the liver. *J Anat*. 1897;32:4.
16. Couinaud C. [Liver lobes and segments: notes on the anatomical architecture and surgery of the liver ]. *Presse Med*. May 5 1954;62(33):709-12.
17. Strasberg SM. Nomenclature of hepatic anatomy and resections: a review of the Brisbane 2000 system. *J Hepatobiliary Pancreat Surg*. 2005;12(5):351-5.
18. Qiu M, Hu J, Yang D, Cosgrove DP, Xu R. Pattern of distant metastases in colorectal cancer: a SEER based study. *Oncotarget*. Nov 17 2015;6(36):38658-66.
19. Augestad KM, Bakaki PM, Rose J, et al. Metastatic spread pattern after curative colorectal cancer surgery. A retrospective, longitudinal analysis. *Cancer Epidemiol*. Oct 2015;39(5):734-44.
20. Landreau P, Drouillard A, Launoy G, et al. Incidence and survival in late liver metastases of colorectal cancer. *J Gastroenterol Hepatol*. Jan 2015;30(1):82-5.
21. Nagai Y, Hata K, Kawai K, et al. Clinicopathological Features of Colorectal Cancer Patients Under the Age of 50: Recent Experience and Case-Control Study of Prognosis in a Japanese Cohort. *Digestion*. 2016;93(4):272-9.
22. Hackl C, Neumann P, Gerken M, Loss M, Klinkhammer-Schalke M, Schlitt HJ. Treatment of colorectal liver metastases in Germany: a ten-year population-based analysis of 5772 cases of primary colorectal adenocarcinoma. *BMC Cancer*. Nov 4 2014;14:810.

23. Leporrier J, Maurel J, Chiche L, Bara S, Segol P, Launoy G. A population-based study of the incidence, management and prognosis of hepatic metastases from colorectal cancer. *Br J Surg*. Apr 2006;93(4):465-74.
24. Adam R, de Gramont A, Figueras J, et al. Managing synchronous liver metastases from colorectal cancer: a multidisciplinary international consensus. *Cancer Treat Rev*. Nov 2015;41(9):729-41.
25. Langley RR, Fidler IJ. The seed and soil hypothesis revisited--the role of tumor-stroma interactions in metastasis to different organs. *Int J Cancer*. Jun 1 2011;128(11):2527-35.
26. Millette S, Sicklick JK, Lowy AM, Brodt P. Molecular Pathways: Targeting the Microenvironment of Liver Metastases. *Clin Cancer Res*. Nov 1 2017;23(21):6390-9.
27. Siriwardena AK, Mason JM, Mullamitha S, Hancock HC, Jegatheeswaran S. Management of colorectal cancer presenting with synchronous liver metastases. *Nat Rev Clin Oncol*. Aug 2014;11(8):446-59.
28. Elez E, Argiles G, Tabernero J. First-Line Treatment of Metastatic Colorectal Cancer: Interpreting FIRE-3, PEAK, and CALGB/SWOG 80405. *Curr Treat Options Oncol*. Nov 2015;16(11):52.
29. Vatandoust S, Price TJ, Karapetis CS. Colorectal cancer: Metastases to a single organ. *World J Gastroenterol*. Nov 7 2015;21(41):11767-76.
30. Matias M, Casa-Nova M, Faria M, et al. Prognostic Factors after Liver Resection for Colorectal Liver Metastasis. *Acta Med Port*. May-Jun 2015;28(3):357-69.
31. Fong Y, Fortner J, Sun RL, Brennan MF, Blumgart LH. Clinical score for predicting recurrence after hepatic resection for metastatic colorectal cancer: analysis of 1001 consecutive cases. *Ann Surg*. Sep 1999;230(3):309-18; discussion 18-21.
32. Sasaki K, Morioka D, Conci S, et al. The Tumor Burden Score: A New "Metro-ticket" Prognostic Tool For Colorectal Liver Metastases Based on Tumor Size and Number of Tumors. *Ann Surg*. Jan 2018;267(1):132-41.
33. Yamashita S, Chun YS, Kopetz SE, Vauthey JN. Biomarkers in colorectal liver metastases. *Br J Surg*. May 2018;105(6):618-27.

