



**УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА**

др Ивана Туфегџић

**КОРЕЛАЦИЈА ЕКСПРЕСИЈЕ CD31 И
ГЛАТКОМИШИЊНОГ АКТИНА СА МОРФОЛОШКИМ
КАРАКТЕРИСТИКАМА АДЕНОКАРЦИНОМА РЕКТУМА**

Ментор: проф.др Снежана Јанчић

Крагујевац 2015

Неизмерну захвалност дугујем свом ментору професорки др сц мед Снежани Јанчић, на огромном стрпљењу, несебичној подршци и неизмерно корисним саветима.

Захваљујем се свом колективу Института за патологију и судску медицину Војномедицинске академије, посебно лаборантима Института, чијим трудом и залагањем је остварен практични део овог рада.

Велико хвала и свим мојим пријатељима на несебичној подршци.

Највеће и најтоплије хвала дугујем својим родитељима којима посвећујем овај рад.

САЖЕТАК

1. УВОД У ПРОБЛЕМ

2. ПРЕГЛЕД ЛИТЕРАТУРЕ

2.1. АНАТОМСКЕ, ХИСТОЛОШКЕ И ФУНКЦИОНАЛНЕ КАРАКТЕРИСТИКЕ РЕКТУМА

2.1.1. Анатомске карактеристике ректума

2.1.2. Хистолошке карактеристике ректума

2.1.3. Функционалне карактеристике ректума

2.2. АДЕНОКАРЦИНОМ РЕКТУМА

2.2.1. Епидемиологија аденокарцинома

2.2.1.1. Инциденца

2.2.1.2. Морталитет

2.2.2. Етиологија аденокарцинома

2.2.3. Патогенеза аденокарцинома

2.2.4. Патологија аденокарцинома

2.2.4.1. Макроскопски изглед

2.2.4.2. Микроскопски изглед

2.2.4.2.1. Хистолошки градус

2.2.4.2.2. Строма тумора

2.2.4.3. Подтипови аденокарцинома

2.2.4.4. Раст аденокарцинома

2.2.4.5. Патолошки стадијум аденокарцинома

2.2.4.6. Прогностички параметри аденокарцинома ректума

2.2.5. Клиничка слика аденокарцинома

2.2.6. Дијагностика аденокарцинома

3. ЦИЉЕВИ

4. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОД

4.1. Испитивана популација

4.2. Методе

4.2.1. Стандардна хистопатолошка и хистохемијска обрада и анализа

4.2.2. Имунохистохемијска метода

4.2.3. Очитавање резултата ткивне експресије

4.2.4. Статистичка обрада података

5. РЕЗУЛТАТИ

5.1. Демографске и хистопатолошке карактеристике

5.2. Експресија миофибробласта (SMA)

5.2.1. Експресија миофибробласта (SMA) у односу на пол, старост, хистолошки тип, хистолошки градус и стадијум тумора

5.2.2. Експресија миофибробласта (SMA) у доносу на начин туморског раста, инвазију, метастазирање и дезмоплазију

5.3. Дезмоплазија (експресија Van Gieson -VG)

5.3.1. Експресија VG у односу на пол, старост, хистолошки тип, хистолошки градус и стадијум тумора

5.3.2. Експресија VG у доносу на начин туморског раста, инвазију, метастазирање и дезмоплазију

5.4 . Резултати мерења CD31

5.4.1 Резултати мерења ендотелијалне површине тј. „endothelial area“- (EA) васкуларних простора

5.4.2 Резултати мерења вредности броја васкуларних простора

5.4.3. Резултати мерења вредности обима васкуларних простора

5.5. Граничне вредности (*cut off*) у прогресији ректалног аденокарцинома

5.5.1. Граничне вредности (*cut off*) у односу на метастазе у лимфним чворовима

5.5.2. Граничне вредности (*cut off*) у односу на метастазе у јетри

6. ДИСКУСИЈА

6.1. Клиничко и хистопатолошке карактеристике

6.1.1. Клиничке карактеристике

6.1.2. Хистопатолошке карактеристике

6. 2. Реакција строме

6.2.1 Миофибробласти

6.2.1.1. Експресија SMA и клиничке и хистопатолошке карактеристике тумора

6.2.2. Дезмоплазија

6.2.2.1. Дезмоплазија (експресија VG) и клиничке и хистопатолошке карактеристике тумора

6.2.3. Ангиогенеза

6.2.3.1. Ангиогенеза (експресија CD31) и клиничке и хистопатолошке карактеристике тумора

6.2.4. Граничне вредности испитавних параметара за присуство метастаза у лимфне чворове и јетру

7. ЗАКЉУЧАК

8. ЛИТЕРАТУРА

1. УВОД У ПРОБЛЕМ

Аденокарцином је најчешћа малигна болест ректума и представља озбиљан медицински проблем здравствених система земаља широм света. Јавља се са скоро подједнаком учесталошћу код мушкараца и код жена и један је од водећих узрока смрти од малигнух болести, нарочито особа старије животне доби (1).

Инциденца и морталитет аденокарцинома ректума су мањи у земљама са развијенијом здравственом инфраструктуром, стога је унапређење и развој инфраструктуре здравства есенцијално у борби против ове болести (2). Фулминанти развој молекуларне биологије и метода хистопатолошке дијагностике последњих деценија, индуковао је и нове терапијске приступе у лечењу аденокарцинома ректума.

Дијагностика и лечење аденокарцинома ректума је мултидисциплинаран процес у коме поред лекара клиничара значајну улогу има и патолог (3). С'обзиром да су преканцерозне промене епитела слузнице колона видљиве ендоскопским дијагностичким методама, последњих деценија се улажу велики напори у унапређењу ендоскопских дијагностичких процедура, којима би њихово одстрањивање било ефикасно и прецизно (4).

У овој фази болести задатак патолога је да микромофолошки утврди природу уочених промена слузнице, те се у зависности од процене степена биолошке агресивности одстрањене промене приступа даљем лечењу болесника. Код већ одстрањене макроскопски видљиве туморске промене улога патолога је да након макроскопског и микроскопског прегледа начини детаљан патохистолошки извештај. Уз прецизно постављање хистолошке дијагнозе, неопходно је одредити и остале патолошкохистолошке параметре тумора који су неопходни лекарима клиничарима за процену даљег терапијског приступа, али и за процену прогнозе болести. Аденокарцином ректума је малигни тумор порекла епитела који облаже слузницу ректума, изграђен је од епителне компоненте коју чине канцерске ћелије и строме која их окружује (5, 6).

У претходним деценијама напори истраживача су пре свега били усмерени на проучавања канцерских ћелија. Научна истраживања су најпре била усмерена на проучавање морфолошких промена канцерских ћелија, изучавања промена њеног генетског материјала, као и начина испољавања измењених гена (7,8). Друга

компонента тумора, односно строма тумора је била предмет спорадичних испитивања (9).

Строма тумора се налази око епителних ћелија и морфолошки се на класичним хематоксилин-еозин бојеним препаратима туморског ткива испољава као присуство дезмоплазије, васкуларизације и инфламаторног инфилтрата. Бројне студије су показале да туморска строма има комплексан утицај на стимулацију канцерогенезе, као и да активно утиче на процесе туморске прогресије и метастазирања. Током прогресије аденокарцинома паракрини сигнали између епителних и стромалних ћелија су битни у регулацији пролиферације, инвазивности, ангиогенезе, као и регулацији метастатског потенцијала канцерских ћелија (10,11,12).

Наше истраживање је усмерено на испитивање односа епителне компоненте и строма тумора, са посебним освртом на проучавање дезмоплазије, васкуларних простора и миофибробласта строма. У аденокарциному ректума количина строма је различита и у ранијим истраживањима мерења саставних делова строма су била семикватитативна, односно градирана од оскудне, преко умерене до обилне (13, 14, 15).

Користећи хистохемијске и имунохистохемијске методе визуелизовали смо саставне делове строма, а затим смо користили научни софтверски програм за њихово мерење, чиме смо пробали да смањимо субјективност у мерењу.

Примарни задатак наше студије је да анализирамо саставне елементе строма, са циљем да допринесемо бољем схватању утицаја строма на инвазивност и метастазирање тумора и да евентуално укажемо на потенцијалне путеве проналажења нових “*target*” терапија.

2. ПРЕГЛЕД ЛИТЕРАТУРЕ

2.1. АНАТОМСКЕ, ХИСТОЛОШКЕ И ФУНКЦИОНАЛНЕ КАРАКТЕРИСТИКЕ РЕКТУМА

2.1.1 Анатомске карактеристике ректума

Ректум (*чмарно црево*) је део дебелог црева (Слика бр.1), који се налази између сигмоидног колона и ануса (*чмарног отвора*) (16).



АНАТОМИЈА ДЕБЕЛОГ ЦРЕВА

Слика бр. 1. Анатомски изглед колона

(Извор: Aka. Large Bowel Anatomy, Large Bowel, Large Intestine, 2014)

Ректум се пружа од предње површине трећег сакралног пршљена до аналног отвора, дужине је од 12 до 15 цм. Пелвичном дијафрагмом је подељен на два дела: горњи, шири, ампуларни део (*ampulla recti*) и доњи ужи, чмарни део (*canalis analis*). Ампуларни део је са предње стране покривен перитонеумом, положен је у ретроперитонеалном простору. Са задње стране ампуларног дела се налази сакрум и тртична кост, а са предње простата, семене кесице и дно мокраћне бешике код мушкараца, односно вагина доле и материца горе код жена. Анални канал је дужине 2-3 цм, бочно је у контакту са масним ткивом, док је задњом страном у односу са

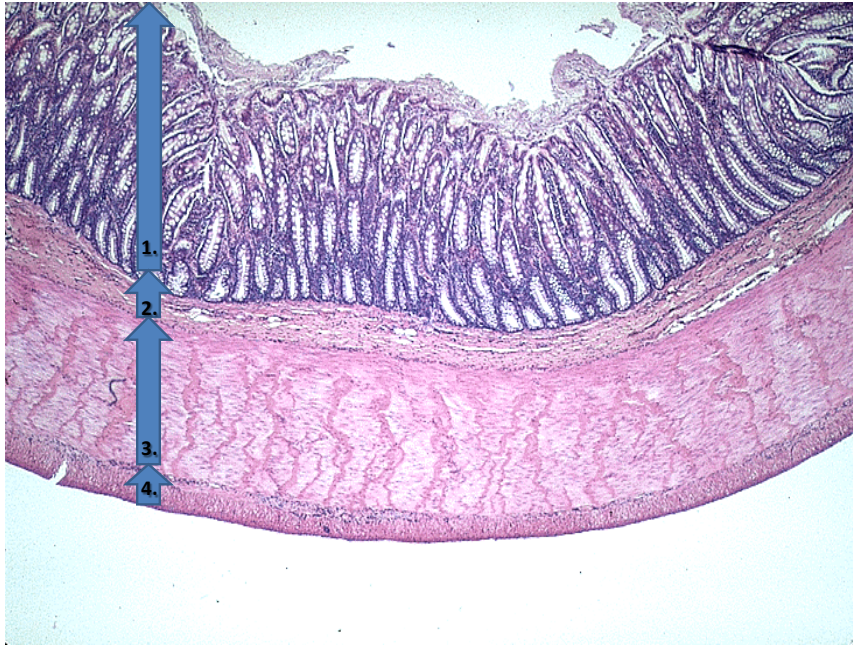
septum anococcygeum -ом који служи за припој спољашњег сфинктера (*m. sphincter ani externus*). Између ова два дела се налази перинеални завијутак који лежи између унутрашњих ивица оба мишића подизача ануса (*mm. levatores ani*). Унутрашњи изглед ректума је карактеристичан, слузница која облаже ректум гради попречне наборе (*plicae transversae*) од којих је највећа *plica transversalis recti –Kohlrauschi*, која се налази на његовом десном зиду 6-8 цм изнад чмарног отвора. Слузница доњег дела ректума ствара око 10 уздужних набора, чија се висина и ширина пут наниже повећава, између њих се налазе ректални синуси. Читава ова зона се зове *zona haemorrhoidalis*, дистално од које се налази кожа (17).

Васкуларизација: горња трећина ректума је исхрањена преко *a. mesentericae inferior*, кроз њене гране: *a. colica sinistra*, *aa. sigmoideae* и *a. rectalis superior*. Доње две трећине ректума исхрањују *a. rectalis media* и *a. rectalis inferior*, гране *a. iliacae internae*. У зиду ректума се обавља анастомоза између *v. portae* и система *v. cave inferior*. У *v. rectalis superior* се уливају вене из проксималне трећине ректума, а она је грана *v. mesenterice inferior*, која учествује у изградњи *v. portae*. Вене из дисталне две трећине ректума се уливају у *ve. haemorrhoidalis media et inferior*, притоке *v. iliaca internae*, која је део система *v. cave inferior*, стога крв из овог дела ректума заобилази јетру при првом проласку ка срцу (18).

Инервација: проксимална трећина ректума прима инервацију *plexus celiacus-a*, *plexus mesentericus inferior* и *plexus rectalis superior*, док дисталне две трећине ректума примају инервацију из *plexus pelvinus-a*. Симпатикус даје инервацију за *m. sphincter ani internus*, а парасимпатикус инервише ректум преко *n. pelvicus-a*. *M. sphincter ani externus* је инервисан преко гране *n. rectalis inferior-a*, гране *n. pudendus-a*. (19).

2.1.2 Хистолошке карактеристике ректума

Зид ректума граде четири слоја тј. тунике (Слика бр.2.) : 1. слузница- *tunica mucosa*, 2. подслузница- *tunica submucosa*, 3. мишићни омотач- *tunica muscularis* и 4. спољашњег омотача - *tunica serosa*, у проксималном делу ректума (20).



Слика бр. 2. Хистолошки изглед зида ректума (5x, увећање):

1) *tunica mucosa* 2) *tunica submucosa*, 3) *tunica muscularis* и 4) *tunica serosa*

(Gulwani H.: PathologyOutlines.com, 2013)

1. Слизница (*tunica mucosa*) осим у мањем делу дисталног ректума је грађена слично као и остали део колона и чине је три подслоја: а) *lamina epithelialis*, б) *lamina propria* и в) *lamina muscularis mucosae*

а) *lamina epithelialis* је сачињена од једног реда цилиндричних ћелија које леже на базаланој мембрани. Постоји неколико типова ћелија: најбројније су епителне ћелије које секретују мукус, пехарасте (*goblet*) ћелије, затим цилиндричне (колумнарне) апсорптивне ћелије, ретке ентероендокрине ћелије и недиферентоване ћелије. Такође, у епителу који прекрива лимфоидне фоликуле се налазе „M“ ћелије, као и ретки интраепителни лимфоцити (21,22).

Однос мукус секретујућих ћелија и апсорптивних ћелија је у ректуму већи него у осталим деловима колона. *Goblet ћелије* су светле цитоплазме на класичном хематоксилин-еозин бојеном препарату. У цитоплазми доминирају грануле које су испуњене муцином. Нуклеуси су у поређењу са нуклеусима суседних апсорптивних ћелија хиперхроматични, густог ирегуларног хроматина, базалне локализације. Гоблет ћелије секретују муцине, тј. гликопротеине при чему сулфомуцини доминирају у доњим деловима крипти, а карбоксимуцини у горњим деловима, као и површини крипата (23).

Апсорптивне ћелије карактеришу ригидни, густо паковани апикални микровили. На врховима микровила се налазе гликопротеини, који формирају филаментозни гликокаликс. Цитоплазма ових ћелија је еозинофилна, са малом апикалном везикулом која садржи мукус. Апсорптивне ћелије су више од *goblet* ћелија, тако да *goblet* ћелије само својим мањим делом врха допиру до лумена. Нуклеуси су униформни, глатких контура, овални, својом дужом осом су паралелни у односу на дужу осу ћелије, често проминентних нуклеолуса (24).

Ентероендокрине ћелије се налазе већином у криптама, ретко се налазе у ламини проприји, имају мале базално оријентисане, еозинофилне грануле, док је нуклеус за разлику од осталих ћелија окренут према лумену. То су ретке ћелије чинећи свега 1% од укупног броја ћелија које облажу базалну мембрану и луче преко тридесет врста хормона (25).

Недиферентоване ћелије се називају и „*stem*“ ћелије, налазе се у бази крипата, то су мултипотентне ћелије које могу под дејством разних стимулуса да се диферентују у различите врсте епителних ћелија (26).

Базална мембрана је флексибилни танки слој екстрацелуларног матрикса који се налази испод епитела. Базална мембрана је есенцијална у стабиловању кохезије између епителних ћелија и има улогу селективне баријере, метаболичку улогу, као и улогу у диференцијацији, миграцији и регенерацији ћелија. По својој структури базалну мембрану чине колаген типа IV, протеоглици и фибронектин, као и колаген типа III. Ови делови базалне мембране варирају по својој структури, продукују епителне и мезенхимне ћелије (27).

б) *lamina propria* се налази испод базалне мембране и сачињена је од растреситог везивног ткива и васкуларних простора, капилара, ендотелијалних венула и лимфатичних простора који се налазе непосредно испод *lamina muscularis mucosae*. Физиолошким околностима ретки су лимфоцити и плазмаци, као и ретке накупине лимфоцита, обично базалне локализације (20, 28, 29).

в) *lamina muscularis mucosae* је сачињена од танког слоја глаткомишићних влакана.

Површина слузнице је равна, са бројним отворима крипти- *Lieberkühn krippte*, које гради епител који лежи на базалној мембрани окружен ламином пропријом, при чему базе крипти допиру до *laminae muscularis mucosae*. Крипте су паралелног тока, окомито постављене у односу на ламину мускуларис, у ректуму су нешто ниже висине у односу

на остале делове колона. Такође, у дисталним деловима ректума крипте се скраћују и проређују. Мукус који секретују *goblet* ћелије излази кроз отворе крипата и облеже површину слузнице (30).

Непосредно испод базалне мембране се налазе миофибробласти, ћелије које деле фенотипске карактеристике фибробласта и глаткомишићних ћелија, описане први пут 1971 године од стране *Gabbiani* и сарадника (31). Ове ћелије су вретенастог или звездастог облика, бледе еозинофилне и проминентне цитоплазме, ултраструктурно имају изражен ендоплазматски ретикулум, Голџи апарат у којем се продукују колаген секретујуће грануле, а такође имају миофиламенте (32). Миофибробласти се могу наћи у у бројним другим стањима, као што је гранулационо ткиво које настаје приликом зарастања рана, бројним нетуморским процесима када се ствара фиброзно ткиво, али се миофибробласти налазе и у строми тумора (33,34,35).

2. Подслузнички слој (*tunica submucosa*) је сачињена од растреситог везивног ткива са доста лимфатичких и артеријских крвних судова. У субмукози се налази *Meisnerov plexus*, а у туники мускуларис *Auerbachov plexus*, сачињени од ганглија и плексуса ентеричког нервног система, чији се наставци шире кроз субмукозу и ламину проприју, као и тунику мукозу, чинећи део аутономног нервног система. (36).

3. Мишићни омотач (*tunica muscularis*) је сачињена од унутрашњег, ширег, кружног (*stratum circulare*) и спољашњег, тањег уздужног слоја (*stratum longitudinale*). Кружни слој се изнад чмарног канала задебљава и формира унутрашњи сфинктер (*m. sphincter ani internus*) инервисан од стране симпатикуса. Споља од овог мишића се налази спољни сфинктер чмара (*m. sphincter ani externus*) који се састоји од попречно пругастих мишићних влакана и који је инервисан од стране *n. pudendus*, у сталној је тоничној контракцији и опушта се под дејством воље. Трећи сфинктер је *m. sphincter ani tertius*, представљају *mm. levatores ani*, који могу у случају оштећења донекле заменити претходна два сфинктера. Између мишићних ћелија се налазе *Cajalov-e, pacemaker* ћелије, одговорне за модулацију перисталтике зида. Мишићница је перфорирана васкуларним просторима који се пружају пут фиброадипозног ткива које се налази око ректума (37).

4. Спољашњи омотач (*tunica serosa*) припада перитонеуму и облаже само предњи део ректума и бочних страна ампуларног дела. Тамо где нема серозе ректум је покривен везивом који га веже за околинину (*paraproctium*).

2.1.3. Функционалне карактеристике ректума

У нормалним условима у колон у току једног дана долази око 1000 до 1500 мл течног садржаја из илеума. Захваљујући апсорптивној функцији десног колона у ректум доспева око 100 до 150 мл формираног цревног садржаја који потом бива евакуисан дефекацијом, три пута дневно до три пута недељно. Ректум има функцију резервоара за столицу у току припреме за њену евакуацију, при чему се пасивно прилагођава повећању запремине. Максимални волумен ректума код здравих особа је око 400 мл. (38).

У току пуњења садржајем долази до истезања зида ректума и повећања интралуминалног притиска, при чему се јавља осећај пуноће и нагона за дефекацијом. Ректум нема рецепторе на истезање, већ су они смештени у мишићима пода мале карлице, мишићима подизачима ануса, пуборекталном мишићу и аналним сфинктерима (39).

Поред осећаја испуњености ови рецептори омогућавају разликовање гасова од течне и чврсте столице, али тачни механизми разликовања нису познати. Ако дефекација изостане, после иницијалног пораста притиска, долази до пада на базалну вредност, при чему се ректум брзо прилагођава новој запремини. Уколико постоји патолошки процес у зиду ректума, било које повећање запремине може довести до значајног пораста интралуминалног притиска и појаве ургенције, а у случају изражених промена и до праве фекалне инконтиненције (40, 41).

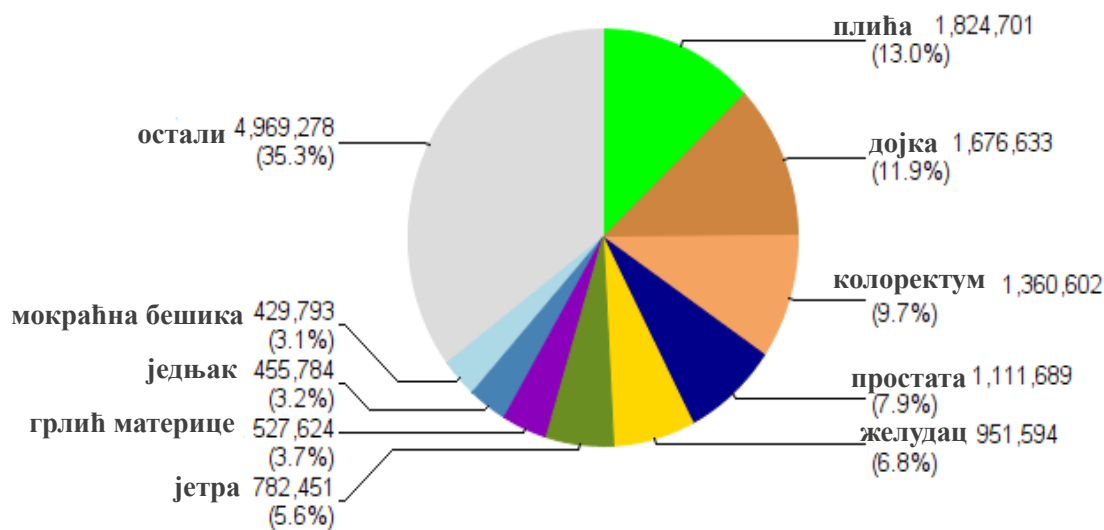
2.2. АДЕНОКАРЦИНОМ РЕКТУМА

2.2.1. Епидемиологија аденокарцинома ректума

2.2.1.1. Инциденца

Аденокарцином ректума је један од најчешћих малигних тумора данашњице, чија инциденца и морталитет варирају у различитим земљама света (2), трећи је по учесталости од свих карцинома који се јављају код мушкараца, односно други по учесталости од свих карцинома који се јављају код жена (1). Поређењем са осталим малигним туморима, аденокарцином ректума чини преко 9% свих дијагностикованих карцинома (Графикон бр.1.).

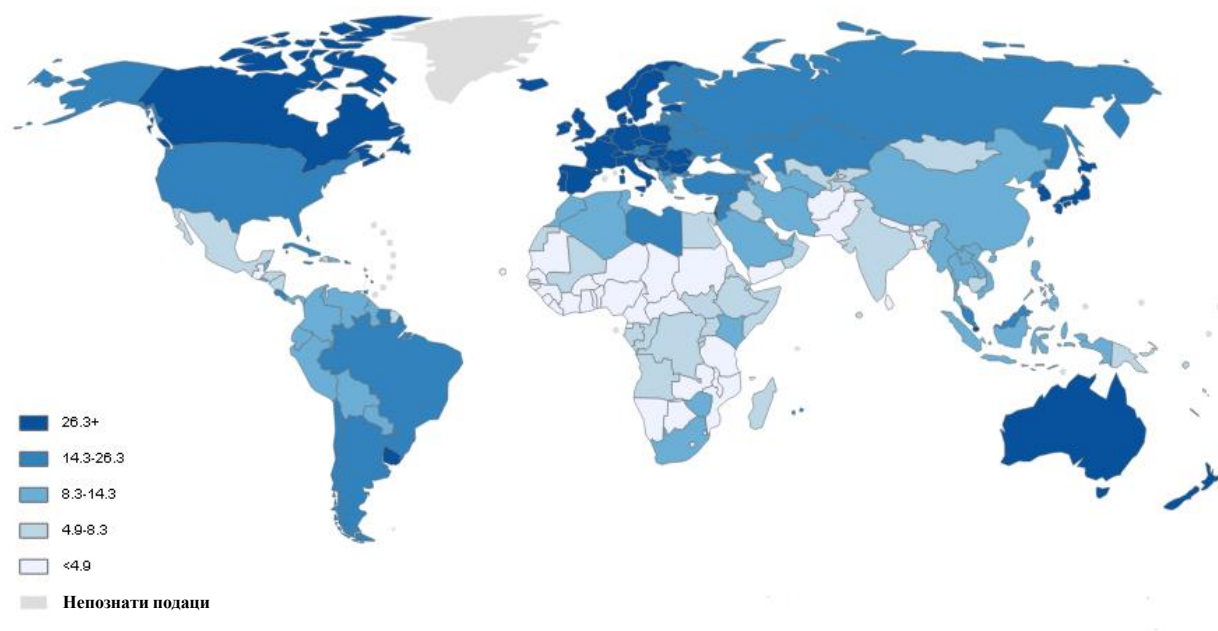
Укупан број случајева у свету:14090,149-оба пола , све узрасне групе



Графикон бр.1.Инциденца аденокарцинома ректума у свету у односу на друге туморе

(Извор : GLOBOCAN 2012) (IARC, 2014)

Инциденца колоректалног аденокарцинома варира како међу континентима, тако и међу земљама света (Слика бр.3).



Инциденца колоректалног аденокарцинома, оба пола

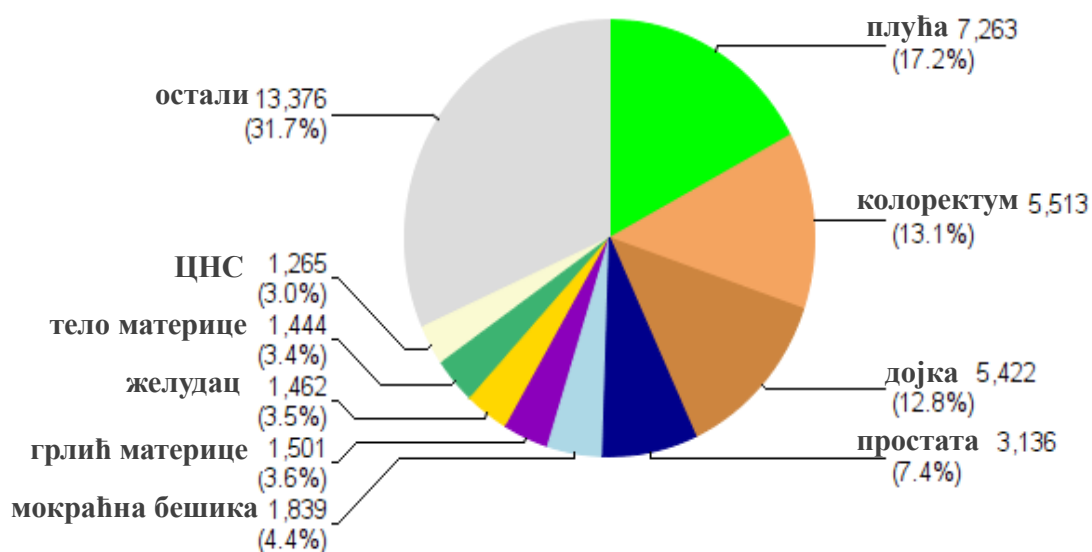
Слика бр.3. Инциденца аденокарцинома колоректума у свету по континентима
(Извор : GLOBOCAN 2012) (IARC, 2014)

Највећа инциденца је у Аустралији, Новом Зеланду, Европи и Северној Америци, а најмања је у Африци и Јужној и централној Азији (2). Географске разлике инциденце тумора се јављају услед различите изложености утицајима средине, као и навикама у исхрани, а на терену различите генетске предиспозиције. У неким земљама, као што су Сједињене Америчке државе показано је да се инциденца смањила за 2% у последњих 15 година (42).

У већини осталих земаља инциденца је остала непромењена или је у лакој порасту, док је у неким државама присутан нагли пораст инциденце, иако су претходно имале малу инциденцу аденокарцинома ректума. У ове земље спадају: Шпанија, земље источне Азије и источне Европе (43).

У Србији код оба пола, стопа инциденце аденокарцинома колоректума је у корелацији са годинама старости и највиша је код мушкараца преко 70 година, односно код жена старости преко 75 година (Графикон бр.2.) Такође, уочава се пораст броја оболелих код особа млађих од 40 година (44). Од 1999- 2009 године стопа морталитета од ове болести је била 11,9% (45).

Укупан број случајева у Србији: 42,221 оба пола, све узрасне групе



Графикон бр.2. Инциденца аденокарцинома ректума у Србији у односу на друге туморе
(Извор : GLOBOCAN 2012) (IARC, 2014)

2.2.1.2. Морталитет

Подаци о стопи смртности од аденокарцинома ректума у Сједињеним Америчким Државама, као и у многим другим западним земљама упућују на прогресивно смањење морталитета које се уочава од средине осамдесетих година прошлог века (46).

Сматра се да је овакво побољшање пре свега последица унапређења метода детекције промена у ректуму и њиховог одстрањивања. Овај податак се пре свега односи на рано одстрањивање бенигнух тумора епителног порекла, односно одстрањивање полипа из ректума, као и на унапређење метода детекције појаве малигне болести у њеном раном стадијуму (47). Такође, последњих неколико деценија се интензивно радило на проналажењу нових модалитета ефикасније адјувантне хемиотерапије (48). У светским размерама највећу стопу преживљавања имају Сједињене Америчке Државе, у овој земљи 67% пацијената лечених од аденокарцинома ректума има 5-годишње преживљавање (49).

Супротно овим подацима, у земљама са слабије развијеном здравственом инфраструктуром, као што су земље источне Европе, централне и јужне Америке, стопа смртности од ове болести се повећава (46).

У Србији стопа смртности од аденокарцинома ректума је на другом месту по стопи смртности од малигнух болести, иза карцинома плућа у мушкој, односно иза карцинома дојке у женској популацији, што нашу земљу сврстава у земље са високим морталитетом ове болести (44).

2.2.2. Етиологија аденокарцинома ректума

Већина аденокарцинома ректума су спорадични у 70-80% случајева, следе фамилијарни у 20-30% и наследни аденокарциноми у преосталим ретким случајевима (50).

Старост је међу најважнијим факторима ризика за појаву ове болести. Ретко се јављају пре четрдесете године живота, док је запажено да инциденца значајно расте између четрдесете и педесете године и са сваком следећом деценијом је све већа (2).

Фактори ризика за настајање аденокарцинома ректума су класификовани у две групе: непромењиве факторе ризика и промењиве, односно факторе ризика подложне превенцији (Табела бр.1).

Фактори ризика за настанак аденокарцинома ректума	
Непроменљиви фактори ризика	Промењиви, односно фактори ризика подложни превенцији
Узраст	Исхрана
Позитивна лична анамнеза	Прекомерна телесна тежина
Инфламаторне болести црева	Физичка активност
Наследни синдроми: -Линч синдром -фамилијарна аденоматозна полипоза	Конзумирање алкохола
	Конзумација цигарета

Табела бр.1. Фактори ризика за настанак аденокарцинома ректума

Непроменљиви фактори ризика

У непроменљиве факторе ризика се убрајају: узраст, позитивна лична анамнеза на присуство полипа и малигну болест ректума, позитивна лична анамнеза на инфламаторна обољења ректума и наследни синдроми.

1. *Узраст*: инциденца и морталитет карцинома ректума се повећавају са старашћу испитаника, у 90% нових случајева, односно 94% смртних случајева се јавља у особа старијих преко 50 година, док је инциденца за појаву колоректалног карцинома 15 пута већа код особа преко 50 година, него код особа старости између 20 до 49 година (51, 52). У нашој земљи, као и у неким другим земљама, уочава се пораст броја оболелих код особа млађих од 40 година (44).

2. *Позитивна лична анамнеза*: позитивна лична анамнеза на присуство полипа ректума представља фактор ризика, јер је доказано да су неопластични полипи прекурсорске лезије у настанку аденокарцинома. Око 95% спорадичних аденокарцинома настане од претходно постојећег бенигног епителног тумора аденома при чему процес малигне алтерације аденома у аденокарцином може трајати од око 5 до 10 година, по неким истраживањима и око 15 година. Стога, детекција ових

бенингних тумора и њихово одстрањивање значајно смањују ризик од настанка аденокарцинома (49, 53, 54, 55). Позитивна лична анамнеза на присуство аденокарцинома колоректума код блиских сродника представља такође фактор ризика. Испитивања су показала да око 20% болесника који имају аденокарцином колоректума има блиске сроднике који такође болују од ове болести (56, 57).

3. *Инфламаторне болести црева*: ранија истраживања су показала да болесници који болују од хроничне идиопатске болести црева (улцерозног колитиса и/или Кронове болести) имају повећан ризик за развој аденокарцинома (58). Новија истраживања су показала да се ризик од настанка аденокарцинома код пацијената који болују од хроничне идиопатске болести црева смањило услед примене нових терапијских модалитета ове болести. Само болесници којима је дијагностикован улцерозни колитис у детињству и болесници са присутним примарним склерозирајућим холангитисом уз дијагностикован улцерозни колитис имају повећан ризик за настанак аденокарцинома (59).

4. *Наследни синдроми*: око 2- 5% пацијената са колоректалним карциномом имају генетски синдром који чини основу ове болести (60). Два кључна наследна синдрома која су у вези са аденокарциномом ректума су: Линчов синдром или наследни неполипозни колоректални канцер (ННКК) и фамилијарна аденоматозна полипоза (ФАП). Остали синдроми код којих постоји већа учесталост настанка ове болести су *Peutz-Jeghersov* синдром, *Cowdenov*--а болест и јувенилни полипозни синдром.

Линчов синдром или наследни неполипозни колоректални канцер (ННКК) је најчешћи, први га је описао *Lynch* и чини основу 2-4% свих колоректалних аденокарцинома (61). Код Линчовог синдрома је присутан мутиран ген који учествује у систему поправке нестабилности дезоксирибонуклеинске киселине (*DNA*), *mismatch repair (MMR)* гена: *MLH1 (mutL homolog1)*, *MSH2 (mutS homolog 2)* и *MSH6 (mutS homolog 6)* (62). Код људи код којих је идентификована мутација ових гена постоји од 70 до 80% повећан ризик за настанак аденокарцинома колоректума и то раније него код спорадичног аденокарцинома (пре 40 године живота) (63). Такође, код Линчовог синдрома постоји повећан ризик за настанак и других екстраколоничних малигних тумора као што су: карцином ендометријума, карцином желуца, карцином танког црева, карцином панкреаса и карцином бубрега (63).

Фамилијарна аденоматозна полипоза (ФАП) је аутозомно доминантни аденоматозни полипозни синдром који је одговоран за појаву мање од 1% свих

колоректалних карцинома (64). Настаје наслеђивањем мутираног *APC (adenomatous polyposis coli)* гена који је 1991 године мапиран на дугом краку хромозома 5 у позицији 5q21 (65). Класичан облик се манифестује појавом више од сто полипа, који се јављају у другој деценији живота, најчешће око 15 године. Полипи се могу се наћи у свим деловима колона, као и ректума, са великим потенцијалом да један или више малигно алтеришу (66). Болест се наслеђује аутозомно доминантно, тако да 70 до 80% болесника има једног болесног родитеља, што упућује на могућност пренаталне дијагностике, као и евентуалне преимплантационе генетске дијагнозе овог синдрома (67).

Промењиви, односно фактори ризика подложни превенцији

Факторима ризика који су подложни превенцији припадају исхрана, прекомерна телесна тежина или гојазност, физичка неактивност, конзумирање алкохола и цигарета.

1. *Исхрана*: проучавања географских разлика у инциденци аденокарцинома ректума староседелаца, као и разлика у инциденци настанка тумора код имиграната су сугерисале да начин исхране значајно утиче на појаву овог тумора. Показано је да промене у начину исхране смањују ризик за настанак тумора и до 70 % (68).

Бројни су елементи исхране који се доводе у везу са појавом тумора, а највише студија указују да смањење уношења црвеног меса и месних прерађевина, као и повећано уношење поврћа, воћа и непрерађених житарица, уз уношење довољних количина калцијума делују протективно (57, 69, 70). Истраживања су показала да уношење великих количина црвеног меса које је дужи временски период било обрађено под високим температурама повећава ризик од настанка тумора (71). Приликом оваквог начина спремања меса, долази до ослобађања хетероцикличних амина и полицикличних ароматичних хидрокарбоната, за које је доказано да имају канцерогена својства (72,73). За разлику од предходних, скорија истраживања нису показала значајнију везу између уношења повећаних количина поврћа, воћа и непрерађених житарица и мањег ризика од настанка аденокарцинома ректума (57, 71). Ипак, неке студије су показале да људи који једу јако мало поврћа и воћа имају повећан ризик од настанка овог тумора (64). Сматра се такође да узимање млека и калцијума највероватније смањује ризик од настанка аденокарцинома ректума (57, 71, 74).

2. *Прекомерна телесна тежина или гојазност* се сматра фактором ризика у настанку аденокарцинома ректума, чешће код мушкараца него код жена (69). Показано

је да неки биолошки фактори, као што су повећана количина естрогена код гојазних људи могу имати протективно дејство у настанку овог тумора (75)

3. *Физичка активност* је један од фактора за кога се најчешће сугерише да делује протективно у настанку колоректалног аденокарцинома (76). Нека истраживања су указала да висок ниво физичке активности смањује до 50% ризик од настанка карцинома и код мушкараца и код жена, чак и умерена физичка активност, као што су брзо ходање или пак пењање степеницама смањују ризик од настанка ове болести (71, 77). Указано је на многе биолошке механизме на основу којих физичка активност позитивно делује на организам, неке од њих су: позитиван утицај на ефикасност метаболизма услед смањења крвног притиска, као и позитиван утицај на повећање мотилитета црева (57, 78). Са друге стране смањена физичка активност утиче на гојазност која спада у факторе ризика за настанак ове болести (79).

4. *Конзумирање алкохола*: уочена је повезаност конзумације чак и умерених количина алкохола са појавом карцинома ректума, узимање од 2 до 4 алкохолних пића дневно доводи до око 23% већег ризика за настанак аденокарцинома колоне (80). Појава тумора је чешћа у млађем животном добу код ове групе испитаника, него код оне који не конзумирају алкохол (81). Доказана је и интеракција конзумирања алкохола и дувана и настанка аденокарцинома ректума (82). Дуван може индуковати мутације дезоксирибонуклеинске киселине које се са мањом ефикасношћу исправљају у присуству алкохола, док алкохол може допринети бољој пенетрацији других карциногена у ћелије слузнице. Истраживања су показала да су метаболити алкохола као што је ацеталдехид канцерогени. Такође, ефекти утицаја алкохола се могу односити на повећани ризик за настанак бенигних тумора епителног порекла-аденома који су препознати као прекурсорске лезије аденокарцинома (83).

5. *Конзумација цигарета*: постоје бројна истраживања која су доказала повезаност пушења и појаве карцинома плућа, али је доказано да око 12 % смртних случајева од аденокарцинома колоректума је у вези са пушењем (81). Доказана је повезаност пушења са развојем аденома (84), као и повезаност канцерогена из дувана са настанком аденокарцинома ректума, са нешто учесталијим појављивањем код жена (85, 86).

2.2.3. Патогенеза аденокарцинома

Ранија истраживања су показала да је већина аденокарцинома настала из претходно постојећег аденома (87). Микроскопирањем хистолошких препарата ткива аденокарцинома ректума у око 10% до 30% анализираних тумора се могу наћи фокуси резидуалног аденома (88). Да би из аденома настао аденокарцином потребно је и до око 15 година (55), стога ендоскопско одстрањивање уочених полипа приликом ректоскопије смањује инциденцу за настанак аденокарцинома (55).

Многе студије су показале да аберантни фокус у криптама представља прелаз између нормалног епитела и аденома (88). Аберантни криптални фокус је микроскопска лезија, која представља локализовану колекцију крипата које су већег дијаметра него уобичајене крипте и које су обложене већим бројем епителних ћелија. Ове епителне ћелије могу бити уобичајеног изгледа, односно уобичајене величине и мукусне секреције, без знакова атипичности ћелије или могу бити са знацима хиперплазије или лаке дисплазије. Аберантни фокус се може видети и ендоскопски, што омогућава његово уклањање (89).

Такође је доказано да мали аденокарциноми, макроскопског дијаметра мањег од 1 цм, не морају имати ткиво резидуалног аденома, што је довело до закључка да карцином може настати и де ново (90). Обзиром да овако мали аденокарциноми чине мање од 5% свих тумора, неке студије су покушале да докажу да су ови аденокарциноми већег степена хистолошког градуса него они настали из аденома и да имају повећан ризик за инвазију у лимфатичке и венске васкуларне просторе (90). Друге студије ипак не подржавају ову хипотезу, у њима је доказано да мали аденокарциноми без диспластичне компоненте имају исте генетске карактеристике, као и мали или већи аденокарциноми који имају фокусе диспластичног епитела (91).

2.2.4. Патологија аденокарцинома

Аденокарцином је малигни тумор порекла епителних ћелија, најчешћа је малигна болест ректума и чини 98% случајева свих малигних болести овог дела колона (92).

Јавља се неупоредиво чешће него друге малигне болести које чине лимфоми (1,3%), неуроендокрини тумори (1,4%), најређе саркоми (0,3%) (93).

2.2.4.1. Макроскопски изглед

Око 40% случајева свих аденокарцинома колона су локализовани у његовом дисталном делу, односно ректуму (94).

Током свог раста аденокарцином може имати неколико макроскопских морфолошких облика: полиподини, егзофитични, улцерозни, стенозирајући и дифузно инфилтративни (Табела бр.2.) (95). Нема доказа да је макроскопски изглед патолошки прогностички параметар исхода болести аденокарцинома ректума (96).

Макроскопски морфолошки облици аденокарцинома
полиподини
егзофитични
улцерозни
стенозирајући
дифузно инфилтративни

Табела бр.2.Макроскопски морфолошки облици аденокарцинома

Макроскопски полиподини тип аденокарцинома формира интралуминалну егзофитичну туморску масу различите величине. Површина полипоидног типа је нодуларног, лобуларног или папиларног изгледа, често са фокусима улцерације и некрозе. Микроскопским прегледом овог типа тумора осим присуства аденокарцинома, често се налазе фокуси резидуалног аденома. Око једне трећине тумори су макроскопски егзофитичног изгледа, углавном папиларне површине са присутном улцерацијом, док су ивице оваког типа тумора “подривеног “ изгледа. Егзофитични тип тумора ретко проузрокује опстуркцију, централни део је обично чвршће конзистенције него периферни. У централном делу микроскопским прегледом се

налази ткиво аденокарцинома, док се у ивичним мекшим деловима често налази ткиво резидуалног аденома. Обично је интралуминална компонента тумора већа него она која захвата зид тумора (87, 92) .

Стенозирајући аденокарциноми, расту читавом циркумференцијом зида ректума и сужавају лумен, стога је могуће да дође до дилатације проксималних делова ректума. На пресеку су обично чвршће конзистенције због присуства обилне дезмоплазије. Аденокарциноми улцерозног макроскопског изгледа, чине две трећине аденокарцинома ректума. Често су некротичног дна и обично врше инвазију у дубље слојеве зида ректума, као и периректално масно ткиво. Аденокарциноми ректума који дају макроскопску слику дифузног инфилтративног раста су најређи инвадирају део зида ректума без формирања нодуларне туморске масе. На пресеку у зони инфилтративног тумора зид је задебљао и чвршће конзистенције (95).

На пресеку аденокарцином је најчешће беличасте или ружичасте боје, док конзистенција може бити различита, и креће се од изразито чврстих, склерозних тумора, преко тумора жилавије конзистенције до тумора мекше конзистенције. У око 10% постоји “мукоидни”, стакласт изглед тумора на пресеку, који је се јавља као последица секреције мукуса од стране канцерских ћелија. У туморском ткиву на пресеку се могу наћи и огњишта некрозе, свежег или старог крварења, као и зоне формирања апсцеса. Ретко се могу наћи два или више тумора или полипа у околини постојећег аденокарцинома (94).

2.2.4.2. Микроскопски изглед

Аденокарцином колона је сачињен од епителне компоненте тумора и околне строме. Епителна компонента је најчешће тубуларног изгледа и налази се у око 83 % карцинома колона (97). Други ређи подтипови су: муцинозни аденокарцином (колоидни подтип), *signet ring* карцином, аденосквामозни и сквामозни карцином, медуларни карцином, неуроендокрини карцином и недиферентовани карцином (98). (Табела бр. 3.).

Хистололошки типови аденокарцинома ректума
Аденокарцином
Муцинозни аденокарцином
Signet ring карцином
Медуларни карцином
Аденосквამозни карцином
Сквამозни карцином
Неуроендокрини карцином
Недиферентовани карцином

Табела бр. 3. Хистолошки подтипови аденокарцинома

Микроскопским прегледом аденокарцинома туморско ткиво је сачињено од умножених, ирегуларних, добро до слабо формираних glandуларних формација, различите величине лумена, које су обложене високим, атипичним, туморским ћелијама, различитог митотског индекса. Добро диферетновани тумори често имају интрагlandуларне папиларне формације, обложене епителним ћелијама без изражених знакова анаплазије, дајући изглед врло сличан изгледу који имају бенигни тумори епителног порекла- аденоми (99). У овим случајевима је тешко поставити дијагнозу малигног тумора, тек на основу присуства инвазивних glandуларних формација у зиду ректума патолог се може изјаснити о присуству инвазивне малигне болести. Без обзира на степен диференцијације, приликом инвазије у субмукозу или дубље слојеве долази до индукције снажне дезмопластичне реакције. Тумори који немају изражену дезмопластичну строму могу представљати велики дијагностички проблем, у смислу процене присуства, као и нивоа степена инвазије тумора (14).

Обично нема разлике између хистолошког изгледа површних делова тумора, делова тумора који врше инвазију зида колона или пак метастазе. У неким случајевима дубљи слојеви тумора, односно делови тумора који су инвадирани у мускуларис проприју или периректално масно ткиво могу бити тубуларног изгледа, док туморско

ткиво нађено у метастазама у лимфним нодусима или јетри имају и мукус секретујућу компоненту. Често егзофитични тумори имају хистолошки папиларну туморску архитектонику, обложену малигним ћелијама, док је инфилтративна интрамурална компонента гландуларног изгледа. На ивицама нарочито малих тумора, често се може наћи ткиво резидуалног аденома и такви тумори су обично добро диферентовани (95).

Аденокарциноми који врше инвазију зида ректума могу се по начину раста поделити на: туморе са експанзивним и туморе са инфилтративним начином раста. Експанзивни начин раста обично имају полипоидни или егзофитични тумори. Туморско ткиво гради нодуларне агрегате, који су релативно јасно ограничени према околном здравом ткиву и са израженом околном инфламаторном реакцијом. Инфилтративни начин раста имају преостали тумори, најчешће су то улцерозни или дифузно инфилтративни тумори. Туморско ткиво гради мале жлезде или је сачињено од трака или појединачних туморских ћелија, које врше инвазију околног здравог ткива, имају оштру, нејасну границу према околном ткиву и без израженог околног инфламаторног одговора (100).

2.2.4.2.1. Хистолошки градус

Хистолошки градус аденокарцинома је један од патолошких прогностичких фактора (96). Одређивање хистолошког градуса се врши брижљивим и темељним микроскопирањем више пресека ткива аденокарцинома на класичном хематоксилин-еозин (ХЕ) препарату уз детаљно анализирање епителне компоненте тумора. Постоје два система градирања: четворостепени и двостепени.

Четворостепени систем градирања аденокарцинома дели туморе у четири групе:

- добро диферентовани (HG 1)
- умерено диференетовани (HG 2)
- слабо диферентовани (HG 3)
- недиферентовни (HG 4)

Ако се у преко 95% тумора налазе добро формиране канцерске жлездане формације тумор је добро диферентован тумор HG 1, ако је тај проценат 50%-90% тумор се сврстава у умерено диферентоване HG 2 туморе, и ако је мањи од 50% слабо

диферентован аденокарцином HG 3. Ако нема жлезданих формација, то су HG 4 су недиферентовни карциноми (98).

Двостепени систем градирања аденокарцинома дели туморе у две групе:

- *low grade*, где спадају тумори добре и умерен диферентовности (HG 1 и HG 2)
- *high grade* где спадају слабо диферентовани и недиферентовани карциноми (HG 3 и HG 4).

Овом поделом у *low grade* аденокарциноме спадају тумори који имају преко 50% ткива са формираним жлезданим формацијама, док у *high grade* аденокарциноме спадају тумори који имају мање од 50% glandularних формација (96, 101).