34. Goldberg RM, Sargent DJ, Morton RF, et al. A randomized controlled trial of fluorouracil plus leucovorin, irinotecan, and oxaliplatin combinations in patients with previously untreated metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol*. Jan 1 2004;22(1):23-30.
35. Ekberg H, Tranberg KG, Andersson R, et al. Determinants of survival in liver resection for colorectal secondaries. *Br J Surg*. Sep 1986;73(9):727-31.
36. Hazhirkarzar B, Khoshpouri P, Shaghaghi M, Ghasabeh MA, Pawlik TM, Kamel IR. Current state of the art imaging approaches for colorectal liver metastasis. *Hepatobiliary Surg Nutr*. Feb 2020;9(1):35-48.
37. Chung WS, Park MS, Shin SJ, et al. Response evaluation in patients with colorectal liver metastases: RECIST version 1.1 versus modified CT criteria. *AJR Am J Roentgenol*. Oct 2012;199(4):809-15.
38. Rocha FG, Helton WS. Resectability of colorectal liver metastases: an evolving definition. *HPB (Oxford)*. May 2012;14(5):283-4.
39. Vigano L, Capussotti L, De Rosa G, De Saussure WO, Mentha G, Rubbia-Brandt L. Liver resection for colorectal metastases after chemotherapy: impact of chemotherapy-related liver injuries, pathological tumor response, and micrometastases on long-term survival. *Ann Surg*. Nov 2013;258(5):731-40; discussion 41-2.
40. Van Cutsem E, Cervantes A, Adam R, et al. ESMO consensus guidelines for the management of patients with metastatic colorectal cancer. *Ann Oncol*. Aug 2016;27(8):1386-422.
41. Lam VW, Spiro C, Laurence JM, et al. A systematic review of clinical response and survival outcomes of downsizing systemic chemotherapy and rescue liver surgery in patients with initially unresectable colorectal liver metastases. *Ann Surg Oncol*. Apr 2012;19(4):1292-301.
42. Mitry E, Fields AL, Bleiberg H, et al. Adjuvant chemotherapy after potentially curative resection of metastases from colorectal cancer: a pooled analysis of two randomized trials. *J Clin Oncol*. Oct 20 2008;26(30):4906-11.

43. Kanas GP, Taylor A, Primrose JN, et al. Survival after liver resection in metastatic colorectal cancer: review and meta-analysis of prognostic factors. *Clin Epidemiol.* 2012;4:283-301.
44. Pulitano C, Castillo F, Aldrighetti L, et al. What defines 'cure' after liver resection for colorectal metastases? Results after 10 years of follow-up. *HPB (Oxford).* May 2010;12(4):244-9.
45. Settmacher U, Dittmar Y, Knosel T, et al. Predictors of long-term survival in patients with colorectal liver metastases: a single center study and review of the literature. *Int J Colorectal Dis.* Aug 2011;26(8):967-81.
46. Wicherts DA, de Haas RJ, Salloum C, et al. Repeat hepatectomy for recurrent colorectal metastases. *Br J Surg.* May 2013;100(6):808-18.
47. Fretland AA, Dagenborg VJ, Bjornelv GMW, et al. Laparoscopic Versus Open Resection for Colorectal Liver Metastases: The OSLO-COMET Randomized Controlled Trial. *Ann Surg.* Feb 2018;267(2):199-207.
48. Zhang XL, Liu RF, Zhang D, Zhang YS, Wang T. Laparoscopic versus open liver resection for colorectal liver metastases: A systematic review and meta-analysis of studies with propensity score-based analysis. *Int J Surg.* Aug 2017;44:191-203.
49. Hadden WJ, de Reuver PR, Brown K, Mittal A, Samra JS, Hugh TJ. Resection of colorectal liver metastases and extra-hepatic disease: a systematic review and proportional meta-analysis of survival outcomes. *HPB (Oxford).* Mar 2016;18(3):209-20.
50. Bonney GK, Coldham C, Adam R, et al. Role of neoadjuvant chemotherapy in resectable synchronous colorectal liver metastasis; An international multi-center data analysis using LiverMetSurvey. *J Surg Oncol.* May 2015;111(6):716-24.
51. Mentha G, Majno PE, Andres A, Rubbia-Brandt L, Morel P, Roth AD. Neoadjuvant chemotherapy and resection of advanced synchronous liver metastases before treatment of the colorectal primary. *Br J Surg.* Jul 2006;93(7):872-8.