Ткиво добро диферентованог аденокарцинома је сачињено од добро формираних жлезданих формација, обложеним атипичним епителним ћелијама које су сачувале свој поларитет. Ове жлезде веома личе на жлезде аденома. Слабо диферетновани тумор је сачињен од већином солидних плажа, које чине ћелије које су изгубиле свој нуклеарни поларитет и имају изражен нуклеарни полиморфизам. Умерено диферентовани тумори се налазе између ове две категорије. У неким туморима се могу наћи више различитих зона диференцијације тумора, у том случају градирање се одређује на основу зоне најмање диференцијације. Такође, у неким туморима се могу наћи циновске, анапластичне или сигнет ринг ћелије. Ретко се могу видети недиферентовани карциноми сачињени од трака малигних ћелија, обилне цитоплазме, али са минималном секрецијом муцина, тада је потребно применити додатне специјалне хистохемијске и имунохистохемијске анализе за доказивање епителног порекла ових тумора. По дефиницији *signet ring* карцином, ситноћелијски неуроендокрини карцином и недиферентовани карцином су слабо диферентовани тумори (87, 92, 95 96). По неким подацима најчешћи су умерено диферентовани аденокарциноми у око 79%, слабо диферентовани у око 16% и најређи добро диферентовани у око 3% испитаних тумора (97).

2.2.4.2.2. Строма тумора

Ранија истраживања аденокарцинома ректума су била фокусирана на проучавања епителне компоненте тумора, док је стромална компонента аденокарцинома била предмет ретких истраживања, све док *Jass* и сарадници нису уочили значај присуства

перитуморских лимфоцита на прогресију тумора (102). Морфолошки знаци промена околне строме су: појава различите количине дезмоплазије, ангиогенезе и инфламаторног инфилтата (103).

Количина строме у тумору варира, од тумора који имају врло оскудну строму, затим тумора са умереном количином строме, до оних тумора који имају строму скирозних карактеристика, при чему је степен ангиогенезе различит (11). Сматра се да је за стварање дезмоплазије у строми одговорна активација фибробласта као и миофибробласта који продукују компоненте екстрацелуларног матрикса (32).

У строми се може наћи различита количина инфламаторног инфилтата који се по критеријума *Jass* -а може градирати од оскудног до обилног (102). Инфламаторни инфилтрат је сачињен од различитих ћелија: лимфоцита, плазмочита, еозинофила, макрофага, мастоцита, као и дендритичких ћелија. Запажен је карактеристичан тип реакције- *Crohn like* реакција, која се карактерише присуством лимфоидних агрегата, често проминентних герминативних центара, обично локализованих на периферији инвазивних тумора према околном масном ткиву. Показано је да степен ове реакције корелира са преживљањем пацијената (104).

Ангиогенеза је веома рани феномен аденокарциному колона и есенцијална је за метастатски потенцијал тумора (105) при чему долази до пролиферације васкуларних простора различитих обима, обично већих него нормалних који су често изувјаног изгледа, који су груписани и повезани интеранастомозирајућим судовима. Васкуларни простори су са луминалне стране обложени ендотелним ћелијама, чији је однос према базалној мембрани и перицитма поремећен што доводи до повећане пропустљивости зида (106).

2.2.4.3. Подтипови аденокарцинома ректума :

1. *Муцинозни подтип аденокарцинома*: налази се у око 10 % свих аденокарцинома ректума. Макроскопски су мекше конзистенције, имају оскудније изражену дезмопластичну реакцију, што има даје тзв. колоидни изглед. На пресеку овог подтипа тумора често постоје малих муцинозни нодулуси. Микроскопским прегледом муцинозни аденокарцинома је богат екстрацелуларним мукусом, у којем се у различитом степену налазе жлездане структуре које су обложене малигним

епителним ћелијама. Често се могу и наћи ћелије по типу *signet ring* у којима је муцин локализован интрацелуларно. Ако се у класичном типу аденокарцинома нађе муцинозна компонента у неколико микроскопских поља али мање од 50%, тада аденокарцином дијагностикује као аденокарцином са муцинозном диференцијацијом. Ако је муцинозна компонента доминантна, односно заступљена у преко 50% тумора, тад се тумор класификује као аденокарцином муцинозни подтип (107). Муцинозни материјал чине мешовити муцини, кисели и неутрални, са преодминантном киселом компонентом (108).

Опречна су мишљења о биолошком понашању овог тумора. По неким истраживачима у односу на конвенционални аденокарцином муцинозни аденокарцином, као и аденокарцином који има муцинозну компоненту имају исту прогнозу (109). Постоје и супротна мишљења да су болесници са муцинозним аденокарциномом ректума имају лошију прогнозу (110), као и да су дијагностиковани у каснијем стадијуму болести (111). Муцинозни аденокарцином се чешће јавља код млађих пацијената, који болују од ННКК (112).

2. *Signet ring подтип*: врло је редак, јавља се у 0,5 до 1% свих тумора. Макроскопски у око 20% овај подтип има изглед тзв. *linitis plastica*: зид ректума захваћен тумором је беличаст, задебљао и чвршће конзистенције. Микроскопским прегледом код овог подтипа доминирају ћелије по типу *signet ring*, односно ако се налазе у преко 50% тумора онда се тумор сврстава у *adenocarcinoma signet ring* подтип (113). Хистолошки изглед ових ћелија је карактеристичан: имају обилну цитоплазму, богату муцинима, као и хиперхроматично једро, које је мукусом потиснуто на периферију ћелије, то су *signet ring* ћелије, односно ћелије по типу “печатног прстена” (95, 113) *Signet ring* аденокарциноми имају агресивнији биолошки потенцијал, као и лошију прогнозу него конвенционални аденокарцином (111, 114).

3. *Аденосквामозни карциноми*: изузетно су ретки, присутни у до око 0.025-0,1% случајева. Макроскопски се не могу разликовати од класичног аденокарцинома, док су микроскопски изграђени од жлезданих формација аденокарцинома и сквामозне компоненте које чине малигне сквामозне ћелије различитог степена диференцијације и орожавања (115). То су веома агресивни тумори у поређењу са класичним типом аденокарцинома, који врло рано дају удаљене метастазе. У чак 50% болесници приликом откривања овог подтипа имају удаљене метастазе (116).

4. *Сквамозни карцином*: изузетно ретки, први пут га је у ректуму описао *Raiford* 1933 године (117). Микроскопски туморско ткиво је изграђено од плажа сквамозних ћелија различитог степена орожавања и диференцијације и не разликује се од сквамозних карцинома друге локализације. Да би се дијагностиковао овај подтип тумора, неопходно је доказати да не постоји метастазариње из других органа, проктоскопским прегледом искључити присуство проксималног ширења сквамоцелуларног карцинома ануса у ректум, као и присуство фистулзног канала ректума и суседних органа, на чијем зиду се налази ткиво сквамоцелуларног карцинома (118).

5. *Медуларни карцином*: овај подтип карцинома ректума је релативно скоро препознат и описан од стране *Jessurun*—а, при чему је иницијално класификован као недиферентовани карцином (119). Врло је редак, описује се 5-8 случајева на 1000 аденокарцинома (120). Туморско ткиво је сачињено од полигоналних ћелија везикуларног нуклеуса, проминентних нуклеолуса и обилне цитоплазме, као и са присутном обилном инфилтрацијом лимфоцита. Туморске ћелије граде органоидне или пак трабекуларне формације, на периферији са експанзивним растом и обилном инфилтрацијом лимфоцитима (113).

6. *Недиферентовани карцином*: редак подтип тумора, у којем постоји епителна диференцијација туморских ћелија, али без евидентне гландуларне архитектонике. Неки аутори прихватају присуство гландуларних формација у до 5 % тумора. Обично су већи и мекше конзистенције услед њихове велике целуларности и релативно оскудне дезмоплазије, често и са опсежним пољима некрозе. Туморске ћелије граде солидне плаже, трабекуле и често су инфилтративног начина раста. Код неких тумора ћелије су малог полиморфизма, док код других постоји изражен полиморфизам нуклеуса. Често се у класичним аденокарциномима могу наћи зоне недиферентованог тумора, у том случају тумор се класификује као аденокарцином и градира на основу најчесталијег степена диференције (95, 98, 107).

7. *Неуроендокрини карциноми*: постоје Ретко се јављају у ректуму као примарни тумори, чине 20% неуроендокриних тумора локализованих у дигестивном тубусу. Обично су мали, пречника до 1цм, локализовани и асимптоматски тумори. Хистолошки изглед класичног добро диферентованог неуроендокриног тумора је карактеристичан. Туморско ткиво је сачињено од трабекула, инсуларних и тракстих формација, које граде ћелије са минималним целуларним плеоморфизмом, ниског

митотског индекса. За потврду неуроендокрине диференцијације је неопходно применити специјална имунохистохемијска бојења од којих су нека: chromogranin, synaptophysin, neuron specific enolase и CD56. (5, 121,122).

2.2.4.4. Раст тумора

Аденокарцином ректума расте интралуминално, односно према лумену ректума, вршећи при том опструкцију лумена ректума, потом расте и интрамурално у зид црева, пробијајући у дубље слојеве зида или дуж места куда пенетрирају васкуларни простори инфилтришући у околно масно ткиво или околне органе мале карлице. Тумор врши инвазију у лимфатике, вене, перинеуралне просторе, расте перитонеалним ширењем или пак рецидивним растом на постојећим хируршким шавовима или анастомозама након претходних операција. Туморско ткиво се шири лонгитуидинално проксимално и дистално од места настанка тумора, што је битан податак због одређивања места ресекционе маргине од стране хирурга. Сматра се да је линија ресекције на 2 цм испод тумора са становишта онколошких принципа безбедна, док су нека истраживања показала да удаљеност дисталне маргине мање од 1 цм не утиче на онколошки исход болести (123, 124).

Директна инвазија тумора у околне органе је најчешћа у мокраћну бешику и простату код мушкараца, односно материцу код жена. Овакви болесници обично имају генитоуринарне симптоме. Хистолошки је понекад тешко разликовати примарни аденокарцином мокраћне бешике, односно ендометријума, у односу на аденокарцином ректума, а некад на основу класичног хистолошког препарата и немогуће. Тек применом специјалних хистохемијских и имунохистохемијских анализа се може доказати или искључити порекло из колона (125,126).

Аденокарциноми колона често метастазирају у регионалне лимфне чворове при чему је проценат тумора са метастатским потенцијалом већи код тумора са већим хистолошким градусом и већим стадијумом. Кад ткиво аденокарцинома пробије ламину мускуларис мукозе може инвадирати у лимфатике субмукозе, а први лимфни чвор који буде захваћен тумором је обично нодус који је најближе локализован тумору. Метастазе се обично шире од једног ка другом лимфном нодусу, пратећи лимфну дренажу. Карциноми ректума могу метастазирати у мезентеричне, али и у ингвиналне

лимфне нодусе. По неким подацима код карциома ректума, у 2% случајева се налазе метастазе у ингвиналним лимфним нодусима, обично је присутна унилатерална метастаза, али у једне трећине болесника и билатерална (94, 87).

Хистолошке карактеристике тумора у лимфном нодусу могу бити различите. Некада су то само мали фокуси ткива аденокарцинома, док је некад читав нодус испуњен тумором, без виталног ткива, па је тешко разликовати да ли се ради о метастази аденокарцинома у лимфном нодусу или је то екстратуморални депозит ткива аденокарцинома. У таквим случајевима, неопходно је посматрати контуре таквог чвора, ако су глатке, такав депозит се може сматрати лимфним нодусом који је измењен у потпуности ткивом аденокарцинома. У нодусу се некада може наћи само мукус, без целуларне компоненте, нарочито код муцинозног подтипа, што може изузетно отежати дијагностиковање метастазе у лимфном нодусу. Тада је неопходно брижљивим микроскопирањем тражити остатке жлезданих формација тумора, група или појединачних малигних ћелија ради потврђивања дијагнозе (95, 98).

Инвазија васкуларних простора чешћа је код тумора са већим хистолошким градусом, код тумора који су метастазирали у лимфне нодусе, као и код тумора који су метастазирали у јетру (95, 127). Обзиром да дистални ректум има дуалну венску дренажу, тумори овог дела ректума могу дати изоловане метастазе у плућима (128), док преко вертебралног венског плексуса могу метастазирати у кости (129)

Перинеурално и интринеурално ширење тумора се чешће јавља на делу ректума који није обавијен перитонеумом, код тумора који су већег хистолошког градуса, као и код тумора код којих је присутна лимфатичака и венска инвазија (130, 131). Сматра се да аденокарциноми могу вршити инфилтрацију дуж неуралних простора у различитој удаљености од примарног тумора, али и да перинеурална инвазија може бити пут метастазирања тумора (132).

Туморски депозити су фокални агрегати аденокарцинома локализовани на периректалној масти на различитој удаљености од примарног тумора и њихово присуство је у корелацији са лошијом прогнозом и краћим временом преживљавања (133). Порекло туморских депозита је хетерогено, показано је да су настали венском, лимфатичком или перинеуралном инвазијом канцерских ћелија примарног аденокарцинома (134,135).

Удаљене метастазе аденокарцинома ректума су најчешће у јетри. Туморско ткиво се шири хематогеним путем и код око 60% болесника метастазе у јетри се јављају у

току прогресије болести (92, 95). На другом месту по учестолости, у до око 19% болесника су присутне метастазе у плућима (128), док се у до око 5% болесника налазе метастазе у мозгу (136). Метастазе у оваријум нису ретке и то хематогеним или перитонеалним ширењем (137), може се наћи унилатерални, цистични или солидни тумор (138). Ређе се налазе метастазе у костима (129), слезини (139), панкреасу (140), надбубрегу (141), тестису (142), кожи (143), скелетним мишићима (144) и у срцу (145).

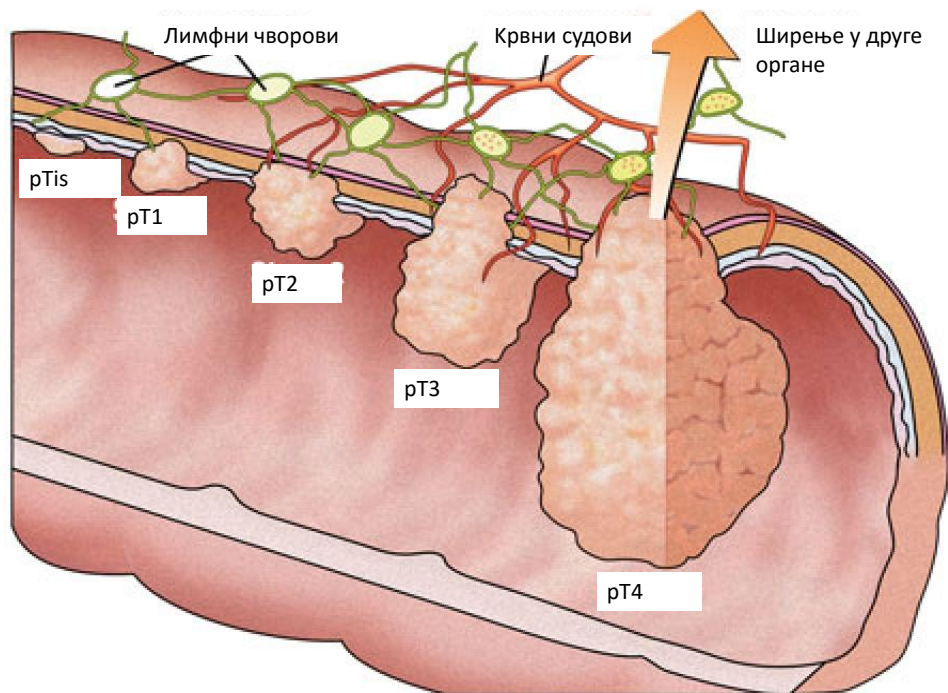
2.2.4.5. Патолошки стадијум тумора

Одређивање патолошког стадијума аденокарцинома ректума је изузетно битно јер је патолошки стадијум један од најбитнијих елемената који одређују терапијски приступ болести, као и исход болести. Протеклих деценија предложени су разни системи за одређивање стадијума тумора и сви су као основни параметар имали дубину инвазије тумора, уз присуство, односно одсуство метастаза у лимфне чворове, као и удаљених метастаза. Године 1932 *Dukes* је предложио познати класификациони систем, који је редефинисао систем предложен од стране *Lockhart u Mummery* из 1926 године (146). По том систему у стадијуму А се налазе аденокарциноми који инфилтришу у субмукозу и мускуларис проприју, у стадијуму Б аденокарциноми који инфилтришу кроз мускуларис проприју у околно ткиво, али без метастаза у околне лимфне нодусе. У стадијуму Ц се налазе тумори који имају метастазе у лимфним нодусима и стадијум Д обухвата туморе који инфилтришу у било који слој зида ректума, али имају удаљене метастазе.

Модификација *Astler and Collier* -а из 1954 године је Б стадијум поделила на Б1 ако инфилтрише у мускуларис проприју и Б2 ако пробија мускуларис проприју, а Ц стадијум на Ц1 ако инфилтрише у мускуларис проприју и има метастазе у лимфним нодусима и Ц2 ако пробија мускуларис проприју и има метастазе у лимфним нодусима и Ц3 ако има перфорацију и метастазе у лимфним нодусима (147).

Исте године *Dehoix* је предложио *pTNM* канцерску класификацију (патолошки стадијум (*p*) тумор (*T*) нодус (*N*) метастаза (*M*)), која је затим прихваћена од стране *Union International Contre Cancer (UICC) and the American Joint Commission on Cancer (AJCC)* и најчешће је данас у употреби. У овом систему префикс *T* се односи на дубину инвазије тумора: *T_x*- дубина инвазије туморског ткива не може бити процењена, *T₀*- нема туморског ткива, *T_{is}*- присутно је ткиво интраепителијалног, односно

интрамукозального аденокарцинома, T1- тумор инфилтрише до субмукозе T2- тумор инфилтрише у тунику мускуларис, али без пробијања, T3- тумор пробија мускуларис проприју инвадирајући у околно масно ткиво T4a тумор пробија серозу и T4b инфилтрише директно у околне органе (Слика бр.4) (98).



Слика бр.4 Стадијум тумора pT
(Извор:www.c3life.com, 2014)

Префикс N се односи на присуство метастаза у околним лимфним нодусима: Nx- присуство лимфних нодуса не може бити процењено, N0- нема метастаза у лимфне нодуса, N1a- присутна је метастаза у једном лимфном нодусу, N1b- присутна је метастаза у 2-3 регионална лимфна нодуса, N1c- присуство туморских депозита у периректалном масно ткиву, али без метастаза у регионалне лимфне нодусе, N2a- присутне су метастазе у 4-6 лимфних нодуса и N2b- присутне су метастазе у 7 и више лимфних нодуса. Префикс M се односи на присуство удаљених метастаза: Mx-

присуство удаљених метастаза не може бити процењено, M0- нема удаљених метастаза, M1a -присутна је удаљена метастаза у једном органу (јетра, овариум, нерегионални лимфни нодус, плућа), M1б- присутна је метастаза у више органа или перитонеуму.

2.2.4.6. Прогностички параметри аденокарцинома ректума

Патолошки прогностички параметри аденокарцинома ректума су бројни, при чему је најбитнији стадијум тумора (5, 96, 98). Остали су: хистолошки градус, хистолошки тип тумора, присуство метастаза у лимфним нодусима, присуство удаљене метастазе, статус ресекционих маргина, лимфатичка и венска инвазија, перинеурална инвазија, количина фиброзе у тумору, количина инфламаторног инфилтрата у тумору, изглед инвазивне маргине тумора (Табела бр.4).

Патолошки прогностички параметри аденокарцинома ректума
стадијум тумора
хистолошки градус
хистолошки тип тумора
присуство метастаза у лимфним нодусима
присуство удаљене метастазе
статус ресекционих маргина
лимфатичка и венска инвазија
перинеурална инвазија
количина фиброзе у тумору
количина инфламаторног инфилтрата у тумору
изглед инвазивне маргине тумора

Табела бр.4.Патолошки прогностички параметри аденокарцинома ректума

Стадијум тумора- pT статус: одређује се микроскопским прегледом узорка ткива из дела тумора који је најдубље инвадирао у зид ректума (98). Истраживања су

показала да је 5-годишње преживљавање болесника са локализованим тумором око 91% , за разлику од болесника код којих је дошло до регионалног ширења тумора око 65 % (148).

Присуство метастаза у лимфним чворовима- pN статус: масно ткиво око ресектата ректума би требало темељно прегледати у циљу изолације што већег броја жлезда, при чему је потребно изоловати 12 или више лимфних чворова, узети их у даљу обраду и прегледати у целини (5, 98, 149). Фактори као што су године болесника, *body mass index*, тачна локација тумора, примена неoadјувантне терапије, као хируршка процедура могу утицати на број изолованих лимфних чворова (150,151). *Ontili* и сарадници сматрају да је изолација најмање 12 лимфних чворова одговарајућа за процену примене даљих терапијских процедура код болесника (152), док су *Chang* и сарадници доказали да је већи број лимфних чворова у позитивној корелацији са степеном преживљавања болесника (153).

Хистолошки градус: бројни су подаци да је хистолошки градус независтан прогностички параметар степена преживљавања болесника и да слабо диферентовани аденокарциноми имају дубљу инвазију у зид колоне у поређењу са умерено диферентованим туморима, да чешће дају метастазе у лимфне чворове, као и удаљене метастазе у јетру (154, 155, 156).

Хистолошки подтип тумора: неки подтипови тумора, као што су муцинозни и сигнет ринг карциноми по неким ауторима имају лошију прогнозу (110, 111, 114).

Циркумференцијална (радијална) маргина (*CRM*): *Quirke* и сарадници су 1986 године указали на значај латералног ширења тумора и улогу присуства тумора на радијалној маргини као предиктивног фактора рецидива карцинома ректума (157). Показано је да ако постоји тумор на *CRM* или ако је удаљеност *CRM*-а од ивице тумора од 1мм, чешће се јавља локални рецидив, учесталије су удаљене метастазе, као и да је време преживљавања болесника краће (3, 158, 159).

Лимфатичка инвазија: присуство лимфатичке инвазије представља независни прогностички параметар преживљавања болесника и корелира са са степеном локалног рецидива тумора као и са присуством метастаза у лимфним чворовима (127, 160, 161)

Венска инвазија: показано је да је венска инвазија независтан прогностички параметар појаве удаљених рецидива болести и дужине преживљавања болесника (162), при чему присуство екстрамуралне венске инвазије код тумора представља лошији прогностички параметар у односу на присуство интрамуралне венске инвазије (163).

Такође се сматра да присуство екстрамуралне венске инвазије представља важан индикатор у индивидуализацији постоперативне адјувантне терапије код пацијената са колоректалним карциномом (164).

Перинеурална инвазија: у корелацији је са чешћом појавом рецидива тумора и већом агресивношћу тумора. Показано је да ако је присутна перинеурална инвазија 25% болесника има 5-огодишње преживљавање, за разлику од оних код којих није била присутна перинеурална инвазија где је 5-огодишње преживљавање било 72%. (165.166.167).

Дезмоплазија је снажан показатељ степена инвазивности колоректалног аденокарцинома, у истраживању *Halvorsena i Seima* 1989 године је показано да је дезмоплазија независни прогностички параметар који смањује стопу преживљавања болесника (13, 168).

Изглед инвазивне маргине тумора: аденокарциноми тумори који имају експанзиван начин раста имају бољу прогнозу него они са инфилтративним начином раста (100).

Количина инфламаторног инфилтрата у тумору: тумори у чијој строми је присутна већа количина инфламаторног инфилтрата имају већу стопу преживљавања (169). По неким студијама присуство изражених лимфоидних агрегата са проминентним герминативним центирма- *Crohn's-like lymphoid reaction* представљају независни прогностички параметар (104, 170).

Метастазе у јетри: у 10% до 20% болесника који имају метастазе у јетри је могуће њихово хируршко одстрањење (171). Код ресековане метастазе статус ресекционе маргине је битна варијабла, уочено је дуже преживљавање болесника код којих није било резидуалног тумора на маргинама ресекције. (172). Такође је показано краће 5-годишње преживљавање болесника код којих је након метастазектомије, удаљеност тумора од маргине ресекције била мања од 1 цм (173). Ако се одстране постојеће метастазе у јетри 5-годишње преживљавање је око 38%, док је 10 годишње преживљавање око 26%, са просечним преживљавањем 3,6 година (174).

2.2.5. Клиничка слика аденокарцинома

Аденокарцином ректума се развија током дугог временског периода, може бити присутан и до пет година, а да болесници буду без симптома. Асимптоматски болесници често имају окултна крварења, при чему количина крви која се појављује у столицу расте са порастом величине и степеном улцерације тумора (175). Најчешћи симптоми су: ректално крварење, констипација, дијареја, бол, као и појава анемије уселед губитка крви (87). Често се код ових болесника погрешно дијагностикује хемороидална болест (присуство крварења), дивертикуларна болест (болови у трбуху, крварење и промене у калибру столице), као и иротабилни синдром колоне (болови у трбуху, промене у пражњењу столице). У узнапредовалим стадијумима када долази до инфилтрације тумора у околне органе мале карлице као што су мокраћна бешика, вагина, као и инфилтрација околних нерава јављају се бол, генитоуринарни симптоми, као и опструкција лумена ректума (175).

2.2.6. Дијагностика аденокарцинома

Дијагностиковање аденокарцинома ректума обухвата низ клиничких, ендоскопских и радиолошких процедура у циљу утврђивања присуства малигне болести, узимања узорка тумора и патохистолошког верификовања типа тумора, одређивање степена околне инвазије тумора, као и утврђивања да ли постоји удаљена метастаза (176).

Овакав приступ је мултидисциплинаран у циљу одређивања даљег терапијског приступа и обухвата: дигиторектални преглед, ендоскопски преглед са узимањем узорка за патохистолошку дијагностику, магнетну резонанцу мале карлице ради процене стадијума тумора, нодалног статуса, као и процене да ли је тумор пробио мезоректалну фасцију. Уколико је магнетна резонанца мале карлице недоступна, болесник може да уради преглед скенером, при чему се може проценити нодални статус, као и стадијум тумора. Ради се и преглед скенером и трбуха и грудног коша ради утврђивања присуства метастазе у јетри, односно плућима. Користи се и ендоректални ултразвук за прецизнију процену локалног стадијума болести. (176, 177).

Обзиром да је појава симптома индикативна за присуство болести у узнатредовалом стадијуму, учињени су многи напори да се тумор открије у ранијим фазама болести. Предложено изођење ендоскопског прегледа колоне и код мушкараца и код жена који су старији од 40 година живота (178), које уз извођење теста на фекално окултно крварење смањује стопу смртности од овог тумора (179).

Након дијагностике врши се процена операбилности тумора. Код карцинома који је локализован до удаљености од око 10 цм у ректуму од зупчасте линије и ако је у ниском стадијуму болести пре операције пацијент ће примити неoadјувантну радиотерапију или ићи на хирургију, а ако постоји инфилтрација мезоректалне фасције, примаће преоперативну радиохемио терапију (176).

3. ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА

Основни циљ наше студије је хистохемијско и имунохистохемијско проучавање строме аденокарицнома ректума. У складу са тим поставили смо следеће циљеве истраживања:

1. Хистохемијско и квантитативно испитивање перитуморалне дезмопластичне реакције користећи компјутеризовану „*image*“ анализу.

2. Имунохистохемијско и квантитативно испитивање миофибробласта, густине, обима и вредности ендотелијалне површине („*endothelial area*“, ЕА) васкуларних простора васкулатуре строме у различитим деловима перитуморалне строме користећи компјутеризовану „*image*“ анализу.

3. Испитивање корелације количине дезмоплазије и миофибробласта у односу на хистолошки градус тумора, стадијум тумора, присутност лимфатичке и венске инвазије, присутност перинеуралне инвазије, начина раста тумора, као и присуство метастаза у лимфним нодусима и јетри.

4. Испитивање корелације густине, обима и вредности ендотелијалне површине васкуларних простора у односу на хистолошки градус тумора, стадијум тумора, присутност лимфатичке и венске инвазије, присутност перинеуралне инвазије, начин раста тумора, као и присуство метастаза у лимфним нодусима и јетри.

5. Утврђивање просечних вредности испитиваних параметара строме, које би могле указати на присуство метастаза у лимфним чворовима и јетри.

4. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОД

Истраживање је спроведено као ретроспективна клиничко-експериментална студија у Институту за патологију и судску медицину Војномедицинске академије, у Београду. За ово истраживање постоји сагласност надлежног Етичког комитета Војномедицинске академије одржано дана 30.6.2011 године.

4.1. Испитивана популација

Истраживањем је обухваћено 70 болесника који су оперисани због аденокарцинома ректума у периоду од 2008 до 2011 године на Војномедицинској академији. У односу на пол 23 болесника су женског, а 47 болесника мушког пола, добне старости од 21 до 86 година. Код 37 болесника су постојале метастазе у лимфним нодусима, док су код 7 болесника постојале метастазе у јетри.

У Институту за патологију и судску медицину Војномедицинске академије је са сваког оперативног ресектата у току обраде ткива узимано од око 15 до око 30 узорака биопсијског материјала. Након фиксације у 10% неутралном пуферизованом раствору формалдехида биопсијски материјал је рутински обрађиван, калушљен у парафин и архивиран.

4.2. Методе

За хистопатолошку диференцијацију лезија је коришћена стандардна хистопатолошка хематоксилин-еозин метода (*H&E*), а за испитивање перитуморалне дезмоплазије је коришћена хистохемијска *Van Gieson* метода.

Имунохистохемијска комплексна *EnVision* метода је коришћена за визуелизацију експресије миофибробласта и ендотелних ћелија које облажу лумен васкуларних простора.

Микроскопска анализа тумора и процена експресије испитиваних маркера су вршени на микроскопу типа “*Leitz*”.

Репрезентативна поља за фотографије приложена у овој студији су снимана коришћењем три микроскопска увећача (x5, x10, x20) коришћењем дигиталног микроскопа *COOLSCOPE* — *Nikon* и сачувани у *JPEG* формату.

4.2.1. Стандардна хистопатолошка и хистохемијска обрада и анализа

Са архивираних парафинских блокова су, на аутоматском ротационом микротому *LKB Historang*, прављени резови дебљине 4 μ . који су након депарафинизације у ксилолу и дехидратације у опадајућим алкохолима бојени класичном хематоксилин-еозин методом (*H&E*) и хистохемијском *Van Gieson* методом.

Рутинска *H&E* метода је коришћена за хистопатолошку верификацију тумора, при чему је она омогућила да се микроскопским прегледом одреде особине тумора. Добили смо информације о хистолошком подтипу (86) као и степену диференције тумора (хистолошки градус) 86, који смо сврстали у *low grade* (добро диферентовани-NG1 и умерено диферентовани- NG2) или *high grade* (слабо диферентовани NG3). Присуство стромалне мононуклеарне реакције, као и присуство дезмоплазије смо одредили семиквантитативним начином, такође смо одредили да ли постоји лимфатичка, васкуларна и перинеуралне инвазија (90). Овом методом смо добили и увод о присуству метастаза у лимфним нодусима, као и о стању ресекционих маргина и конфигурације туморског руба (86,90). Стадијум болести смо одредили на основу *Union International Contre Cancer (UICC) and the American Joint Commission on Cancer (AJCC) TNM* система (86) као и стадијум тумора на основу модификованог *Astler Coller stagig* система (160)

Van Gieson хистохемијску методу смо користили за приказивање колагених влакана која се овом методом боје пурпурно црвено. Цитоплазма, мишићна влакна и неуроглија и други ћелијски елементи се боје жуто.

4.2.2. Имунохистохемијска метода

За имунохистохемијску идентификацију миофибробласта и ендотелних ћелија које облажу лумен васкуларних простора смо користили моноклонска мишја антитела

SMA (1:50, *Dako, Clone IA4*) и anti CD31 (1:10, *Dako*). За визуелизацију и извођење специфичне комплексне имунохистохемијске методе коришћен је *EnVision kit (Dako, Denmark*. Као хромоген је коришћен 3,3-диаминобензиадинтетрахлорид (DAB) који има као резултат бојења ткивних пресека браон боју. У току бојења су истовремено тестирани познати позитивни и негативни ткивини узорци, а по један ткивни узорак из испитиване серије тестиран је реагенсом уместо примарним антителом. Као општи растварач антисерума и средство за испирање између различитих фаза током имунохистохемијске процедуре, коришћен је 0, 1М фосфатни пуфер рН 7,2 (*PBS-Phosphate-Buffered-Saline*).

Извођење имунохистохемијске реакције

Процедура имунохистохемијског бојења подразумева поступке депарафинизације, блокирања ендogene пероксидазе, инкубирање препарата са примарним антителом и поступак извођења *En Vision* методе.

Резови дебљине 3 μ су монтирани на високо адхерентна Superfrost+ предметна стакла, затим су сушени на температури од 560 Целзијуса у току једног сата. Након депарафинизације ткивних пресека у ксилолу (три пута по пет минута) и употребе опадајућег низа концентрације етанола уследило је демаскирање антигена са виском температуром у микроталасној пећници, у 0,1М цитратном пуферу рН 6,0 у трајању од 21 минут. Након демаскирања антигена је уследило блокирање ендogene пероксидазе 3% воденим раствором H₂O₂ у трајању од 10 минута, а затим је наношено примарно антитело, које је инкубирано на собној температури у влажној комори, у трајању од једног сата.

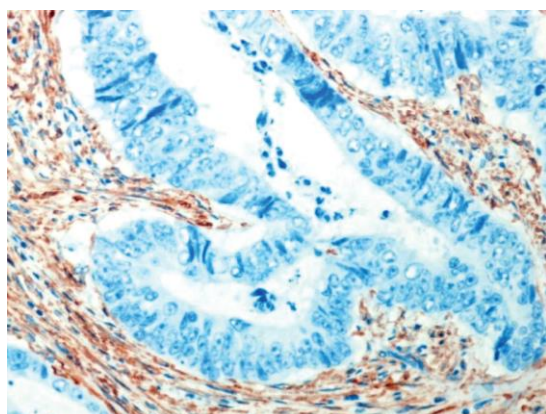
Поступак извођења *En Vision* система састоји се у инкубирању прво са биотинизираним везујућим антителом, а затим са обележеном пероксидазом. Поступак се завршава инкубацијом пресека у хромогену 3,3-диаминобензиадинтетрахлорид (DAB) у трајању од 5 минута на собној температури.

Као позитивни контролни узорци коришћени су узорци аденокарцинома ректума који су раније вишеструко тестирани и сигурно садрже испитиване антигене. Као негативна контрола за имунохистохемијско бојење коришћени су узорци ткива третирана неимуним серумом уместо примарног антитела.

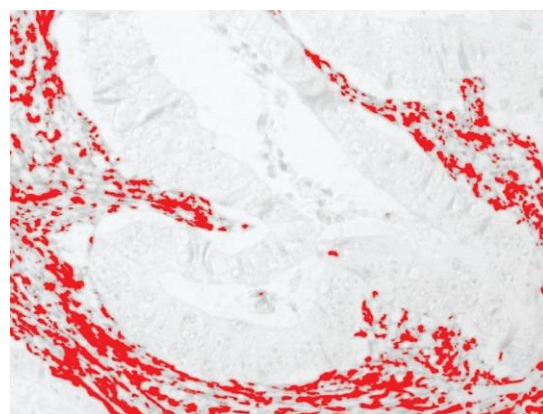
4.2.3. Очитавање резултата ткивне експресије

Пре него смо него смо приступили очитавању ткивне експресије препарати су фотографисани на дигиталном микроскопу под увеличањем за дезмоплазију (препарати обојени по методи Van Gieson) x5, за вакулатуру (препарати бојени специјалним имунохистохемијским бојењем са CD31 антителом) x10 и за миофибробласте (препарати бојени специјалним имунохистохемијским бојењем са SMA антителом) x20. Са сваког препарата обојеног SMA и Van Gieson методом се урадило по девет снимака из различитих делова тумора. Са препарата бојених на CD31 се урадило по девет снимака по следећој шеми: три слике са инвазивног фронта тумора (под инвазивним фронтом тумора подразумева се место инфилтрације које је обухваћено 50% туморским ткивом, 50% околним ткивом у којем постоји инвазија), три слике из зона „hot spots“ (места где је густина васкулатуре у тумору највећа, након што се на увеличању од 4x евидентирало место највеће васкуларизације у тумору) и три слике из тумора изабране методом случајног избора (при чему је у овим пољима туморско ткиво 100% присутно). Избегавана су подручја некрозе и улцерације тумора.

Компјутерска анализа фотографија ће се радити коришћењем бесплатног научног софтверског програма „ImageJ“, доступног на интернет адреси: <http://rsb.info.nih.gov/ij/>. Програм омогућава визуелизацију испитиваног параметра строме у црвеној боји и мануелну селекцију и даљу анализу истог од стране патолога. Слика бр. 5 и Слика бр. 6 показују пример анализе миофибробласта пре и после селекције у црвеној боји, док се у Табели бр. 2 налази пример резултата мерења миофибробласта.



Слика бр. 5 Миофибробласти пре селекције у црвеној боји (I.Tufegdžic, BUON, 2012)



Слика бр. 6 Миофибробласти после селекције у црвеној боји (I.Tufegdžic, BUON, 2012)

<i>Label</i>	<i>Area</i>	<i>Area %</i>
1.111.jpg:red	41979.8	3.4
2.112.jpg:red	23924.9	1.9
3.113.jpg:red	26040	2.1
4.114.jpg:red	91007	7.4
5.115.jpg:red	84117.4	6.8
6.116.jpg:red	86894.7	7.2
7.117.jpg:red	31185	2.5
8.118.jpg:red	51969.4	4.3
9.119.jpg:red	65816.8	5.4
10.1110.jpg:red.	56378.8	4.6

Табела бр. 5. Презентација анализе миофибробласта ("Image J")
(I.Tufegdizic, BUON, 2012)

Прегледана површина једне фотографије је аналогна 1280 μm x 960 μm (1,2мм²). За анализу параметара дезмоплазије, миофибробласта, као и ендотелијалне арее (ендотелијална ареа представља проценат површине CD31 позитивних ендотелних ћелија) систем селектоване зоне, аутоматски пребацује у проценат испитиваног поља (% area). Средње вредности процента сасваког препарата су се узеле у рад за даљу анализу. Систем омогућава и одређивање густине васкуларних простора изражене бројем CD31 позитивних васкуларних простора по 1мм², као и обима васкуларних простора изражен у μm (микрометрима).— Добијене вредности процента дезмоплазије, миофибробласта, густине, обима и површине васкулатуре су упоређивање са свим напред описаним морфолошким карактеристикама аденокарцинома ректума.

Под контролом два независна експерта је конвенцијалном семикавантитативном методом за сваки препарат утврђен степен дезмоплазије и инфламаторног инфилтрата као: оскудан, умерен или обилан. Такође, означена је конфигурација туморског руба, односно начин раста тумора, као експанзивни или инфилтративни.

4.2.4. Статистичка обрада података

У овој студији коришћене су дескриптивне и аналитичке статистичке методе. Од дескриптивних коришћени су апсолутни и релативни бројеви (n, %), мере централне

тенденције (аритметичка средина, медијана) и мере дисперзије (стандардна девијација, интервал варијације). Од аналитичких коришћени су тестови разлике, параметарски (t test) и непараметарски (Mann-Whitney U тест), као и анализа повезаности (Спирманова корелациона анализа)

У аналитичкој статистици коришћена је и ROC анализа (Receiver operating characteristics), а *cut-off* вредност одређивана је или на основу графичког приказа (најбољи однос сензитивности и специфичности) или на основу Јуденовог индекса.

Резултати су приказани табеларно и графички.

Сви подаци обрађени су у SPSS 20.0 (IBM корпорација) софтверском пакету.

Тестирање значајности извршено је на нивоу вероватноће $p < 0,05$.

5. РЕЗУЛТАТИ

5.1. Демографске и хистопатолошке карактеристике

Нашим истраживањем је обухваћено 70 болесника од којих 23 (33%) женског пола, а 47 (67%) мушког пола, што указује на чешћу појаву аденокарцинома ректума код мушкараца.

Старосна узраст се кретала од 21 до 87 година, при чему је млађих болесника од 50 година било 10, а старијих од 51 године 60.

Микроскопски подтип испитиваних аденокарцинома у нашем истраживању је обухватио у већем броју, 63 (85,7%) тубуларне аденокарциноме, док су преостали чинили муцинозне аденокарциноме у 7 (14,3%) случајева.

У односу на хистолошки градус у нашој групи испитаника постоји следећа дистрибуција: low grade тумора је било у 60 (85,7%) аденокарцинома (односно добро диферентовани хистолошки градус (HG1) је имало 16 (22,9%) тумора и умерено диферентовани хистолошки градус (HG2) је имало 44 (62,8%)), док је high grade (слабо диферентовани хистолошки градус (HG3), имало 10 (14,1%) аденокарцинома.

Лимфатичка инвазија је уочена у 41(58,6%) испитиваних аденокарцинома.

Венска инвазија је уочена у 19 (27,1%) испитиваних аденокарцинома

Перинеурална инвазија је уочена у 36 (51,9%) од испитиваних аденокарцинома.

Перитуморални инфламаторни инфилтрат је у 50 (71,4%) аденокарцинома био оскудан, у 13 (18,6%) аденокарцинома умерен, а у 7(0,1%) аденокарцинома изражен.

Перитуморална дезмопластична реакција је одређена семикавантитативним начином мерења. Код 17 (24,3%) аденокарцинома је означена као оскудна, код 31 (44,3%) аденокарцинома као умерена и код 22 (31,4%) аденокарцинома изражена .

Начин ширења тумора испитиваних аденокарцинома наше групе је у 20 (28,6%) случајева био експанзиван, док је у преосталих 50 (71,4%) инфилтративан.

Расподела обрађених резултата у односу на пол, старост и хистолошке карактеристике тумора су дате у Табели бр.6.

		Н (број)	% (процент)
пол	мушки	47	67
	женски	23	33
старост	млађи од 50 година	10	14,3
	старији од 50 година	60	85,7
хистолошки тип	муцинозни	7	14,3
	тубуларни	63	85,7
хистолошки градус	low	60	85,7
	high	10	14,1
лимфатичка инвазија	не	29	41,4
	да	41	58,6
венска	не	51	72,9
	да	19	27,1
перинеурална	не	34	48,1
	да	36	51,9
дезмоплазија	оскудна	17	24,3
	умерена	31	44,3
	изражена	22	31,4
количина инфламаторног инфилтратата	оскудна	50	71,4
	умерена	13	18,6
	изражена	7	0,1
начин ширења	експанзиван	20	28,6
	инфилтративан	50	71,4

Табела бр. 6.. Расподела обрађених резултата у односу на пол, старост и хистолошке карактеристике тумора

Од испитиваних болесника код 37 (52,9%) је нађено да постоје метастазе у лимфним чворовима. Од испитиваних болесника код 7 (10%) је нађено да постоје метастазе у јетри. Расподела обрађених резултата у односу на присуство метастаза у јетри и лимфним нодусима дате су и Табели бр. 7.

		Н (број)	% (процент)
метастазе у јетри	не	63	90
	да	7	10
метастазе у лимфним чворовима	не	33	47,1
	да	37	52,9

Табела бр. 7. Расподела обрађених резултата у односу на присуство метастаза у јетри и лимфним нодусима

Расподела патолошког стадијума болести је била заступљена следећим редом:

-патолошки стадијум болести: pT2 (инфилтрација тумора у tunicu muscularis): 19 (27,1%) болесник , патолошки стадијум болести pT3 (инфилтрација тумора у околно масно ткиво): 51 (72,9%) болесник .

У стадијуму болести по Astler Coller-у се налазило:

-Б1 стадијум: туморско ткиво инфилтрише у tunicu muscularis, pT2, без присуства метастаза у регионалним лимфним нодусима- 17 (24,3%) болесника

-Б2 стадијум: туморско ткиво инфилтрише у околно масно ткиво, pT3, без присуства метастаза у регионалним лимфним нодусима- 16 (22,8%) болесника

-Ц1 стадијум: туморско ткиво инфилтрише у tunicu muscularis, pT2, са присуством метастаза у регионалним лимфним нодусима- 1 (0,1%) болесник

-Ц2 стадијум: туморско ткиво инфилтрише у околно масно ткиво, pT3, са присуством метастаза у регионалним лимфним нодусима- 29 (41,4%) болесника

-Д стадијум: присутне метастазе у јетри, без обзира на патолошки стадијум pT и присуство метастаза у лимфне нодусе -7 (0,1%) болесника.

Дистрибуција болесника по патолошком стадијум (pT) и стадијуму болести по Astler Coller-у је приказана у Табели бр.8.

		Н (број)	% (процент)
стадијум pT	pT2	19	27,1
	pT3	51	72,9
Astler Coller	Б1	17	24,3
	Б2	16	22,8
	Ц1	1	0,1
	Ц2	29	41,4
	Д	7	10

Табела бр.8. Дистрибуција болесника у односу на стадијум болести

5.2. Експресија миофибробласта (SMA)

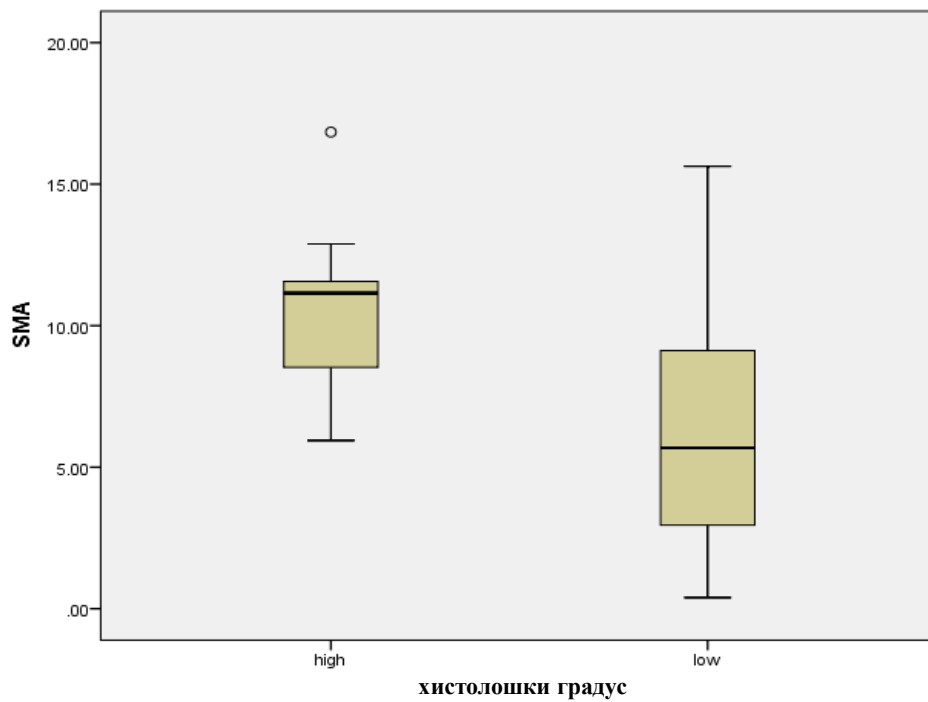
5.2.1. Експресија миофибробласта (SMA) у односу на пол, старост, хистолошки тип, хистолошки градус и стадијум тумора

Испитавањем експресије миофибробласта (SMA) перитуморалне строме запажено је да постоји статистички значајна повезаност између количине

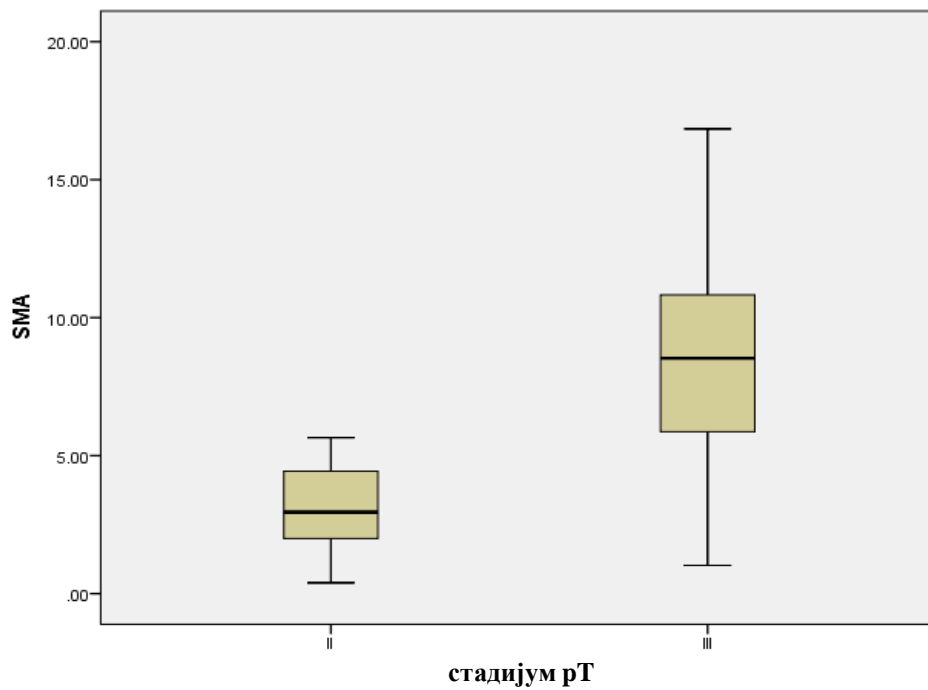
миофибробласта у перитуморалној строми и патолошког стадијума, стадијума болести по Astler Coller-у и хистолошког градуса тумора. Није запажена статистички значајана повезаност између количине миофибробласта у односу на пол болесника и хистолошки тип тумора. Резултати експресије SMA у односу на пол, старост, хистолошки тип, хистолошки градус и стадијум тумора су приказани у Табели бр. 9, као и у Графиконима бр.3- бр.5.