52. Kelly ME, Spolverato G, Le GN, et al. Synchronous colorectal liver metastasis: a network meta-analysis review comparing classical, combined, and liver-first surgical strategies. *J Surg Oncol*. Mar 2015;111(3):341-51.
53. Wicherts DA, Miller R, de Haas RJ, et al. Long-term results of two-stage hepatectomy for irresectable colorectal cancer liver metastases. *Ann Surg*. Dec 2008;248(6):994-1005.
54. Schnitzbauer AA, Lang SA, Goessmann H, et al. Right portal vein ligation combined with in situ splitting induces rapid left lateral liver lobe hypertrophy enabling 2-staged extended right hepatic resection in small-for-size settings. *Ann Surg*. Mar 2012;255(3):405-14.
55. Eshmuminov D, Raptis DA, Linecker M, Wirsching A, Lesurtel M, Clavien PA. Meta-analysis of associating liver partition with portal vein ligation and portal vein occlusion for two-stage hepatectomy. *Br J Surg*. Dec 2016;103(13):1768-82.
56. Schadde E, Raptis DA, Schnitzbauer AA, et al. Prediction of Mortality After ALPPS Stage-1: An Analysis of 320 Patients From the International ALPPS Registry. *Ann Surg*. Nov 2015;262(5):780-5; discussion 5-6.
57. Olthof PB, Huisken J, Wicherts DA, et al. Survival after associating liver partition and portal vein ligation for staged hepatectomy (ALPPS) for advanced colorectal liver metastases: A case-matched comparison with palliative systemic therapy. *Surgery*. Apr 2017;161(4):909-19.
58. Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest*. Jun 2009;119(6):1420-8.
59. Hay ED. An overview of epithelio-mesenchymal transformation. *Acta Anat (Basel)*. 1995;154(1):8-20.
60. Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer*. Jun 2002;2(6):442-54.
61. Fidler IJ, Poste G. The "seed and soil" hypothesis revisited. *Lancet Oncol*. Aug 2008;9(8):808.

62. Gonzalez DM, Medici D. Signaling mechanisms of the epithelial-mesenchymal transition. *Sci Signal*. Sep 23 2014;7(344):re8.
63. Gurzu S, Silveanu C, Fetyko A, Butiurca V, Kovacs Z, Jung I. Systematic review of the old and new concepts in the epithelial-mesenchymal transition of colorectal cancer. *World J Gastroenterol*. Aug 14 2016;22(30):6764-75.
64. Cao H, Xu E, Liu H, Wan L, Lai M. Epithelial-mesenchymal transition in colorectal cancer metastasis: A system review. *Pathol Res Pract*. Aug 2015;211(8):557-69.
65. Zeisberg M, Neilson EG. Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions. *J Clin Invest*. Jun 2009;119(6):1429-37.
66. Cavallaro U, Schaffhauser B, Christofori G. Cadherins and the tumour progression: is it all in a switch? *Cancer Lett*. Feb 25 2002;176(2):123-8.
67. Al Khatib AM, Margaritescu C, Taisescu O, Andreiana BC, Florescu MM, Ciurea RN. Immunoexpression of E-cadherin, Snail and Twist in colonic adenocarcinomas. *Rom J Morphol Embryol*. 2019;60(2):531-6.
68. Zhu S, Zhao G, Zhao X, et al. Elevated soluble E-cadherin during the epithelial-mesenchymal transition process and as a diagnostic marker in colorectal cancer. *Gene*. Jun 13 2020;754:144899.
69. Du L, Li J, Lei L, et al. High Vimentin Expression Predicts a Poor Prognosis and Progression in Colorectal Cancer: A Study with Meta-Analysis and TCGA Database. *Biomed Res Int*. 2018;2018:6387810.
70. Yi W, Xiao E, Ding R, Luo P, Yang Y. High expression of fibronectin is associated with poor prognosis, cell proliferation and malignancy via the NF-kappaB/p53-apoptosis signaling pathway in colorectal cancer. *Oncol Rep*. Dec 2016;36(6):3145-53.
71. Batlle E, Sancho E, Franci C, et al. The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells. *Nat Cell Biol*. Feb 2000;2(2):84-9.
72. Hoshino H, Miyoshi N, Nagai K, et al. Epithelial-mesenchymal transition with expression of SNAI1-induced chemoresistance in colorectal cancer. *Biochem Biophys Res Commun*. Dec 18 2009;390(3):1061-5.