		SMA						
		Број	Аритметичка средина	SD	Median	Минимум	Максимум	
пол	мушки	47	7.24	3.97	7.58	1.03	16.84	t=1,245
	женски	23	5.99	3.87	5.71	.39	12.94	p=0,271
старост	<51	10	6.2398	3.79906	5.9167	2.35	12.94	Z=-0.352 p=0.724
	51+	60	6.9302	4.00173	6.3246	.39	16.84	
хистолошки тип	муцинозн	7	6.27	2.22	6.11	3.32	10.25	t=-0,636
	тубуларни	63	6.89	4.11	6.20	.39	16.84	p=0,537
хистолошки градус	high	10	10.56	3.14	11.15	5.95	16.84	t=-3,464
	low	60	6.21	3.75	5.68	.39	15.63	*p=0,001
стадијум pT	pT2	19	3.17	1.60	2.95	.39	5.65	t=-7,928
	pT3	51	8.20	3.69	8.53	1.03	16.84	*p<0,001
Astler Coller	Б1	17	3.07	1.56	2.95	.39	5.58	
	Б2	16	6.04	4.30	5.09	1.03	16.84	Rho=0,658
	Ц1	1	2.29	.	2.29	2.29	2.29	*p<0,001
	Ц2	29	8.99	3.07	9.03	2.64	15.63	
	Д	7	9.47	2.72	11.07	5.79	12.18	

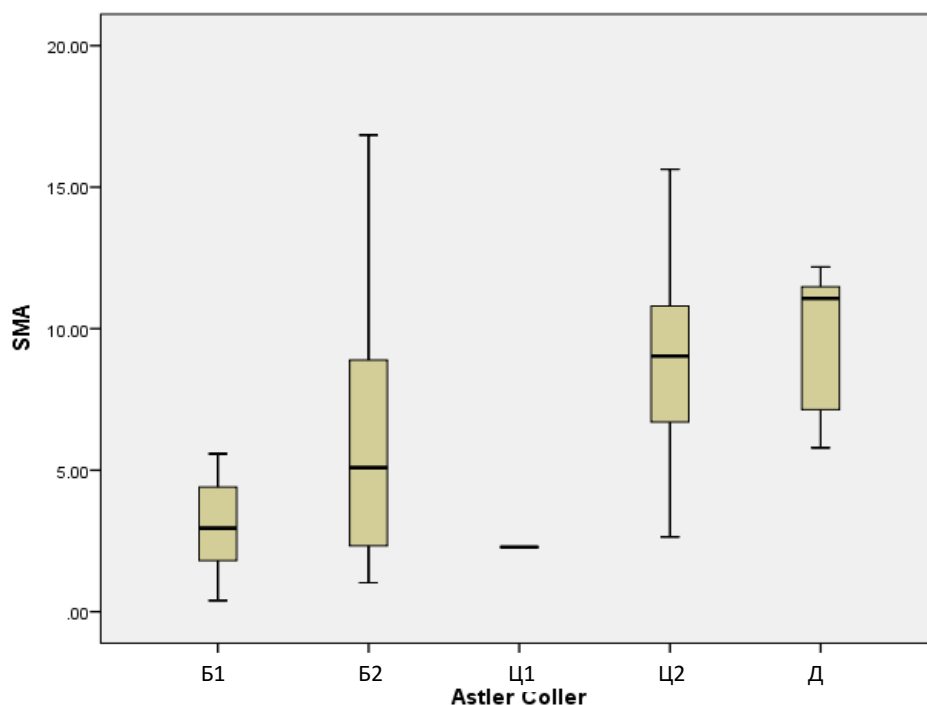
Табела бр.9.Резултати експресије SMA у односу на пол, старост, хистолошки тип, градус и стадијум



Графикон бр.3 . Експресија SMA у односу на хистолошки градус тумора (HG)



Графикон бр.4. Експересија SMA у односу на стадијум тумора pT



Графикон бр.5. Експресија SMA у односу на стадијум тумора по Astler Coller-у

5.2.2. Експресија миофибробласта (SMA) у односу на начин туморског раста, инвазију, метастазирање и дезмоплазију

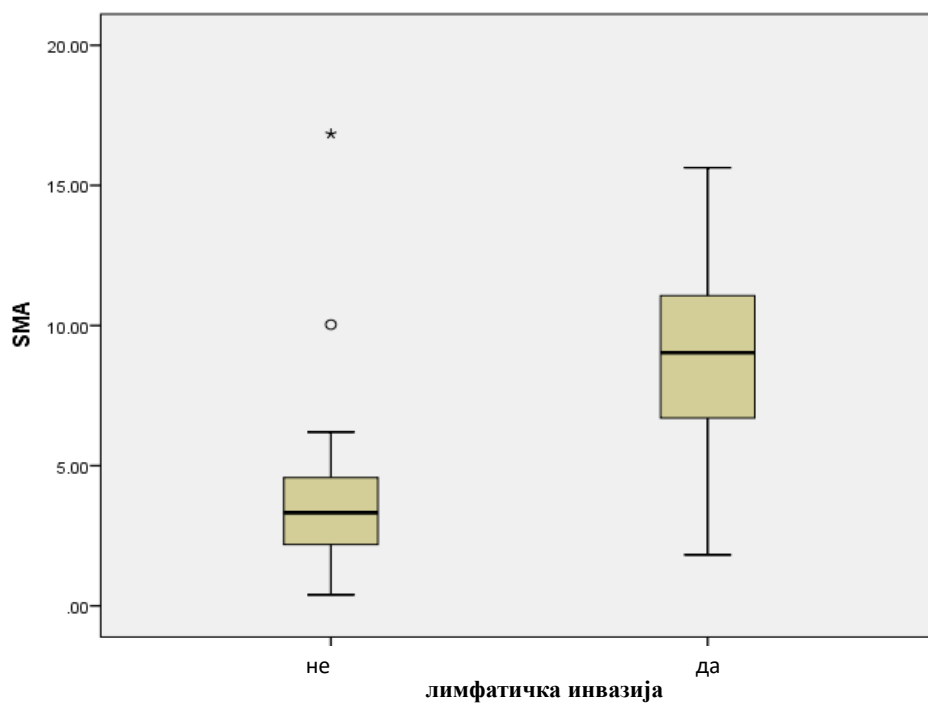
Испитавањем експресије миофибробласта (SMA) је показано да постоји статистички значајна повезаност између количине миофибробласта у перитуморалној строми и присуства метастазе у јетри, у лимфним чворовима, као и присуства лимфатичке, венске инвазије и перинеуралне инвазије.

Такође, постоји статистички значајна повезаност између количине миофибробласта и количине дезмоплазије, инфламаторног инфилтрата, као и начина ширења тумора.

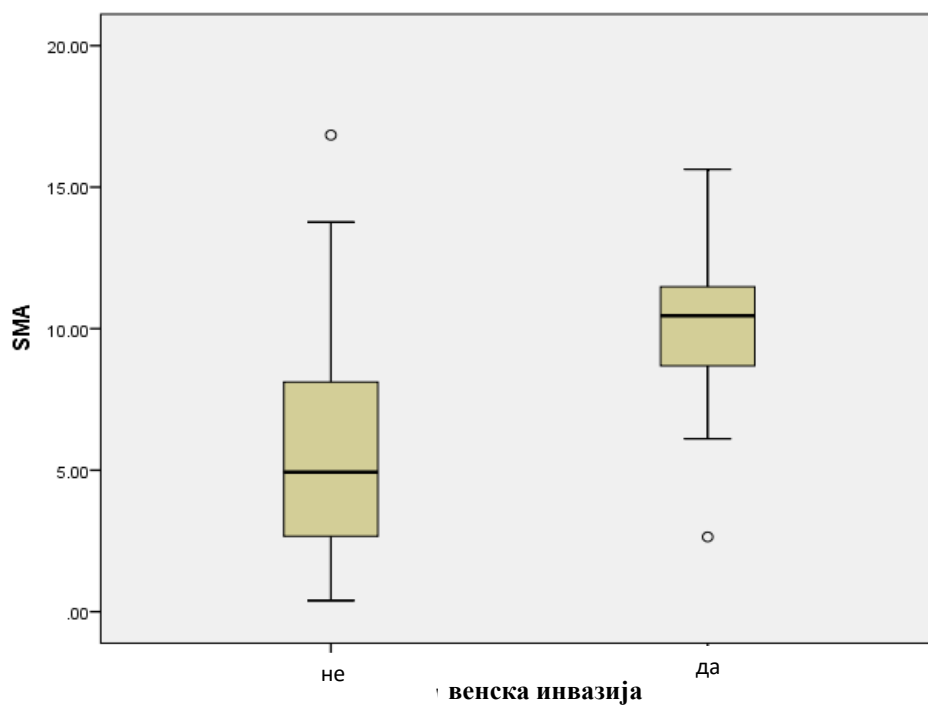
Резултати експресије SMA у односу на присуство метастаза у лимфним чворовима, јетри, у односу на лимфатичку, венску и перинеуралну инвазију, количину дезмоплазије и инфламаторног инфилтрата, као и начин ширења тумора је дат у Табели бр.10., као и у Графиконима бр.6-бр.13

		SMA						
		Број	Аритметичка средина	SD	Median	Минимум	Максимум	
лимфатичка инвазија	не	29	3.92	3.19	3.32	.39	16.84	Z=-5,538
	да	41	8.89	3.06	9.03	1.82	15.63	*p<0,001
венска инвазија	не	51	5.69	3.72	4.93	.39	16.84	Z=-4,167
	да	19	9.90	2.80	10.46	2.64	15.63	*p<0,001
перинеурална инвазија	не	34	3.99	2.52	3.44	.39	10.03	t=8,157
	да	36	9.51	3.10	9.33	2.64	16.84	*p<0,001
дезмоплазија	оскудна	17	2.98	1.57	2.95	.39	5.65	Rho=0,605
	умерна	31	7.30	3.95	6.70	1.03	16.84	+
	изражна	22	9.16	3.04	9.82	2.39	12.94	*p<0,001
инфламаторни инфилтрат	оскудан	50	7.79	3.74	8.20	1.03	16.84	Rho=-0,392
	умерен	13	4.57	3.63	3.80	.39	12.18	*p<0,001
	изражен	7	4.18	3.48	2.95	1.15	11.39	
начин ширења	експанзиван	20	3.08	1.74	2.80	.39	6.11	t=-8,219
	инфилтративан	50	8.33	3.58	8.55	1.82	16.84	*p<0,001
метастазе у лимфним чворовима	не	33	4.51	3.49	3.71	.39	16.84	Z=-4,971
	да	37	8.90	3.14	9.03	2.29	15.63	*p<0,001
метастазе у јетри	не	63	6.54	3.98	5.95	.39	16.84	Z=-2,085
	да	7	9.47	2.72	11.07	5.79	12.18	*p=0,037

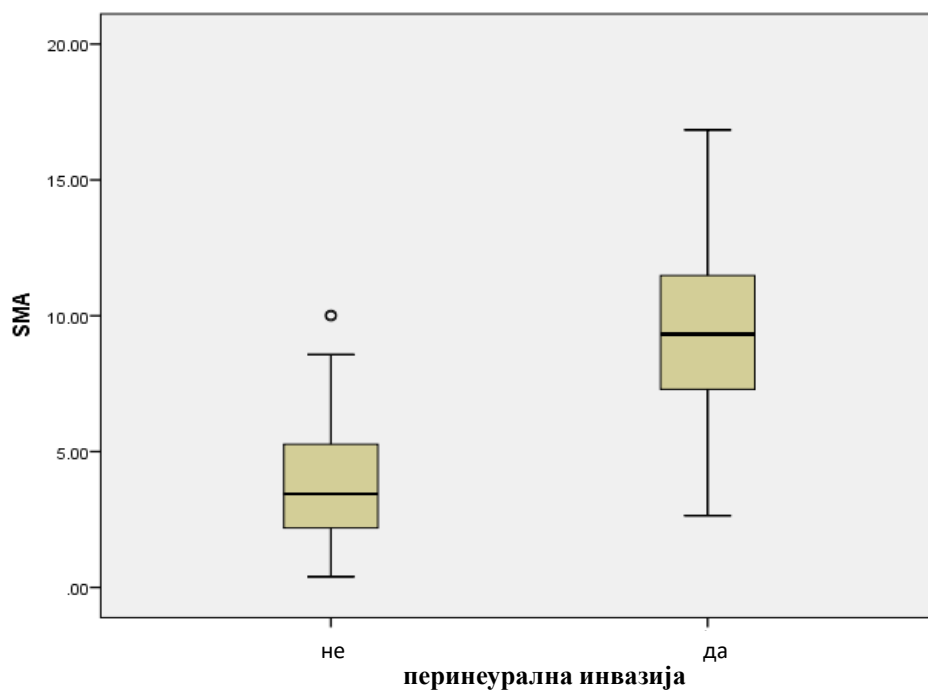
Табела бр.10 Резултати експресије SMA у односу лимфатичку, венску и перинеуралну инвазију, дезмоплазију, инфламаторни инфилтрат, начин ширења тумора и метастазе у лимфним чворовима и јетри



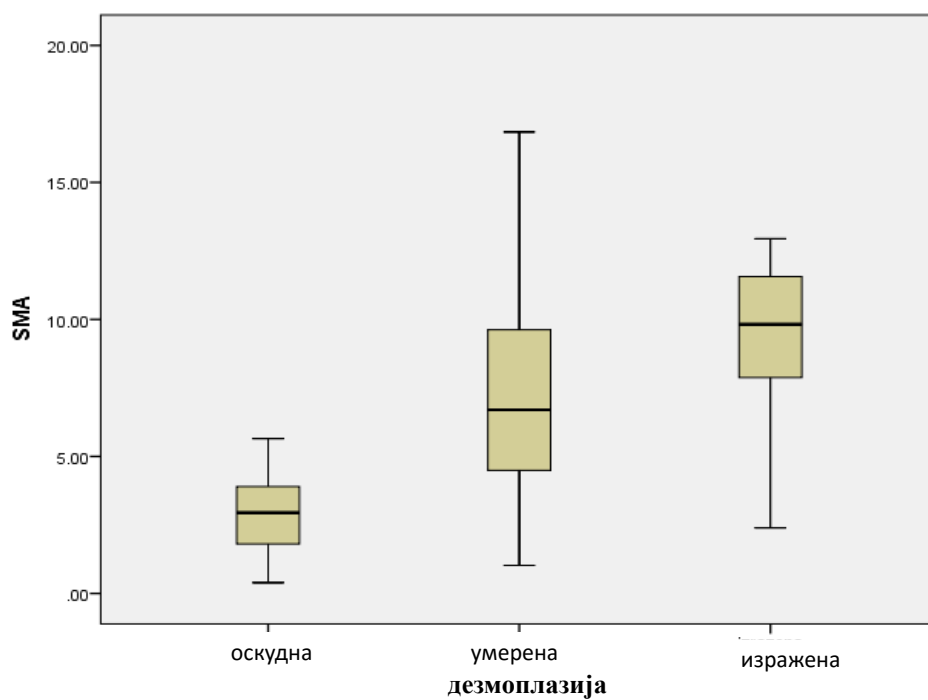
Графикон бр.6. Експресија SMA у односу лимфатичку инвазију



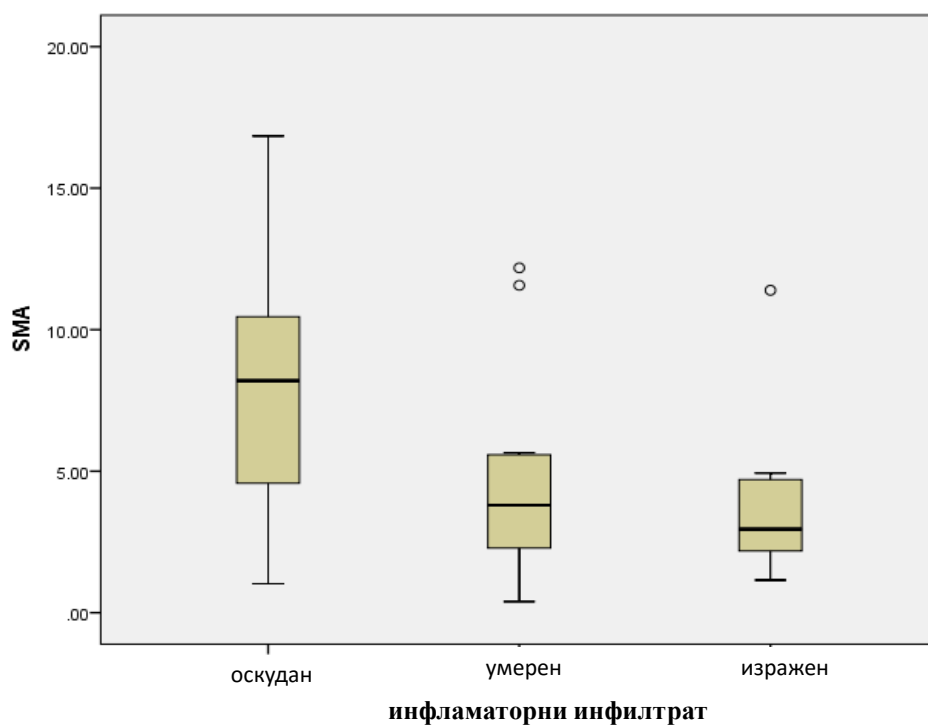
Графикон бр.7.. Експресија SMA у односу венску инвазију



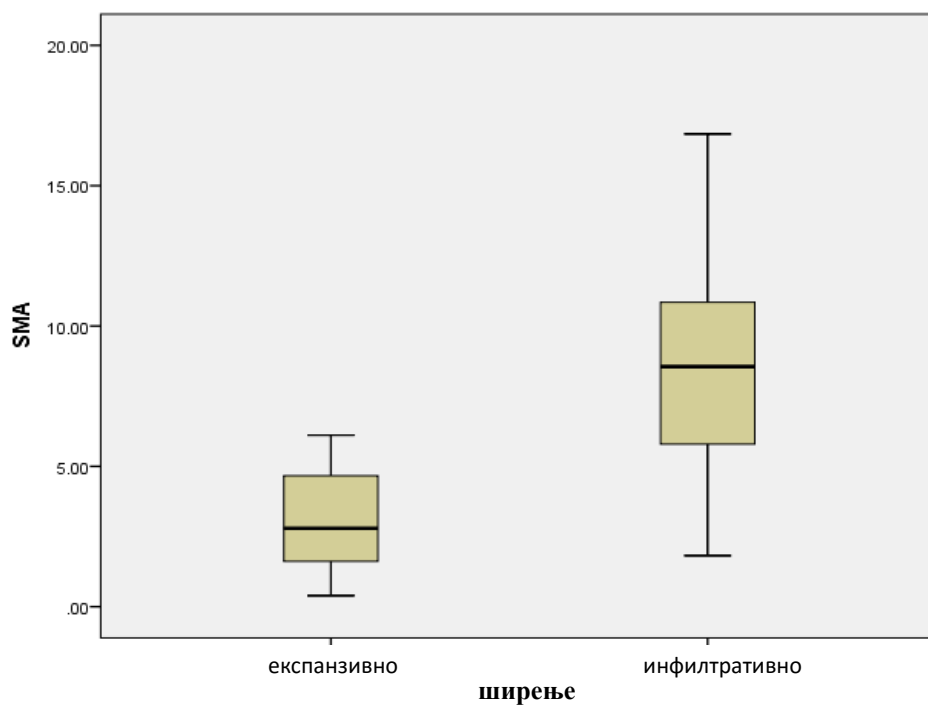
Графикон бр.8. Експресија SMA у односу перинеуралну инвазију



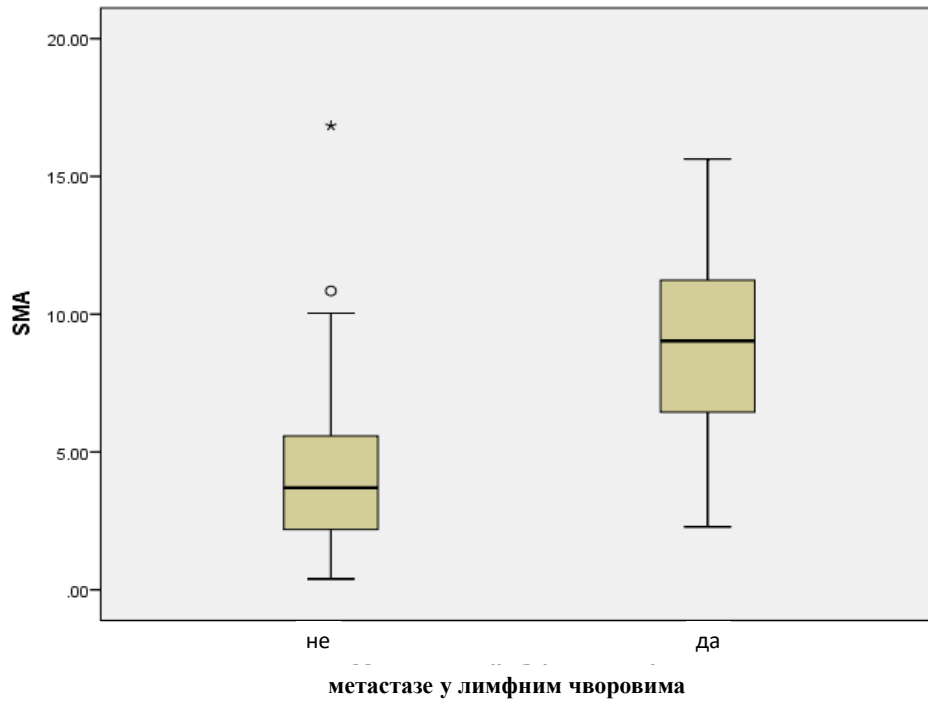
Графикон бр.9. Експресија SMA у односу дезмоплазију



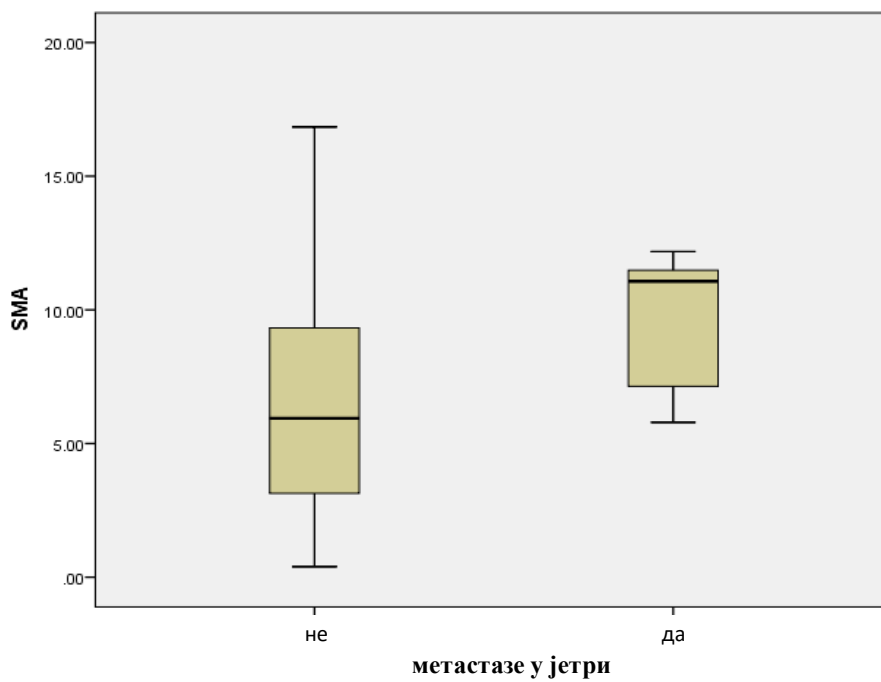
Графикон бр.10. Експресија SMA у односу инфламаторни инфилтрат



Графикон бр.11.. Експресија SMA у односу начин ширења тумора



Графикон бр.12 Експресија SMA у односу на метастазе у лимфним чворовима



Графикон бр.13. Експресија SMA у односу на присуство метастазе у јетри

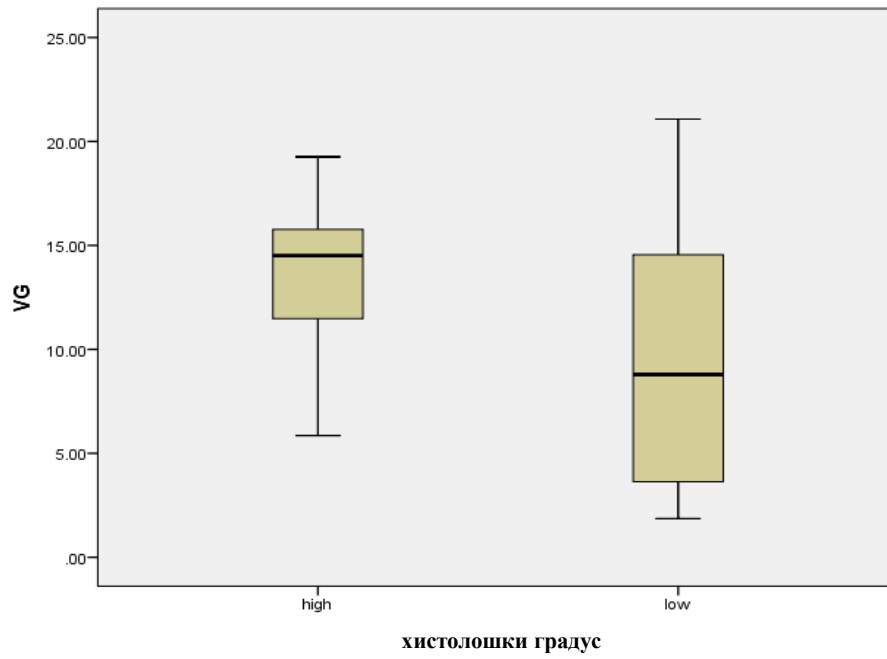
5.3. Дезмоплазија (експресија Van Gieson -VG)

5.3.1. Експресија VG у односу на пол, старост, хистолошки тип, хистолошки градус и стадијум тумора

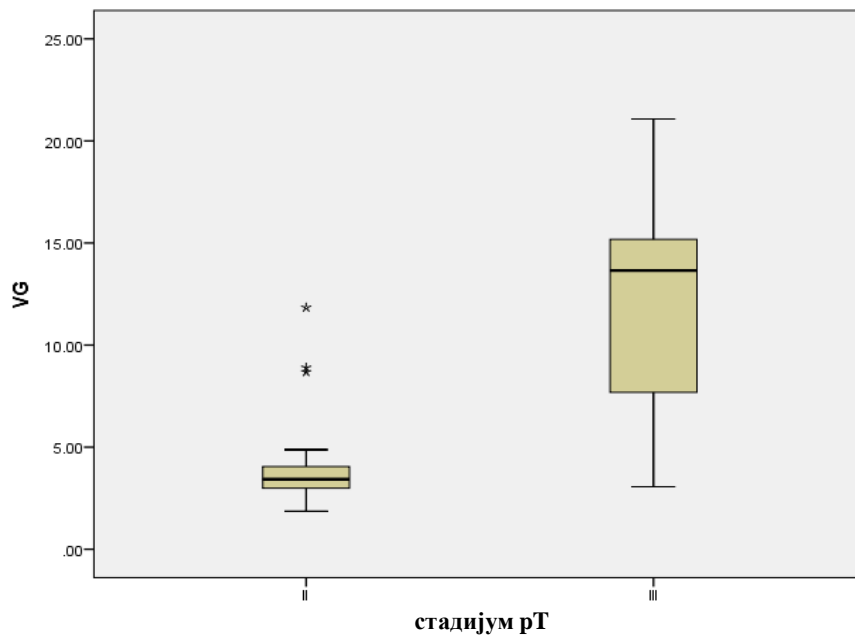
Испитивање дезмоплазије (VG) перитуморалне строме је показало да постоји статистички значајна повезаност између дезмоплазије и патолошког стадијума, стадијума болести по Astler Coller-у и хистолошког градуса. Резултати експресије дезмоплазије (VG) у односу на пол, старост, хистолошки тип, хистолошки градус и стадијум тумора су приказани у Табели бр.11, као и у Графиконима бр.14-бр.16.

		VG						
		Број	Аритметичка средина	SD	Median	Минимум	Максимум	
пол	мушки	47	10.65	5.63	12.59	1.86	21.07	Z=-1,757
	женски	23	8.36	5.47	8.13	2.05	19.26	p=0,079
старост	<51	10	9.5773	4.77926	9.7081	3.10	16.16	Z=-0.168
	51+	60	9.9510	5.81201	11.9099	1.86	21.07	p=0.867
хистолошки тип	муцинозни	7	12.57	4.26	13.65	3.43	16.07	Z=-1,126
	тубуларни	63	9.60	5.73	8.90	1.86	21.07	p=0,260
хистолошки градус	high	10	13.06	4.33	14.51	5.85	19.26	Z=-1,964
	low	60	9.37	5.70	8.79	1.86	21.07	*p=0,050
стадијум pT	pT2	19	4.26	2.65	3.43	1.86	11.84	Z=-5,118
	pT3	51	12.00	4.99	13.65	3.06	21.07	*p<0,001
Astler Coller	Б1	17	4.03	2.54	3.33	1.86	11.84	Rho=0,68 1
	Б2	16	7.95	5.18	6.04	3.06	21.07	
	Ц1	1	3.55	.	3.55	3.55	3.55	*p<0,001
	Ц2	29	13.84	3.84	14.92	3.10	19.80	
	Д	7	13.18	3.39	14.06	6.07	16.77	

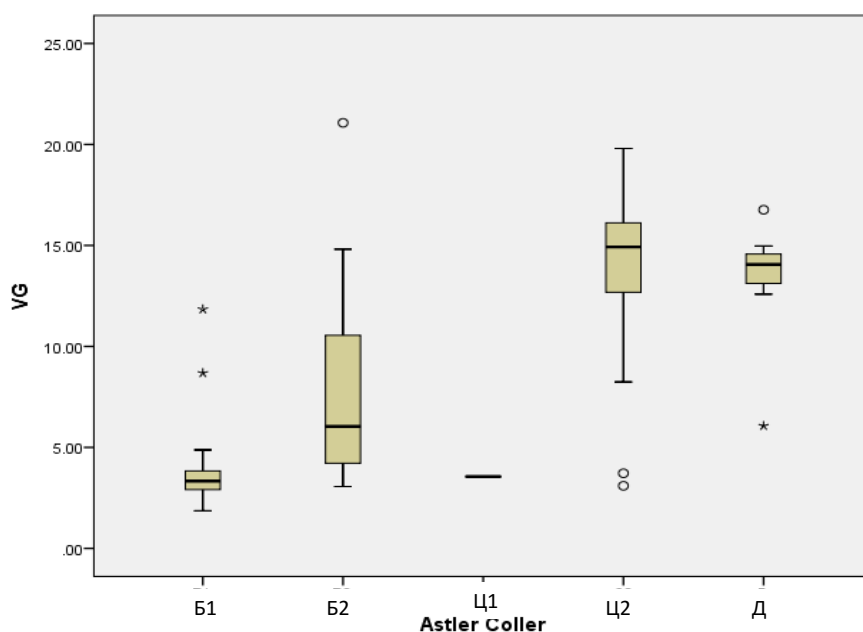
Табела бр.11.Резултати експресије VG у односу на пол, старост, хистолошки тип, градус и стадијум тумора



Графикон бр.14. Експресија VG у односу на хистолошки градус



Графикон бр.15. Експресија VG у односу на стадијум тумора рТ



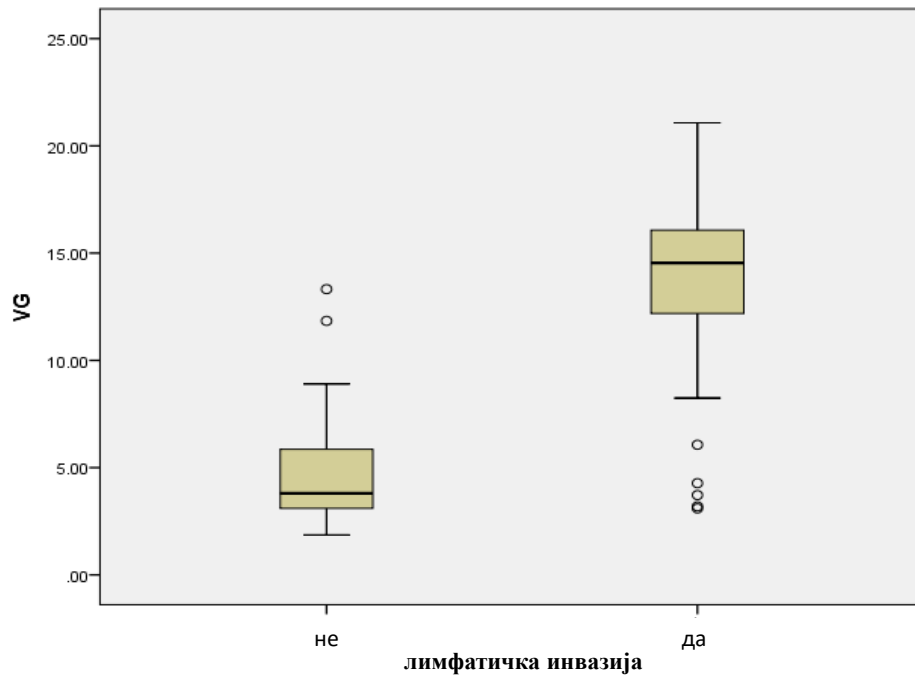
Графикон бр.16. Експресија VG у односу на стадијум по Astler Coller

5.3.2. Експресија VG у доносу на начин туморског раста, инвазију, метастазирање и дезмоплазију

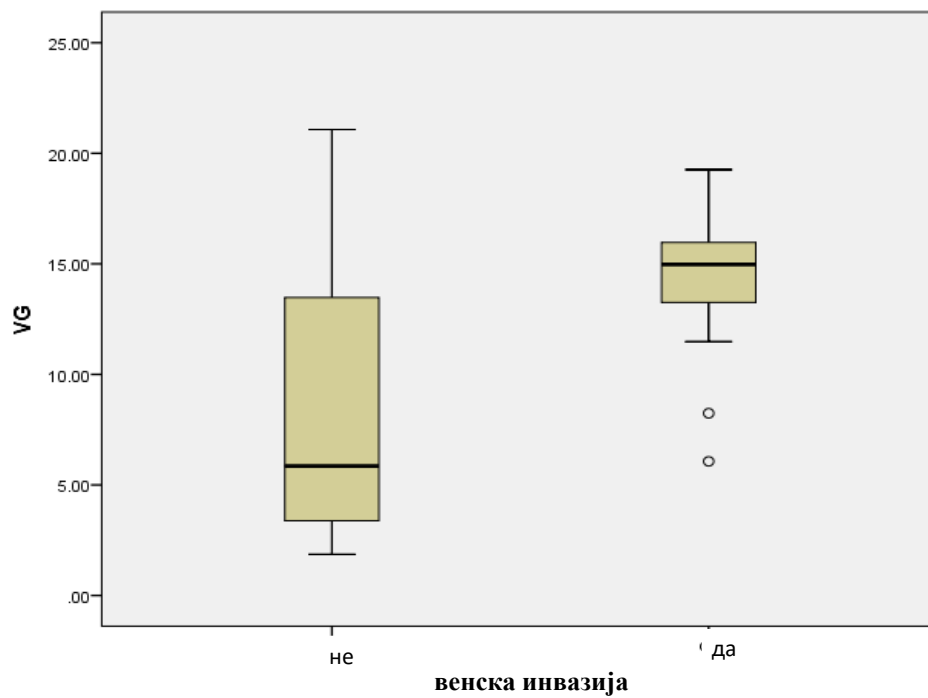
Испитивање дезмоплазије (VG) је показало да постоји статистички значајна повезаност између количине дезмоплазије у перитуморалној строми и присуства метастаза у лимфним чворовима, присуства лимфатичке, венске инвазије, као и перинеуралне инвазије. Такође, постоји статистички значајна повезаност између количине дезмоплазије у перитуморалној строми и количине инфламаторног инфилтрата, као и начина ширења тумора. Резултати експресије дезмоплазије (VG) у односу на метастазе у лимфним чворовима, у јетри, лимфатичку, венску и перинеуралну инвазију, количину дезмоплазије и инфламаторног инфилтрата, као и начин ширења тумора су приказани у Табели бр.12., као и у Графиконима бр.17-бр.22.

		VG						
		Број	Аритметичка средина	SD	Median	Минимум	Максимум	
лимфатичка инвазија	не	29	4.91	2.87	3.80	1.86	13.32	Z=- 5,991
	да	41	13.42	4.30	14.55	3.10	21.07	*p<0,00 1
венска инвазија	не	51	8.27	5.53	5.85	1.86	21.07	Z=- 4,035
	да	19	14.26	3.09	14.97	6.07	19.26	*p<0,00 1
перинеурална инвазија	не	34	6.05	4.44	4.00	1.86	21.07	Z=- 5,523
	да	36	13.53	4.03	14.68	3.10	19.80	*p<0,00 1
дезмоплазија	оскудна	50	11.60	5.26	13.48	1.86	21.07	Rho=- 0,468
	умерна	13	6.50	5.00	3.55	2.05	16.77	*p<0,00 1
	изражна	7	4.04	1.23	3.80	2.18	6.07	
инфламаторни инфилтрат	оскудан	20	4.91	3.41	3.49	1.86	13.65	Z=- 4,797
	умерен	50	11.89	5.11	13.74	2.91	21.07	*p<0,00 1
метастазе у лимфним чворовима	не	33	5.93	4.45	4.16	1.86	21.07	Z=- 5,394
	да	37	13.44	4.03	14.17	3.10	19.80	*p<0,00 1
метастазе у јетри	не	63	9.53	5.75	8.90	1.86	21.07	Z=- 1,517
	да	7	13.18	3.39	14.06	6.07	16.77	p=0,129

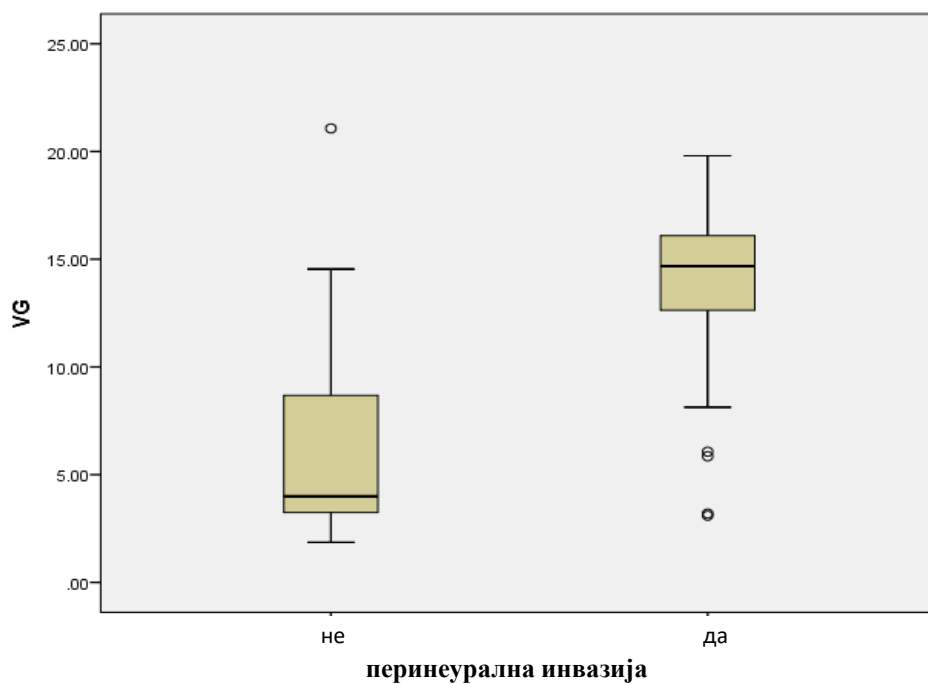
Табела br.12 Резултати експресије дезмоплазије (VG) у односу на у односу лимафтичку, венску и перинеуралну инвазију, дезмоплазију, инфламаторни инфилтрат, начин ширења тумора и метастазе у лимфним чворовима и јетри



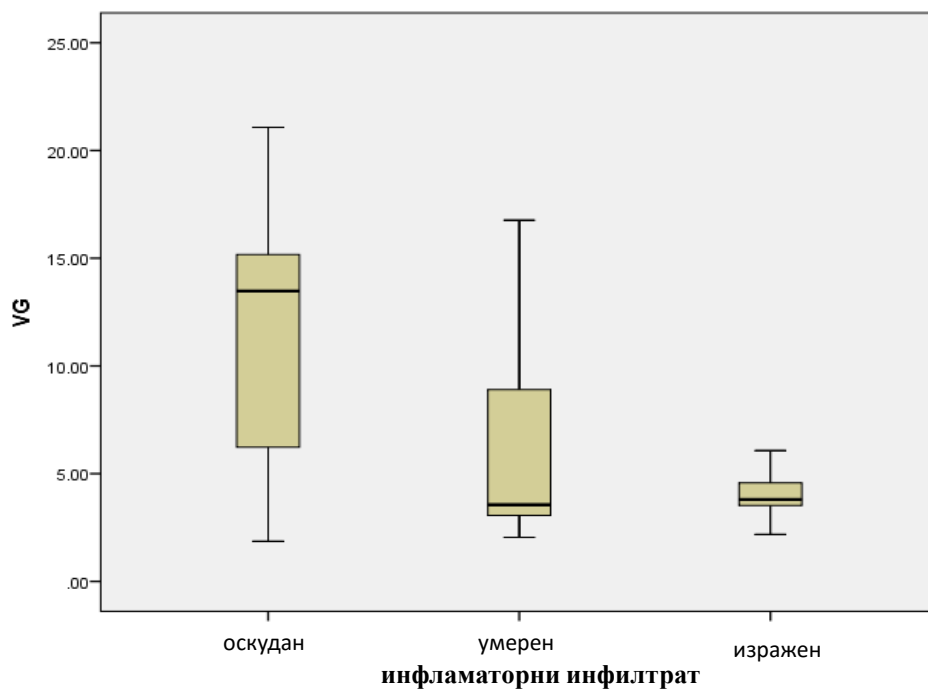
Графикон бр.17. Експресија VG у односу на присуство лимфатичке инвазије



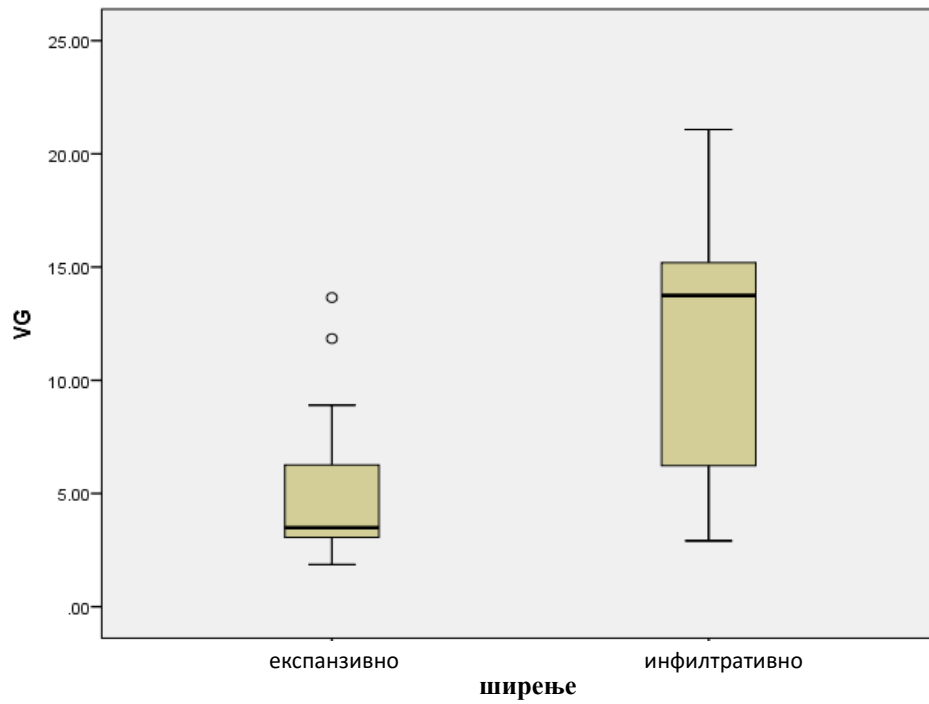
Графикон бр.18. Експресија VG у односу на присуство венске инвазије



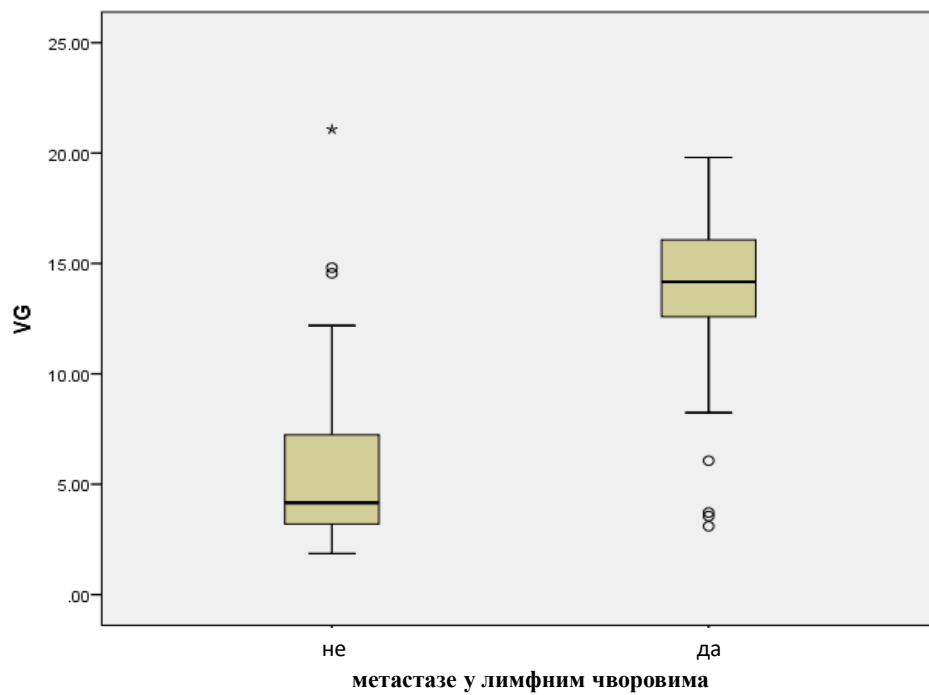
Графикон бр.19. Експресија VG у односу на присуство перинеуралне инвазије



Графикон бр.20 Експресија VG у односу на количину инфламаторног инфилтрата



Графикон бр.21. Експресија VG у односу на начин ширења тумора



Графикон бр.22. Експресија VG у односу на присуство метастаза у лимфним чворовима

5.4 . Резултати мерења CD31

Испитивање васкуларних простора (CD31): густине изражене бројем (Б), обима (О) и вредности ендотелијалне површине тј. „*endothelial area*“ - (ЕА) стране са различитих места у тумору је дало следеће резултате.

Мерени су параметри васкуларних простора у три зоне тумора који су обележени:

- са инвазивног фронта тумора обележени редом: CD31 EA1, CD31 B1, CD31 O1,
- са места највеће густине васкулатуре (“*hot spots*”) обележени редом - CD31EA2, CD31 B2, CD31 O2
- са места изабраних методом случајног избора обележени редом - CD31 EA3, CD31 B3, CD31 O3.

5.4.1 Резултати мерења ендотелијалне површине тј. „*endothelial area*“ - (ЕА) васкуларних простора

А.Резултати мерења ендотелијалне површине тј. „*endothelial area*“ - (ЕА) са инвазивног фронта тумора- CD31 EA1 нису показали статистичку повезаност CD31 EA1 ни са једним од испитиваних параметара.

Резултати експресије CD31 EA1 у односу на пол, старост, хистолошки тип, хистолошки градус и стадијум тумора су приказани у Табели бр.13.

CD31 EA1								
		Број	Аритметичка средина	SD	Median	Минимум	Максимум	
пол	мушки	47	3.21	1.35	3.10	1.06	8.02	Z=-1,257
	женски	23	4.16	2.27	3.57	1.12	8.02	p=0,209
старост	<51	10	3.6467	2.15978	3.2672	1.12	8.02	Z=-0,067
	51+	60	3.5014	1.69012	3.1450	1.06	8.02	p=0,946
хистолошки тип	муцинозни	7	4.07	1.99	3.58	2.25	8.02	Z=-0,871
	тубуларни	63	3.46	1.73	3.13	1.06	8.02	p=0,384
хистолошки градус	high	10	3.64	2.10	3.30	1.56	8.02	Z=0,001
	low	60	3.50	1.70	3.15	1.06	8.02	p=1,000
стадијум pT	pT2	19	3.54	1.50	3.23	1.48	7.80	t=0,042
	pT3	51	3.52	1.85	3.10	1.06	8.02	p=0,967
Astler Coller	Б1	17	3.59	1.58	3.28	1.48	7.80	Rho=-0,052
	Б2	16	3.42	1.63	3.09	1.13	7.11	
	Ц1	1	3.23	.	3.23	3.23	3.23	p=0,670
	Ц2	29	3.49	1.96	2.89	1.06	8.02	
	Д	7	3.77	1.93	3.10	2.51	8.02	

Табела бр.13 Резултати експресије CD31 EA1 у односу на пол, старост, хистолошки тип, хистолошки градус и стадијум тумора

Резултати експресије CD31 EA1 у односу на метастазе у лимфним чворовима, у јетри, лиматичку, венску и перинеуралну инвазију, количину дезмоплазије и инфламаторног инфилтрата, као и начин ширења тумора су приказани у Табели бр.14.