73. Buck E, Eyzaguirre A, Barr S, et al. Loss of homotypic cell adhesion by epithelial-mesenchymal transition or mutation limits sensitivity to epidermal growth factor receptor inhibition. *Mol Cancer Ther.* Feb 2007;6(2):532-41.
74. Frisch SM. The epithelial cell default-phenotype hypothesis and its implications for cancer. *Bioessays.* Aug 1997;19(8):705-9.
75. Korpala M, Ell BJ, Buffa FM, et al. Direct targeting of Sec23a by miR-200s influences cancer cell secretome and promotes metastatic colonization. *Nat Med.* Aug 7 2011;17(9):1101-8.
76. Truant SC, Gouyer VP, Leteurtre EA, Zerimech F, Huet GM, Pruvot FR. E-cadherin and beta-catenin mRNA levels throughout colon cancer progression. *J Surg Res.* Dec 2008;150(2):212-8.
77. Kim JC, Roh SA, Kim HC, et al. Coexpression of carcinoembryonic antigen and E-cadherin in colorectal adenocarcinoma with liver metastasis. *J Gastrointest Surg.* Nov 2003;7(7):931-8.
78. Mani SA, Guo W, Liao MJ, et al. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell.* May 16 2008;133(4):704-15.
79. Weiser MR. AJCC 8th Edition: Colorectal Cancer. *Ann Surg Oncol.* Jun 2018;25(6):1454-5.
80. Yoshimoto T, Morine Y, Imura S, et al. Maximum Diameter and Number of Tumors as a New Prognostic Indicator of Colorectal Liver Metastases. *In Vivo.* May-Jun 2017;31(3):419-23.
81. Nierop PMH, Galjart B, Hoppener DJ, et al. Salvage treatment for recurrences after first resection of colorectal liver metastases: the impact of histopathological growth patterns. *Clin Exp Metastasis.* Apr 2019;36(2):109-18.
82. Palaghia M, Mihai C, Lozneau L, et al. E-cadherin expression in primary colorectal cancer and metastatic lymph nodes. *Rom J Morphol Embryol.* 2016;57(1):205-9.
83. Schwarzenbach H, Nishida N, Calin GA, Pantel K. Clinical relevance of circulating cell-free microRNAs in cancer. *Nat Rev Clin Oncol.* Mar 2014;11(3):145-56.



84. Mandel P, Metais P. [Not Available]. *C R Seances Soc Biol Fil.* Feb 1948;142(3-4):241-3.
85. Chan KCA, Woo JKS, King A, et al. Analysis of Plasma Epstein-Barr Virus DNA to Screen for Nasopharyngeal Cancer. *N Engl J Med.* Aug 10 2017;377(6):513-22.
86. Schwarzenbach H, Hoon DS, Pantel K. Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients. *Nat Rev Cancer.* Jun 2011;11(6):426-37.
87. Fleischhacker M, Schmidt B. Circulating nucleic acids (CNAs) and cancer--a survey. *Biochim Biophys Acta.* Jan 2007;1775(1):181-232.
88. Kanaan Z, Rai SN, Eichenberger MR, et al. Plasma miR-21: a potential diagnostic marker of colorectal cancer. *Ann Surg.* Sep 2012;256(3):544-51.
89. Shi Y, Liu Z. Serum miR-92a-1 is a novel diagnostic biomarker for colorectal cancer. *J Cell Mol Med.* Jun 20 2020.
90. Gao S, Zhao ZY, Wu R, Zhang Y, Zhang ZY. Prognostic value of microRNAs in colorectal cancer: a meta-analysis. *Cancer Manag Res.* 2018;10:907-29.
91. Niknami Z, Eslamifar A, Emamirazavi A, Ebrahimi A, Shirkoohi R. The association of vimentin and fibronectin gene expression with epithelial-mesenchymal transition and tumor malignancy in colorectal carcinoma. *EXCLI J.* 2017;16:1009-17.
92. Chaffer CL, Brennan JP, Slavin JL, Blick T, Thompson EW, Williams ED. Mesenchymal-to-epithelial transition facilitates bladder cancer metastasis: role of fibroblast growth factor receptor-2. *Cancer Res.* Dec 1 2006;66(23):11271-8.
93. Thiery JP, Acloque H, Huang RY, Nieto MA. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell.* Nov 25 2009;139(5):871-90.
94. Brabletz T, Jung A, Spaderna S, Hlubek F, Kirchner T. Opinion: migrating cancer stem cells - an integrated concept of malignant tumour progression. *Nat Rev Cancer.* Sep 2005;5(9):744-9.