		CD31 EA1						
		Број	Аритметичка средина	SD	Median	Минимум	Максимум	
лимфатичка инвазија	не	29	3.66	1.56	3.28	1.48	7.80	Z=-1,234
	да	41	3.42	1.88	2.89	1.06	8.02	p=0,217
венска инвазија	не	51	3.41	1.59	3.16	1.12	7.80	Z=-0,350
	да	19	3.83	2.13	3.10	1.06	8.02	p=0,726
перинеурална инвазија	не	34	3.54	1.60	3.20	1.13	7.80	Z=-0,635
	да	36	3.50	1.90	2.89	1.06	8.02	p=0,526
демплазија	оскудна	17	3.70	1.48	3.23	1.48	7.80	Rho=-0,011 p=0,926
	умерна	31	3.26	1.76	2.88	1.13	8.02	
	изражна	22	3.75	1.94	3.45	1.06	8.02	
инфламаторни инфилтрат	оскудан	50	3.47	1.89	2.96	1.06	8.02	Rho=0,139 p=0,249
	умерен	13	3.40	1.05	3.23	1.48	5.36	
	изражен	7	4.11	1.84	3.28	2.60	7.80	
начин ширења	експанзиван	20	3.60	1.76	3.18	1.48	8.02	Z=-0,338
	инфилтратив ан	50	3.49	1.76	3.14	1.06	8.02	p=0,735
метастазе у лимфним чворовима	не	33	3.51	1.58	3.18	1.13	7.80	Z=-0,465
	да	37	3.53	1.91	3.10	1.06	8.02	p=0,642
метастазе у јетри	не	63	3.49	1.74	3.16	1.06	8.02	Z=-0,465
	да	7	3.77	1.93	3.10	2.51	8.02	p=0,642

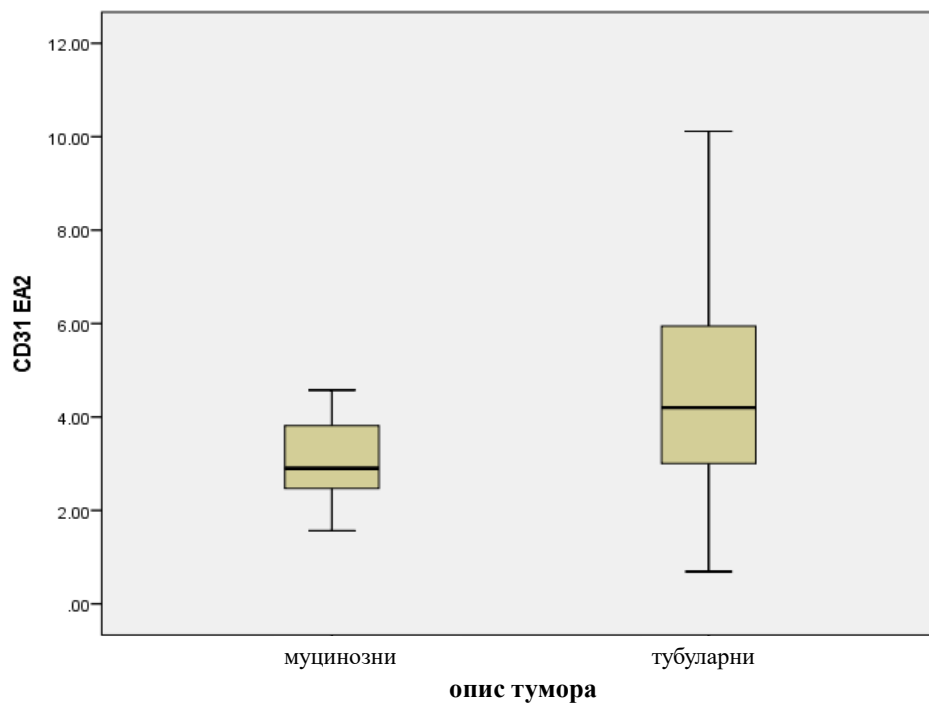
Табела бр.14. Резултати експресије CD31 EA1 у односу на у односу лимфатичку, венску и перинеуралну инвазију, демплазију, инфламаторни инфилтрат, начин ширења тумора и метастазе у лимфним чворовима и јетри

Б. Резултати мерења ендотелијалне површине тј., „endothelial area“ - (ЕА) са места највеће густине васкулатуре (“hot spots”) -CD1EA2 су показали да постоји статистички значајна разлика између вредности ендотелијалне површине и врсте аденокарцинома по подтипу. Тубуларни аденокарциноми имају статистички значајно већу површину ЕА.

Резултати експресије CD31EA2 у односу на пол, старост, хистолошки тип, хистолошки градус и стадијум тумора су приказани у Табели бр. 15 и Графикону бр.23.

		CD31 EA2						
		Број	Аритметичка средина	SD	Median	Минимум	Максимум	
пол	мушки	47	4.15	1.99	3.51	.69	10.11	t=-0,946
	женски	23	4.65	2.22	4.20	1.11	9.91	p=0,347
старост	<51	10	5.2111	2.57566	4.5305	1.11	9.91	t=1.496
	51+	60	4.1669	1.94947	3.7928	.69	10.11	p=0.139
хистолошки тип	муцинозн	7	3.09	1.09	2.90	1.56	4.57	t=-2,793
	тубуларни	63	4.45	2.10	4.20	.69	10.11	*p=0,016
хистолошки градус	high	10	4.21	2.39	3.87	1.27	9.91	t=0,166
	low	60	4.33	2.02	4.01	.69	10.11	p=0,868
стадијум pT	pT2	19	4.40	2.02	4.20	1.42	8.10	t=0,216
	pT3	51	4.28	2.09	3.82	.69	10.11	p=0,829
Astler Coller	Б1	17	4.47	2.13	4.55	1.42	8.10	Rho=0,064
	Б2	16	3.70	1.72	3.29	.69	6.31	
	Ц1	1	4.20	.	4.20	4.20	4.20	p=0,600
	Ц2	29	4.42	2.36	3.82	1.11	10.11	
	Д	7	4.92	1.32	4.63	2.99	7.12	

Табела бр.15 Резултати експресије CD31EA2 у односу на пол, хистолошки тип, хистолошки градус и стадијум тумора



Графикон бр.23. Експресија CD31 са места највеће густине васкулатуре у односу на хистолошки тип тумора (CD31 EA2)

Резултати експресије CD31 EA2 у односу на метастазе у лимфним чворовима, у јетри, лиматичку, венску и перинеуралну инвазију, количину дезмоплазије и инфламаторног инфилтрата, као и начин ширења тумора су приказани у Табели бр.16.

		CD31 EA2						
		Број	Аритметичка средина	SD	Median	Минимум	Максимум	
лимфатичка инвазија	не	29	4.16	1.84	3.79	1.42	8.10	t=0,525
	да	41	4.43	2.22	4.32	.69	10.11	p=0,602
венска инвазија	не	51	4.15	2.00	3.79	.69	8.10	Z=-0,852
	да	19	4.75	2.22	4.32	2.12	10.11	p=0,394
перинеурална инвазија	не	34	4.07	1.99	3.45	.69	8.10	t=0,969
	да	36	4.55	2.13	4.38	1.11	10.11	p=0,336
дезмоплазија	оскудна	17	4.40	1.93	4.55	1.42	8.10	Rho=0,04
	умерна	31	4.04	2.12	3.40	.69	9.91	2
	изражна	22	4.64	2.11	4.45	1.11	10.11	p=0,731
инфламаторни инфилтрат	оскудан	50	4.26	2.13	3.77	.69	10.11	Rho=0,06
	умерен	13	4.79	2.00	4.55	1.56	8.10	4
	изражен	7	3.83	1.75	4.57	1.42	6.49	p=0,597
начин ширења	експанзиван	20	4.56	1.93	4.38	1.42	8.10	Z=-0,923
	инфилтративан	50	4.22	2.12	3.77	.69	10.11	p=0,356
метастазе у лимфним чворовима	не	33	4.10	1.95	3.51	.69	8.10	t=0,061
	да	37	4.51	2.16	4.32	1.11	10.11	p=0,952
метастазе у јетри	не	63	4.25	2.12	3.79	.69	10.11	t=0,816
	да	7	4.92	1.32	4.63	2.99	7.12	p=0,417

Табела бр. 16 Резултати експресије CD31 EA2 у односу на у односу лимфатичку, венску и перинеуралну инвазију, дезмоплазију, инфламаторни инфилтрат, начин ширења тумора и метастазе у лимфним чворовима и јетри

Ц. Резултати мерења ендотелијалне површине тј. „*endothelial area*“ (ЕА) са места изабраних методом случајног избора -CD31 ЕА3 су показали да постоји статистички значајна повезаност између вредности CD31 ЕА3 и присуства венске инвазије. Тумори са присутном венском инвазијом имају већу количину ЕА.

Резултати експресије CD31ЕА3 у односу на пол, старост, хистолошки тип, хистолошки градус и стадијум тумора су приказани у Табели бр.17.

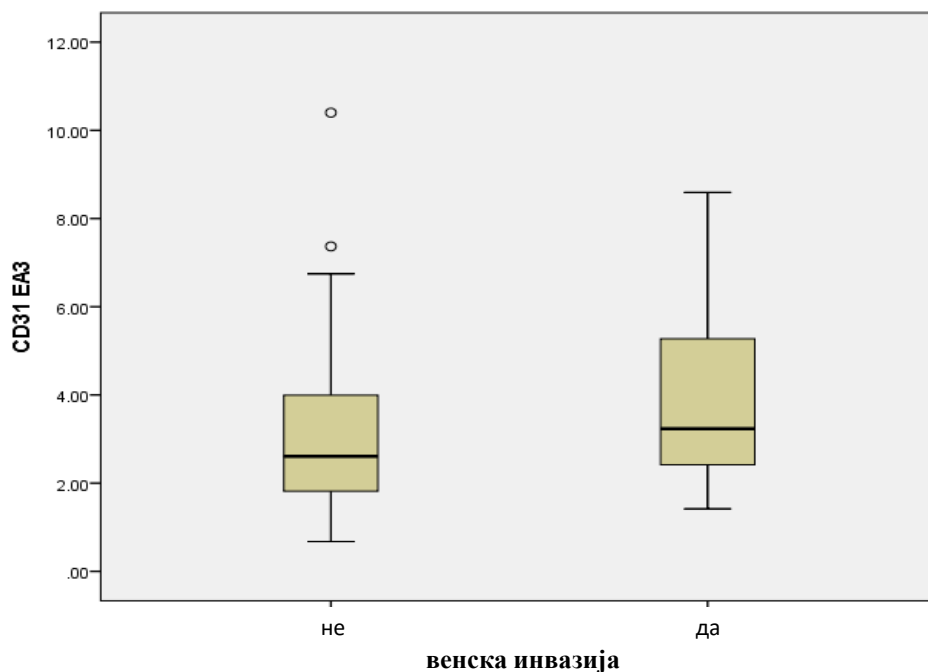
		CD31 ЕА3						
		Број	Аритметичка средина	SD	Median	Минимум	Максимум	
пол	мушки	47	3.44	2.10	2.71	.68	10.40	Z=-0,731
	женски	23	2.99	1.81	2.77	.89	7.37	p=0,464
старост	<51	10	3.3424	2.08035	2.7787	1.00	7.09	Z=-0.117
	51+	60	3.2811	2.01010	2.7260	.68	10.40	p=0.946
хистолошки тип	муцинозн	7	3.01	1.12	2.74	1.48	5.00	Z=-0,127
	тубуларни	63	3.32	2.08	2.71	.68	10.40	p=0,899
хистолошки градус	high	10	3.38	1.96	2.96	1.19	7.09	Z=-0,470
	low	60	3.28	2.03	2.68	.68	10.40	p=0,638
стадијум pT	pT2	19	2.65	1.19	2.43	.89	5.75	Z=-1,288
	pT3	51	3.53	2.20	2.88	.68	10.40	p=0,198
Astler Coller	Б1	17	2.71	1.24	2.44	.89	5.75	Rho=0,21 4
	Б2	16	2.78	1.50	2.70	.68	5.89	
	Ц1	1	2.43	.	2.43	2.43	2.43	p=0,075
	Ц2	29	3.85	2.59	3.03	1.00	10.40	
	Д	7	3.68	1.26	3.24	2.55	6.28	

Табела бр.17 Резултати експресије CD31ЕА3 у односу на пол, хистолошки тип, хистолошки градус и стадијум тумора

Резултати експресије CD31EA3 у односу на метастазе у лимфним чворовима, у јетри, лимфатичку, венску и перинеуралну инвазију, количину дезмоплазије и инфламаторног инфилтрата, као и начин ширења тумора су приказани у Табели бр.18 ., као и Графикону бр.24.

		CD31 EA3						
		Број	Аритметичка средина	SD	Median	Минимум	Максимум	
лимфатичка инвазија	не	29	2.88	1.27	2.69	.89	5.89	Z=-0,662
	да	41	3.58	2.36	2.99	.68	10.40	p=0,508
венска инвазија	не	51	3.03	1.91	2.61	.68	10.40	Z=-2,001
	да	19	3.99	2.14	3.24	1.42	8.59	*p=0,045
перинеурална инвазија	не	34	2.99	1.84	2.44	.68	10.40	t=1,201
	да	36	3.57	2.14	3.01	.75	8.59	p=0,234
дезмоплазија	оскудна	17	2.49	.97	2.43	.89	4.93	Rho=0,185 p=0,125
	умерна	31	3.49	2.27	2.77	1.19	10.40	
	изражна	22	3.62	2.10	3.14	.68	7.39	
инфламаторни инфилтрат	оскудан	50	3.59	2.24	2.94	.68	10.40	Rho=- 0,183 p=0,129
	умерен	13	2.70	1.01	2.65	.89	4.93	
	изражен	7	2.22	.63	2.08	1.19	3.04	
начин ширења	ekspanzivno	20	2.76	1.33	2.40	.89	5.75	Z=-1,170
	infiltrativno	50	3.50	2.19	2.86	.68	10.40	p=0,242
метастазе у лимфним чворовима	не	33	2.74	1.36	2.65	.68	5.89	Z=-1,618
	да	37	3.78	2.36	3.03	1.00	10.40	p=0,106
метастазе у јетри	не	63	3.25	2.07	2.65	.68	10.40	Z=-1,380
	да	7	3.68	1.26	3.24	2.55	6.28	p=0,168

Табела бр. 18.Резултати експресије CD31EA3 у односу на у односу лимфатичку, венску и перинеуралну инвазију, дезмоплазију, инфламаторни инфилтрат, начин ширења тумора и метастазе у лимфним чворовима и јетри



Графикон бр.24. Експресија CD31 EA3 у односу на присуство венске инвазије

5.4.2 Резултати мерења вредности броја васкуларних простора

Резултати мерења вредности броја васкуларних простора све три испитиване зоне тумора (CD31 Б1, CD31 Б2, CD31 Б3) нису показале статистички значајну разлику на са једним испитиваним параметром тумора.

А. Резултати мерења броја васкуларних простора са инвазивног фронта тумора-CD31 Б1 у односу на пол, старост, хистолошки тип, хистолошки градус и стадијум тумора су приказани у Табели бр.19.

		CD31 B1						
		Број	Аритметичка средина	SD	Median	Минимум	Максимум	
пол	мушки	47	147.19	65.82	140.00	51.00	328.00	Z=-0,963
	женски	23	135.57	68.35	128.00	42.00	338.00	p=0,335
старост	<51	10	121.5000	46.13567	118.0000	52.00	203.00	t=-1.127
	51+	60	147.0167	68.81380	135.5000	42.00	338.00	p=0,264
хистолошки тип	муцинозни	7	118.29	65.18	96.00	51.00	240.00	Z=-1,106
	тубуларни	63	146.16	66.45	135.00	42.00	338.00	p=0,269
хистолошки градус	high	10	131.30	58.32	124.00	54.00	231.00	t=0,618
	low	60	145.38	67.87	135.00	42.00	338.00	p=0,538
стадијум pT	pT2	19	146.16	71.19	136.00	56.00	287.00	Z=0,172
	pT3	51	142.33	65.22	132.00	42.00	338.00	p=0,864
Astler Collier	B1	17	150.06	72.92	136.00	56.00	287.00	Rho=- 0,103
	B2	16	141.25	34.87	133.50	90.00	210.00	
	Ц1	1	70.00	.	70.00	70.00	70.00	p=0,395
	Ц2	29	151.69	74.92	136.00	42.00	338.00	
	Д	7	108.00	66.66	94.00	51.00	232.00	

Табела бр. 19 Резултати мерења CD31 B1 у односу на пол, старост, хистолошки тип, хистолошки градус и стадијум тумора

Резултати мерења CD31 B1 у односу на метастазе у лимфним чворовима, у јетри, лимфатичку, венску и перинеуралну инвазију, количину дезмоплазије и инфламаторног инфилтрата, као и начин ширења тумора су приказани у Табели бр.20.

		CD31 Б1						
		Број	Аритметичка средина	SD	Median	Минимум	Максимум	
лимфатичка инвазија	не	29	139.38	61.97	135.00	56.00	287.00	t=0,421
	да	41	146.20	69.97	136.00	42.00	338.00	p=0,675
венска инвазија	не	51	148.59	64.43	136.00	42.00	338.00	t=-1,078
	да	19	129.37	71.29	116.00	51.00	328.00	p=0,285
перинеурална инвазија	не	34	141.38	62.79	135.50	42.00	287.00	t=0,242
	да	36	145.25	70.46	132.00	51.00	338.00	p=0,810
дезмоплазија	оскудна	17	143.18	63.83	136.00	56.00	287.00	Rho=- 0,020
	умерна	31	141.19	60.98	132.00	42.00	287.00	
	изражна	22	146.59	77.76	132.50	51.00	338.00	p=0,869
инфламаторни инфилтрат	оскудан	50	142.00	63.11	130.50	42.00	338.00	Rho=0,03 6
	умерен	13	142.54	74.54	152.00	56.00	287.00	
	изражен	7	154.71	82.97	136.00	54.00	287.00	p=0,770
начин ширења	експанзиван	20	143.40	72.37	135.50	51.00	287.00	t=0,002
	инфилтративан	50	143.36	64.62	133.50	42.00	338.00	p=0,998
метастазе у лимфним чворовима	не	33	145.79	56.99	135.00	56.00	287.00	t=-0,286
	да	37	141.22	74.50	128.00	42.00	338.00	p=0,776
метастазе у јетри	не	63	147.30	65.71	136.00	42.00	338.00	Z=-1,655
	да	7	108.00	66.66	94.00	51.00	232.00	p=0,098

Табела бр.20. Резултати мерења CD31 Б1 у односу на у односу лиматичку, венску и перинеуралну инвазију, дезмоплазију, инфламаторни инфилтрат, начин ширења тумора и метастазе у лимфним чворовима и јетри

Б.Резултати мерења броја васкуларних простора са места највеће густине васкулатуре (“hot spots”)- CD31 Б2 у односу на пол, старост, хистолошки тип, хистолошки градус и стадијум тумора су приказани у Табели бр.21.

		CD31 Б2						
		Број	Аритметичка средина	SD	Median	Минимум	Максимум	
пол	мушки	47	192.53	83.35	204.00	54.00	396.00	Z=-1,257
	женски	23	169.30	84.48	148.00	56.00	376.00	p=0,209
старост	<51	10	155.700	55.84313	151.500	57.00	232.00	t=-1.193
	51+	60	189.766	87.03562	178.000	54.00	396.00	p=0.237
хистолошки тип	муцинозн	7	137.29	67.77	110.00	71.00	250.00	Z=-1,625
	тубуларни	63	190.19	84.22	180.00	54.00	396.00	p=0,104
хистолошки градус	high	10	174.80	92.50	154.00	54.00	376.00	t=0,409
	low	60	186.58	83.03	180.00	56.00	396.00	p=0,684
стадијум pT	pT2	19	181.53	81.38	168.00	68.00	321.00	t=-0,204
	pT3	51	186.16	85.49	176.00	54.00	396.00	p=0,839
Astler Coller	Б1	17	178.00	85.28	144.00	68.00	321.00	
	Б2	16	189.31	55.17	193.00	107.00	276.00	Rho=-0,047
	Ц1	1	191.00	.	191.00	191.00	191.00	p=0,696
	Ц2	29	197.52	97.65	186.00	56.00	396.00	
	Д	7	138.43	76.42	136.00	54.00	268.00	

Табела бр.21 Резултати мерења CD31 Б2 у односу на пол, старост ,хистолошки тип, хистолошки градус и стадијум тумора

Резултати мерења CD31 Б2 у односу на метастазе у лимфним чворовима, у јетри, лимфатичку, венску и перинеуралну инвазију, количину дезмоплазије и инфламаторног инфилтрата, као и начин ширења тумора су приказани у Табели бр.22.

		CD31 Б2						
		Број	Аритметичка средина	SD	Median	Минимум	Максимум	
лимфатичка инвазија	не	29	177.21	73.27	168.00	68.00	321.00	t=0,643
	да	41	190.34	91.06	186.00	54.00	396.00	p=0,522
венска инвазија	не	51	190.80	81.34	180.00	56.00	396.00	t=-0,965
	да	19	169.05	90.56	148.00	54.00	376.00	p=0,338
перинеурална инвазија	не	34	178.15	76.44	161.50	56.00	321.00	t=0,652
	да	36	191.28	90.89	181.00	54.00	396.00	p=0,516
дезмоплазија	оскудна	17	182.59	71.19	168.00	91.00	302.00	Rho=0,0 93
	умерна	31	172.52	85.44	152.00	54.00	396.00	
	изражна	22	204.14	90.46	201.00	57.00	376.00	p=0,445
инфламаторни инфилтрат	оскудан	50	185.04	84.85	174.00	56.00	396.00	Rho=0,0 22
	умерен	13	174.92	76.00	168.00	82.00	321.00	
	изражен	7	202.43	99.49	219.00	54.00	302.00	p=0,854
начин ширења	експанзиван	20	170.10	78.92	146.00	68.00	321.00	Z=-0,865
	инфилтративан	50	190.82	85.77	180.00	54.00	396.00	p=0,387
метастазе у лимфним чворовима	не	33	183.48	71.39	168.00	68.00	321.00	t=0,132
	да	37	186.16	94.54	176.00	54.00	396.00	p=0,895
метастазе у јетри	не	63	190.06	83.58	180.00	56.00	396.00	t=-1,562
	да	7	138.43	76.42	136.00	54.00	268.00	p=0,123

Табела бр. 22 Резултати мерења CD31 Б2 у односу на у односу лиматичку, венску и перинеуралну инвазију, дезмоплазију, инфламаторни инфилтрат, начин ширења тумора и метастазе у лимфним чворовима и јетри

Ц. Резултати мерења броја васкуларних простора простора са места изабраних методом случајног избора- CD31 Б3 у односу на пол, старост, хистолошки тип, хистолошки градус и стадијум тумора су приказани у Табели бр.23.

		CD31 Б3						
		Број	Аритметичка средина	SD	Median	Минимум	Максимум	
пол	мушки	47	138.09	61.28	138.00	46.00	296.00	t=0,803
	женски	23	126.13	52.12	124.00	52.00	256.00	p=0,425
старост	<51	10	137.2000	64.84820	153.0000	52.00	216.00	Z=-0,285
	51+	60	133.6500	57.74985	128.0000	46.00	296.00	p=0,775
хистолошки тип	муцинозн	7	116.14	54.35	92.00	69.00	213.00	Z=-0,871
	тубуларни	63	136.16	58.82	132.00	46.00	296.00	p=0,384
хистолошки градус	high	10	137.80	61.17	138.00	46.00	210.00	Z=-0,269
	low	60	133.55	58.35	132.00	52.00	296.00	p=0,788
стадијум pT	pT2	19	123.58	54.32	132.00	52.00	240.00	t=-0,925
	pT3	51	138.10	59.78	132.00	46.00	296.00	p=0,358
Astler Coller	Б1	17	118.35	52.50	132.00	52.00	240.00	Rho=- 0,001
	Б2	16	150.38	42.39	154.00	89.00	216.00	
	Ц1	1	120.00	.	120.00	120.00	120.00	p=0,997
	Ц2	29	140.00	67.16	124.00	52.00	296.00	
	Д	7	113.29	64.17	106.00	46.00	224.00	

Табела бр.23. Резултати мерења CD31 Б3 у односу на пол, старост, хистолошки тип, хистолошки градус и стадијум тумора

Резултати мерења броја васкуларних простора простора са места изабраних методом случајног избора- CD31 Б3 у односу на метастазе у лимфним чворовима, у јетри, лимфатичку, венску и перинеуралну инвазију, количину дезмоплазије и инфламаторног инфилтрата, као и начин ширења тумора су приказани у Табели бр.24.