95. Ionescu C, Braicu C, Chiorean R, et al. TIMP-1 expression in human colorectal cancer is associated with SMAD3 gene expression levels: a pilot study. *J Gastrointest Liver Dis.* Dec 2014;23(4):413-8.
96. You YN, Borrás E, Chang K, et al. Detection of Pathogenic Germline Variants Among Patients With Advanced Colorectal Cancer Undergoing Tumor Genomic Profiling for Precision Medicine. *Dis Colon Rectum.* Apr 2019;62(4):429-37.
97. Morris EJ, Penegar S, Whiffin N, et al. A retrospective observational study of the relationship between single nucleotide polymorphisms associated with the risk of developing colorectal cancer and survival. *PLoS One.* 2015;10(2):e0117816.
98. Smith CG, Fisher D, Harris R, et al. Analyses of 7,635 Patients with Colorectal Cancer Using Independent Training and Validation Cohorts Show That rs9929218 in CDH1 Is a Prognostic Marker of Survival. *Clin Cancer Res.* Aug 1 2015;21(15):3453-61.
99. Summers MG, Maughan TS, Kaplan R, et al. Comprehensive analysis of colorectal cancer-risk loci and survival outcome: A prognostic role for CDH1 variants. *Eur J Cancer.* Jan 2020;124:56-63.
100. Alshehhi S, Haddrill PR. Estimating time since deposition using quantification of RNA degradation in body fluid-specific markers. *Forensic Sci Int.* May 2019;298:58-63.
101. Zubakov D, Kokshoorn M, Kloosterman A, Kayser M. New markers for old stains: stable mRNA markers for blood and saliva identification from up to 16-year-old stains. *Int J Legal Med.* Jan 2009;123(1):71-4.
102. Kohlmeier F, Schneider PM. Successful mRNA profiling of 23 years old blood stains. *Forensic Sci Int Genet.* Mar 2012;6(2):274-6.
103. Weinbrecht KD FJ, Payton ME, Allen RW. Time-dependent loss of mRNA transcripts from forensic stains. *Research and Reports in Forensic Medical Science.* 2017(7):1-12.
104. Saito N, Nishimura H, Kameoka S. Clinical significance of fibronectin expression in colorectal cancer. *Mol Med Rep.* Jan-Feb 2008;1(1):77-81.

105. Sahengbieke S, Wang J, Li X, Wang Y, Lai M, Wu J. Circulating cell-free high mobility group AT-hook 2 mRNA as a detection marker in the serum of colorectal cancer patients. *J Clin Lab Anal.* May 2018;32(4):e22332.
106. Druzhkova I, Ignatova N, Prodanets N, et al. E-Cadherin in Colorectal Cancer: Relation to Chemosensitivity. *Clin Colorectal Cancer.* Mar 2019;18(1):e74-e86.
107. Geissler AL, Geissler M, Kottmann D, et al. ATM mutations and E-cadherin expression define sensitivity to EGFR-targeted therapy in colorectal cancer. *Oncotarget.* Mar 7 2017;8(10):17164-90.
108. Hong JP, Li XM, Li MX, Zheng FL. VEGF suppresses epithelial-mesenchymal transition by inhibiting the expression of Smad3 and miR192, a Smad3-dependent microRNA. *Int J Mol Med.* Jun 2013;31(6):1436-42.
109. Luo M, Hou L, Li J, et al. VEGF/NRP-1axis promotes progression of breast cancer via enhancement of epithelial-mesenchymal transition and activation of NF-kappaB and beta-catenin. *Cancer Lett.* Apr 1 2016;373(1):1-11.
110. Desai S, Laskar S, Pandey BN. Autocrine IL-8 and VEGF mediate epithelial-mesenchymal transition and invasiveness via p38/JNK-ATF-2 signalling in A549 lung cancer cells. *Cell Signal.* Sep 2013;25(9):1780-91.
111. Samuel S, Fan F, Dang LH, Xia L, Gaur P, Ellis LM. Intracrine vascular endothelial growth factor signaling in survival and chemoresistance of human colorectal cancer cells. *Oncogene.* Mar 10 2011;30(10):1205-12.
112. Bhattacharya R, Fan F, Wang R, et al. Intracrine VEGF signalling mediates colorectal cancer cell migration and invasion. *Br J Cancer.* Sep 5 2017;117(6):848-55.
113. Qu J, Jiang Y, Liu H, et al. Prognostic Value of E-cadherin-, CD44-, and MSH2-associated Nomograms in Patients With Stage II and III Colorectal Cancer. *Transl Oncol.* Apr 2017;10(2):121-31.
114. Foda AA, Mohammad MA, Abdel-Aziz A, El-Hawary AK. Relation of glypican-3 and E-cadherin expressions to clinicopathological features and prognosis of mucinous and non-mucinous colorectal adenocarcinoma. *Tumour Biol.* Jun 2015;36(6):4671-9.

- 115.** Nanashima A, Yamaguchi H, Sawai T, et al. Expression of adhesion molecules in hepatic metastases of colorectal carcinoma: relationship to primary tumours and prognosis after hepatic resection. *J Gastroenterol Hepatol.* Oct 1999;14(10):1004-9.
- 116.** Nanashima A, Yamaguchi H, Sawai T, et al. Prognostic factors in hepatic metastases of colorectal carcinoma: immunohistochemical analysis of tumor biological factors. *Dig Dis Sci.* Aug 2001;46(8):1623-8.
- 117.** Jurcic P, Radulovic P, Balja MP, Milosevic M, Kruslin B. E-cadherin and NEDD9 expression in primary colorectal cancer, metastatic lymph nodes and liver metastases. *Oncol Lett.* Mar 2019;17(3):2881-9.

## SKRAĆENICE KORIŠĆENE U TEKSTU

A.S	aritmetička sredina
AD	autozomno dominantno
ALPPS	udružena particija jetre i ligatura portne vene u hepatektomiji u dva akta
APC	adenomatozna polipoza kolona
AR	autozomno recesivno
AUC	area under the curve ( <i>engl.</i> )
CA	karbohidrantni antigen
CEA	karcinoembriogeni antigen
cfNA	slobodno cirkulišuća nukleinska kiselina
CIMP	DNK metilacija u CpG ostrvcima
CIN	hromozomska nestabilnost
CpG	5'-C-phosphate-G-3'
DNK	deoksiribonukleinska kiselina
ECM	ekstracelularni matriks
EHB	ekstrahepatična bolest
EMT	epitelno-mezenhimalna
ESMO	Evropsko udruženje onkologa
FAP	familijalna adenomatozna polipoza
GAPDH	gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza
HDA	hepatektomija u dva akta
HNPCKK	hereditarni ne-polipozni kolorektalni karcinom

iRNK	informaciona RNK
JPS	juvenilni polipoza sindrom
KRAS	Kirsten rat sarcoma
KRK	kolorektalni karcinom
KT	kompjuterizovana tomografija
MAP	MYH-udružena polipoza
MET	mezenhimalno-epitelna tranzicija
miRNK	male RNK
MMR	“mismatch” popravka
MR	magnetna rezonanca
MSI	mikrosatelitna nestabilnost
PET	pozitronska emisiona tomografija
PHTS	hamartoma tumor sindrom
PJS	Puc-Jegerov sindrom
PVE	porto-venska embolizacija
PVL	portovenska ligatura
PVO	porto-venska okluzija
RECIST	kriterijumi evaluacije odgovora solidnih tumora
RNK	ribonukleinska kiselina
ROC	receiver operating characteristic ( <i>engl.</i> )
RT-PCR	lančana reakcija polimeraze u realnom vremenu
SD	standardna devijacija

SOS	sindroma sinusoidne opstrukcije
SUV	standardizovana vrednost preuzimanja
TACE	transarterijska hemo-embolizacija
TGF- $\beta$	transformišući faktor rasta beta
18FDG	18-fluoro-deoksi-glukoza
5-FU	5-Fluorouracil

## BIOGRAFIJA AUTORA

Dr Aleksandar Bogdanović je rođen 27. jula 1981. godine u Vranju.

Osnovnu školu i gimnaziju Bora Stanković u Vranju završio je sa odličnim uspehom. Medicinski fakultet u Beogradu upisao je 2000. godine a diplomirao 2007. sa srednjom ocenom 8,80. Opšti lekarski staž obavio je u Kliničkom centru Srbije. Državni ispit položio je 2008. godine. Klinički staž je obavio na Klinici za digestivnu hirurgiju Kliničkog centra Srbije u periodu od 2010-2012. godine. Specijalizaciju iz abdominalne hirurgije započeo je 2012. a specijalistički ispit položio februara 2017. godine sa odličnom ocenom. Specijalističke akademske studije iz oblasti digestivni sistem upisao je 2012. godine na Medicinskom fakultetu u Beogradu pod mentorstvom prof. dr Miroslava Milićevića. Završni rad pod naslovom "Značaj ponovljenih resekcija jetre u hirurškom lečenju metastaza kolorektalnog karcinoma" uspešno je odbranio 2016. godine pred komisijom u sastavu: prof. dr Miroslav Milićević, prof. dr Marinko Žuvela i doc. dr Vladimir Dugalić. Doktorske akademske studije upisao je 2014. godine na Medicinskom fakultetu u Beogradu iz oblasti rekonstruktivne hirurgije. Temu doktorske disertacije pod naslovom "Prognostički značaj biomarkera epitelno-mezenhimalne tranzicije kod metastatskog kolorektalnog karcinoma u jetri" odobrilo je nastavno-naučno veće.

Izabran je u zvanje Kliničkog asistenta Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu marta 2018. godine za užu naučnu oblast Hirurgija sa anesteziologijom.

Oblasti stručnog i naučnog interesovanja kandidata dr Aleksandra Bogdanovića su benigna i maligna stanja u hirurgiji jetre, pankreasa i žučnih vodova kao i hirurška reparacija hernija trbušnog zida. Autor je i koautor deset stručnih radova u celosti objavljenih u referentnim stranim i domaćim časopisima (od toga četiri na JCR listi i dva u bazi MEDLINE). Autor je i koautor 32 stručna rada iz zbornika međunarodnog i nacionalnog skupa. Presentovao je četiri stručna rada na međunarodnim i domaćim skupovima. Recezent je u jednom međunarodnom časopisu. Održao je jedno predavanje po pozivu na međunarodnom stručnom hirurškom sastanku. Učestvovao je do sada u dve kliničke studije. Pohađao je više kurseva i seminara sa domaćim i međunarodnim učešćem u sklopu kontinuirane edukacije. U toku studijskog boravka u bolnici „Humanitas research hospital“ 2017. godine u Milanu, kod profesora Gvida Torzilija, završio je kurs Evropske škole hirurškog ultrazvuka.



Zaposlen je kao hirurg specijalista na 2. odeljenju (odeljenje za hirurgiju jetre, pankreasa i žučnih vodovana) Klinike za digestivnu hirurgiju - Prva hirurška, Kliničkog centra Srbije.

## Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Александар Богдановић

Број индекса PX-09/14

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Прогностички значај биомаркера епително-мезенхималне транзиције код метастатског колоректалног карцинома у јетри

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да дисертација у целини ни у деловима није била предложена за стицање друге дипломе према студијским програмима других високошколских установа;
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио/ла интелектуалну својину других лица.

### Потпис аутора

У Београду, 12.01.2021.г.



**Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада**

Име и презиме аутора Александар Богдановић

Број индекса PX-09/14

Студијски програм Реконструктивна хирургија

Наслов рада Прогностички значај биомаркера епително-мезенхималне транзиције код метастатског колоректалног карцинома у јетри

Ментор Академик Зоран Кривокапић

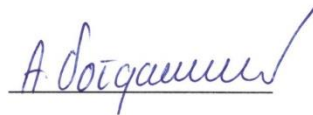
Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањивања у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

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

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

**Потпис аутора**

У Београду, 12.01.2021.г.



## Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Прогностички значај биомаркера епително-мезенхималне транзиције код метастатског колоректалног карцинома у јетри

која је моје ауторско дело.

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

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.  
Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

**Потпис аутора**

У Београду, 12.01.2021.г.