		CD31 Б3						
		Број	Аритметичка средина	SD	Median	Минимум	Максимум	
лимфатичка	не	29	129.55	50.06	132.00	52.00	240.00	t=0,553
инвазија	да	41	137.41	63.93	124.00	46.00	296.00	p=0,582
венска	не	51	136.45	54.66	132.00	52.00	256.00	t=-0,536
инвазија	да	19	128.00	68.45	116.00	46.00	296.00	p=0,593
перинеурална	не	34	127.38	52.31	132.00	52.00	240.00	t=0,944
инвазија	да	36	140.56	63.56	128.00	46.00	296.00	p=0,349
дезмоплазија	оскудна	17	132.24	52.93	138.00	52.00	240.00	Rho=0,081 p=0,506
	умерна	31	125.35	52.20	117.00	46.00	247.00	
	изражна	22	148.05	69.50	158.00	52.00	296.00	
инфламаторни инфилтрат	оскудан	50	137.10	58.19	128.00	52.00	296.00	Rho=- 0,091 p=0,453
	умерен	13	134.69	62.78	132.00	52.00	240.00	
	изражен	7	112.14	54.28	132.00	46.00	184.00	
начин ширења	експанзиван	20	118.65	53.96	113.00	52.00	240.00	t=-1,417
	инфилтративан	50	140.36	59.36	136.50	46.00	296.00	p=161
метастазе у лимфним чворовима	не	33	133.88	49.84	138.00	52.00	240.00	t=0,037
	да	37	134.41	65.66	120.00	46.00	296.00	p=0,970
метастазе у јетри	не	63	136.48	57.73	132.00	52.00	296.00	t=-0,998
	да	7	113.29	64.17	106.00	46.00	224.00	p=0,322

Табела бр.24.Резултати мерења CD31 Б3 у односу на у односу лимфатичку, венску и перинеуралну инвазију, дезмоплазију, инфламаторни инфилтрат, начин ширења тумора и метастазе у лимфним чворовима и јетри

5.4.3. Резултати мерења вредности обима васкуларних простора

Резултати мерења вредности обима све три испитиване зоне тумора (CD31 O1, CD31 O2, CD31 O3) нису показале статистички значајну разлику на са једним испитиваним параметром тумора:

А. Резултати мерења обима васкуларних простора простора са инвазивног фронта тумора CD31 O1 у односу на пол, старост, хистолошки тип, хистолошки градус и стадијум тумора су приказани у Табели бр.25

		CD31 O1						
		Број	Аритметичка средина	SD	Median	Минимум	Максимум	
пол	мушки	47	200.14	176.00	146.72	28.72	822.27	Z=-0,294
	женски	23	206.76	228.58	103.05	31.21	1,021.32	p=0,769
старост	<51	10	135.6546	132.33600	96.9235	30.14	473.35	Z=-1.343
	51+	60	213.4244	200.23805	146.3830	28.72	1021.32	p=0.179
хистолошки тип	муцинозни	7	189.68	153.83	146.82	28.92	489.04	Z=-0,088
	тубуларни	63	203.72	198.05	132.71	28.72	1,021.32	p=0,930
хистолошки градус	high	10	186.98	166.61	126.06	31.80	543.37	Z=-0,050
	low	60	204.87	198.41	140.48	28.72	1,021.32	p=0,960
стадијум pT	pT2	19	264.13	220.48	203.18	31.21	822.27	Z=-1,539
	pT3	51	179.29	178.91	118.93	28.72	1,021.32	p=0,124
Astler Coller	B1	17	271.79	232.56	203.18	31.21	822.27	
	B2	16	224.70	251.24	133.82	40.52	1,021.32	Rho=-0,154
	Ц1	1	208.18	.	208.18	208.18	208.18	p=0,202
	Ц2	29	151.30	122.31	102.90	28.72	495.72	
	D	7	192.94	172.14	143.07	31.80	543.37	

Табела бр.25 Резултати мерења CD31 O1 у односу на пол, старост хистолошки тип, хистолошки градус и стадијум тумора .

Резултати мерења обима васкуларних простора простора са инвазивног фронта тумора- CD31 O1 у односу на метастазе у лимфним чворовима, у јетри, лимфатичку, венску и перинеуралну инвазију, количину дезмоплазије и инфламаторног инфилтрата, као и начин ширења тумора су приказани у Табели бр.26.

		CD31 O1						
		Број	Аритметичка средина	SD	Median	Минимум	Максимум	
лимфатичка инвазија	не	29	255.26	246.43	175.92	31.21	1,021.32	Z=-1,282
	да	41	164.87	135.64	118.81	28.72	543.37	p=0,200
венска инвазија	не	51	223.57	207.23	159.78	30.14	1,021.32	Z=-1,578
	да	19	145.27	138.03	90.79	28.72	543.37	p=0,115
перинеурална инвазија	не	34	254.32	235.71	180.65	30.14	1,021.32	Z=-1,622
	да	36	153.19	126.81	113.93	28.72	543.37	p=0,105
дезмоплазија	оскудна	17	267.99	232.34	189.83	31.21	822.27	Rho=-0,143 p=0,238
	умерна	31	178.10	185.26	143.07	28.72	1,021.32	
	изражна	22	185.69	166.78	123.25	28.92	543.37	
инфламаторни инфилтрат	оскудан	50	181.16	180.27	118.87	28.72	1,021.32	Rho=0,164 p=0,176
	умерен	13	238.98	191.39	189.83	31.80	630.80	
	изражен	7	285.28	275.42	173.31	31.21	822.27	
начин ширења	експанзиван	20	200.57	147.27	181.57	31.21	501.17	Z=-0,494
	инфилтративан	50	203.01	210.10	130.20	28.72	1,021.32	p=0,621
метастазе у лимфним чворовима	не	33	248.96	239.17	159.78	31.21	1,021.32	Z=-1,265
	да	37	160.71	130.04	118.81	28.72	543.37	p=0,206
метастазе у јетри	не	63	203.36	196.61	134.93	28.72	1,021.32	Z=-0,069
	да	7	192.94	172.14	143.07	31.80	543.37	p=0,945

Табела бр.26 Резултати мерења CD31 O1 у односу на у односу лиматичку, венску и перинеуралну инвазију, дезмоплазију, инфламаторни инфилтрат, начин ширења тумора и метастазе у лимфним чворовима и јетри

Б. Резултати мерења обима васкуларних простора са места највеће густине васкулатуре (“hot spots”) CD31 O2 у односу на пол, старост, хистолошки тип, хистолошки градус и стадијум тумора су приказани у Табели бр.27

		CD31 O2						
		Број	Аритметичка средина	SD	Median	Минимум	Максимум	
пол	мушки	47	208.72	196.23	158.01	26.39	908.59	Z=-0,269
	женски	23	233.13	288.38	167.20	42.87	1,338.09	p=0,793
старост	<51	10	135.654	93.42693	145.204	33.98	356.90	Z=-0,537
	51+	60	213.424	243.05518	158.914	26.39	1338.09	p=0,591
хистолошки тип	муцинозн	7	250.47	298.53	158.01	49.93	908.59	Z=-0,127
	тубуларни	63	212.99	222.40	159.82	26.39	1,338.09	p=0,899
хистолошки градус	high	10	167.45	95.78	145.48	60.52	356.90	Z=-0,025
	low	60	224.96	243.53	158.91	26.39	1,338.09	p=0,980
стадијум pT	pT2	19	232.12	252.31	138.61	29.21	908.59	Z=-0,007
	pT3	51	211.01	221.72	159.82	26.39	1,338.09	p=0,995
Astler Coller	Б1	17	241.99	265.01	138.61	29.21	908.59	Rho=- 0,124
	Б2	16	332.35	342.03	203.75	26.39	1,338.09	
	Ц1	1	205.04	.	205.04	205.04	205.04	p=0,306
	Ц2	29	156.55	112.29	127.07	33.80	457.77	
	Д	7	142.24	40.40	125.27	101.15	212.95	

Табела бр.27 Резултати мерења CD31 O2 у односу на пол, старост хистолошки тип, хистолошки градус и стадијум тумора

Резултати мерења обима васкуларних простора са места највеће густине васкулатуре (“hot spots”) ЦД31 O2 у односу на метастазе у лимфним чворовима, у

јетри, лимфатичку, венску и перинеуралну инвазију, количину дезмоплазије и инфламаторног инфилтрата, као и начин ширења тумора су приказани у Табели бр.28

		CD31 O2						
		Број	Аритметичка средина	SD	Median	Минимум	Максимум	
лимфатичка инвазија	не	29	228.54	238.99	158.01	26.39	908.59	Z=-0,125
	да	41	208.39	223.83	167.20	33.80	1,338.09	p=0,900
венска инвазија	не	51	229.25	258.41	144.02	26.39	1,338.09	Z=-0,310
	да	19	183.17	115.93	179.36	33.80	457.77	p=0,756
перинеурална инвазија	не	34	224.11	224.52	148.31	26.39	908.59	Z=-0,094
	да	36	209.78	235.61	173.28	33.80	1,338.09	p=0,925
дезмоплазија	оскудна	17	212.92	254.64	135.90	29.21	908.59	Rho=-
	умерна	31	264.90	269.14	209.90	33.80	1,338.09	0,067
	изражна	22	151.84	105.73	124.51	26.39	421.90	p=0,581
инфламат.и инфилтрат	оскудан	50	222.51	227.98	173.28	26.39	1,338.09	Rho=-
	умерен	13	206.59	217.13	138.61	68.76	908.59	0,104
	изражен	7	194.36	286.10	81.43	29.21	828.25	p=0,394
начин ширења	експанзиван	20	217.29	219.14	158.98	29.21	908.59	Z=-0,013
	инфилтратив ан	50	216.52	234.64	158.91	26.39	1,338.09	p=0,990
метастазе у лимфним чворовима	не	33	285.80	303.41	187.48	26.39	1,338.09	Z=-1,418
	да	37	155.15	100.91	127.07	33.80	457.77	p=0,156
метастазе у јетри	не	63	225.02	239.53	167.20	26.39	1,338.09	Z=-0,362
	да	7	142.24	40.40	125.27	101.15	212.95	p=0,717

Табела бр. 28 Резултати мерења CD31 O2 у односу на у односу лиматичку, венску и перинеуралну инвазију, дезмоплазију, инфламаторни инфилтрат, начин ширења тумора и метастазе у лимфним чворовима и јетри

Ц. Резултати мерења обима васкуларних простора са места изабраних методом случајног избора- CD31 O3 у односу на пол, старост, хистолошки тип, хистолошки градус и стадијум тумора су приказани у Табели бр.29

		CD31 O3						
		Број	Аритметичка средина	SD	Median	Минимум	Максимум	
пол	мушки	47	178.40	148.63	135.34	29.21	663.46	Z=-0,932
	женски	23	176.90	173.86	95.24	31.56	657.98	p=0,352
старост	<51	10	214.0881	194.63024	106.2275	31.79	482.10	Z=-0,034
	51+	60	171.8792	149.86160	121.4420	29.21	663.46	p=0,973
хистолошки тип	муцинозн	7	137.14	76.89	118.69	50.18	278.88	Z=-0,166
	тубуларни	63	182.44	162.28	124.03	29.21	663.46	p=0,868
хистолошки градус	high	10	157.21	147.45	86.32	56.27	453.40	Z=-0,470
	low	60	181.36	158.41	124.14	29.21	663.46	p=0,638
стадијум pT	pT2	19	182.92	167.83	106.96	29.21	657.98	Z=-0,324
	pT3	51	176.04	153.20	124.03	31.79	663.46	p=0,746
Astler Coller	B1	17	162.91	126.57	106.96	29.21	391.28	Rho=- 0,027
	B2	16	184.64	166.99	124.14	38.63	661.45	
	Ц1	1	657.98	.	657.98	657.98	657.98	p=0,826
	Ц2	29	181.70	160.06	118.69	31.79	663.46	
	Д	7	114.65	65.56	135.34	36.96	220.37	

Табела бр.29 Резултати мерења CD31 O3 у односу на пол, хистолошки тип, хистолошки градус и стадијум тумора

Резултати мерења обима васкуларних простора са места изабраних методом случајног избора-CD31 O3 у односу на метастазе у лимфним чворовима, у јетри, лимфатичку, венску и перинеуралну инвазију, количину дезмоплазије и инфламаторног инфилтрата, као и начин ширења тумора су приказани у Табели бр.30.

		CD31 O3						
		Број	Аритметичка средина	SD	Median	Минимум	Максимум	
лимфатичка инвазија	не	29	173.49	152.19	112.72	29.21	657.98	Z=-0,256
	да	41	181.03	160.61	132.39	31.79	663.46	p=0,798
венска инвазија	не	51	182.39	149.28	132.39	29.21	661.45	Z=-1,208
	да	19	165.87	176.89	78.79	31.79	663.46	p=0,227
перинеурална инвазија	не	34	193.44	164.06	135.26	29.21	661.45	Z=-0,934
	да	36	163.24	149.01	109.12	31.79	663.46	p=0,335
дезмоплазија	оскудна	17	168.88	171.19	95.72	29.21	657.98	Rho=0,067
	умерна	31	181.11	157.17	124.03	31.79	663.46	p=0,582
	изражна	22	180.38	149.52	133.86	36.96	482.10	
инфламаторни инфилтрат	оскудан	50	179.45	154.42	121.44	31.79	663.46	Rho=-0,091
	умерен	13	201.75	180.95	148.58	40.63	657.98	p=0,454
	изражен	7	122.59	123.16	78.67	29.21	373.22	
начин ширења	експанзиван	20	174.87	164.00	115.61	29.21	657.98	Z=-0,507
	инфилтративан	50	179.13	154.52	121.44	36.96	663.46	p=0,612
метастазе у лимфним чворовима	не	33	173.45	145.62	124.03	29.21	661.45	Z=-0,006
	да	37	181.89	166.79	118.86	31.79	663.46	p=0,995
метастазе у јетри	не	63	184.94	161.86	118.86	29.21	663.46	Z=-0,793
	да	7	114.65	65.56	135.34	36.96	220.37	p=0,428

Табела бр.30. Резултати мерења CD31 O3 у односу на у односу лиматичку, венску и перинеуралну инвазију, дезмоплазију, инфламаторни инфилтрат, начин ширења тумора и метастазе у лимфним чворовима и јетри

5.5. Граничне вредности (cut off) у прогресији ректалног аденокарцинома

5.5.1. Граничне (cut off) у односу на метастазе у лимфним чворовима

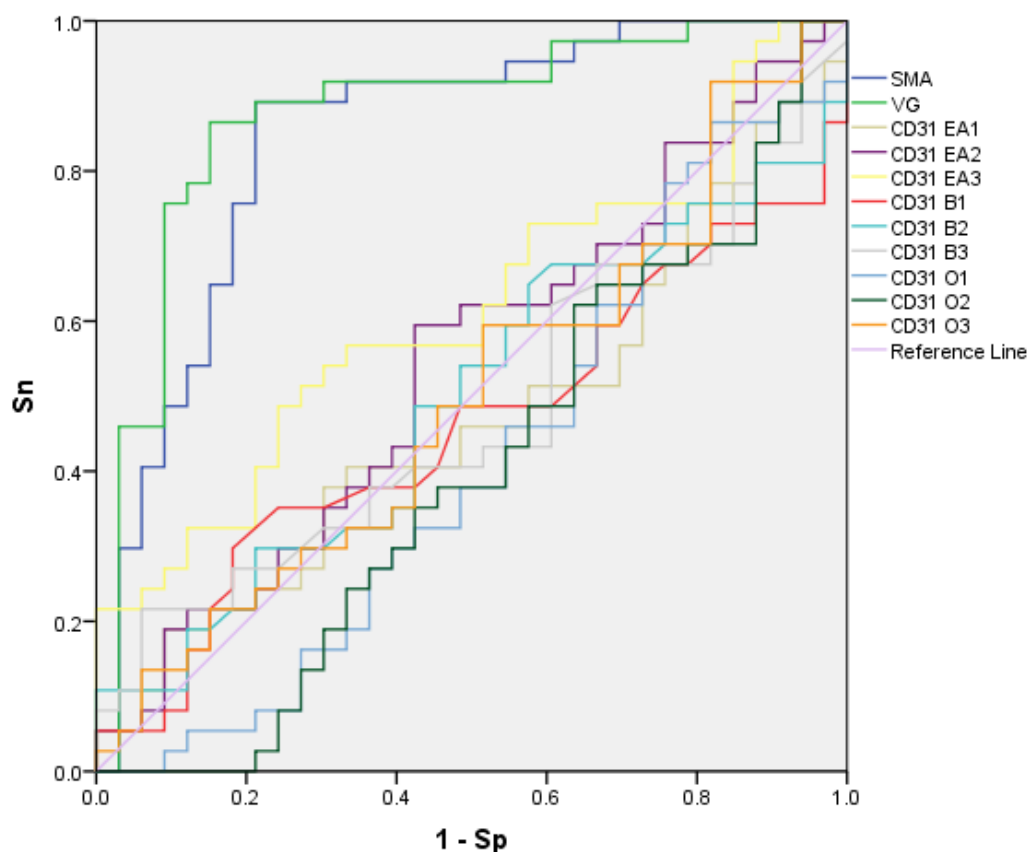
Уврђено је да од просечних вредности испитиваних параметара строме које могу указати на присуство метастазе у лимфним чворовима су количина миофибробласта (експресија SMA), као и количина дезмоплазије (VG).

За вредности количине миофибробласта (SMA) веће од 5,65 са сензитивноћу од 89,19% у распону од 74,6 до 96,9, са специфичношћу од 78,79%, у распону од 61,1 до 91,0 можемо тврдити да постоји метастаза у лимфним чворовима.

За вредности количине дезмоплазије (VG) веће од 8,89, са сензитивноћу од 86,49% у распону од 71,2 до 95,4, са специфичношћу од 84,85%, у распону од 68,1 до 94,8 можемо тврдити да постоји метастаза у лимфним чворовима а, што је приказано у Табели бр.31. и Графикону бр.25..

испитивана варијабла	површина	SE	р вредност	95% интервал поверења за површину	
				доњи	горњи
SMA	.846	.049	<0.001	.750	.942
VG	.876	.045	<0.001	.787	.964
CD31 EA1	.468	.070	.642	.331	.604
CD31 EA2	.541	.070	.560	.404	.677
CD31 EA3	.613	.068	.106	.480	.745
CD31 B1	.458	.070	.548	.322	.595
CD31 B2	.493	.070	.920	.356	.630
CD31 B3	.480	.070	.769	.342	.617
CD31 O1	.412	.069	.206	.277	.547
CD31 O2	.401	.069	.156	.267	.536
CD31 O3	.500	.070	.995	.363	.637

Табела бр. 31 Просечне вредности испитиваних параметара строме које могу указати на присуство метастаза у лимфним чворовима



Графикон бр.25. ROC крива одређује граничну (cut off) вредност миофибробласта и дезмоплазије у односу на присуство метастазе у лимфним нодусима.

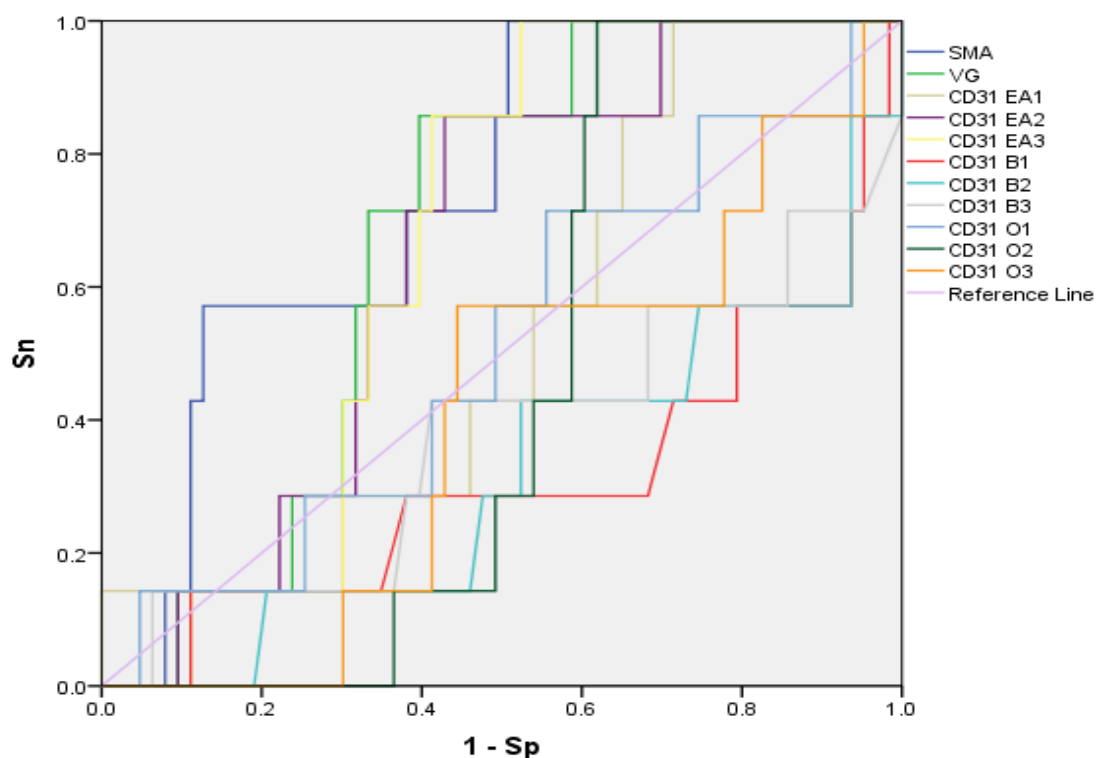
5.5.2. Граничне (cut off) у односу на метастазе у јетри

Утврђено је да од просечних вредности испитиваних параметара строге које могу указати на присуство метастазе у јетри једино статистички значајна вредност количине миофибробласта (експресија SMA).

За вредности количине миофибробласта (на основу експресије SMA) веће од 5,71 са сензитивноћу од 100% у распону од 58,9 до 100,0, а са специфичношћу од 49,2%, у распону од 36,4 до 62,1 можемо тврдити да постоји метастаза у јетри, што је приказано у Табели бр.32 и Графикону бр.26.

испитивана варијабла	површина	SE	p вредност	95% интервал поверења за површину	
				доњи	горњи
SMA	.741	.079	.037	.586	.897
VG	.676	.072	.129	.535	.817
CD31 EA1	.531	.098	.792	.338	.724
CD31 EA2	.646	.081	.207	.487	.805
CD31 EA3	.660	.068	.168	.526	.794
CD31 B1	.308	.121	.098	.072	.545
CD31 B2	.314	.110	.108	.098	.530
CD31 B3	.378	.128	.290	.127	.628
CD31 O1	.508	.112	.945	.289	.727
CD31 O2	.458	.066	.717	.329	.587
CD31 O3	.408	.099	.428	.214	.602

Табела бр. 31. Просечне вредности испитиваних параметара строме које могу указати на присуство метастазе у јетри



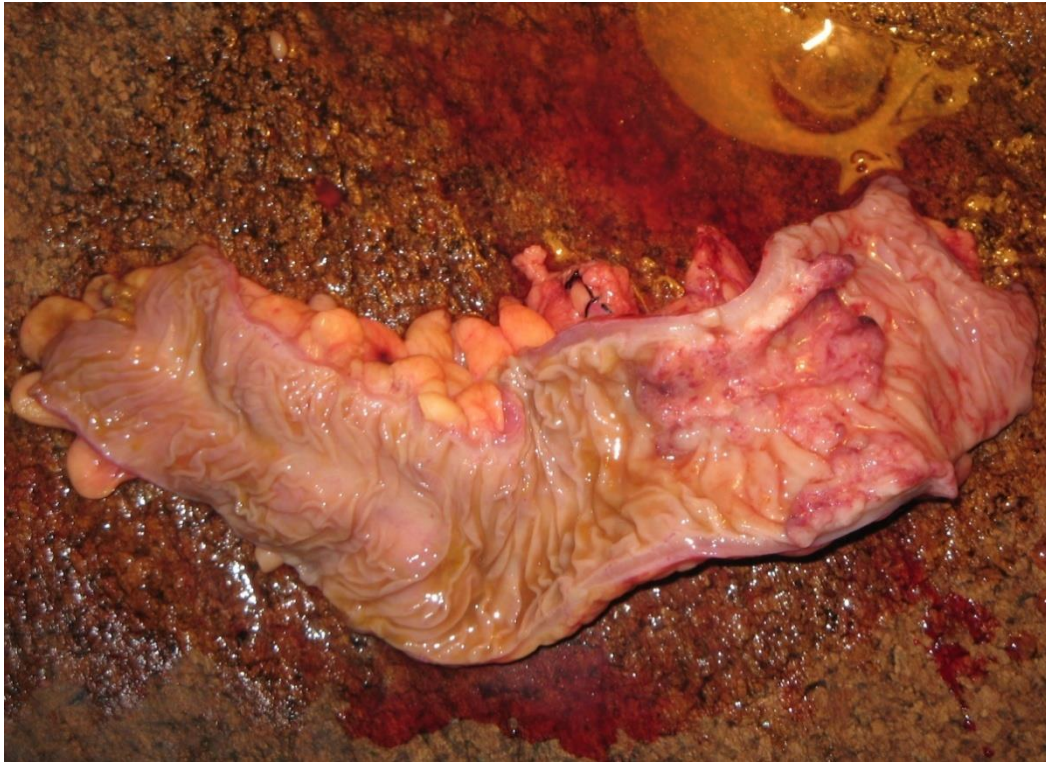
Графикон бр.26. ROC крива одређује граничну (cut off) вредност миофибробласта у односу на присуство метастазе у јетри



Слика бр.7. Макроскопски изглед: полиподи аденокарцином



Слика бр.8. Макроскопски изглед: егзофитични аденокарцином



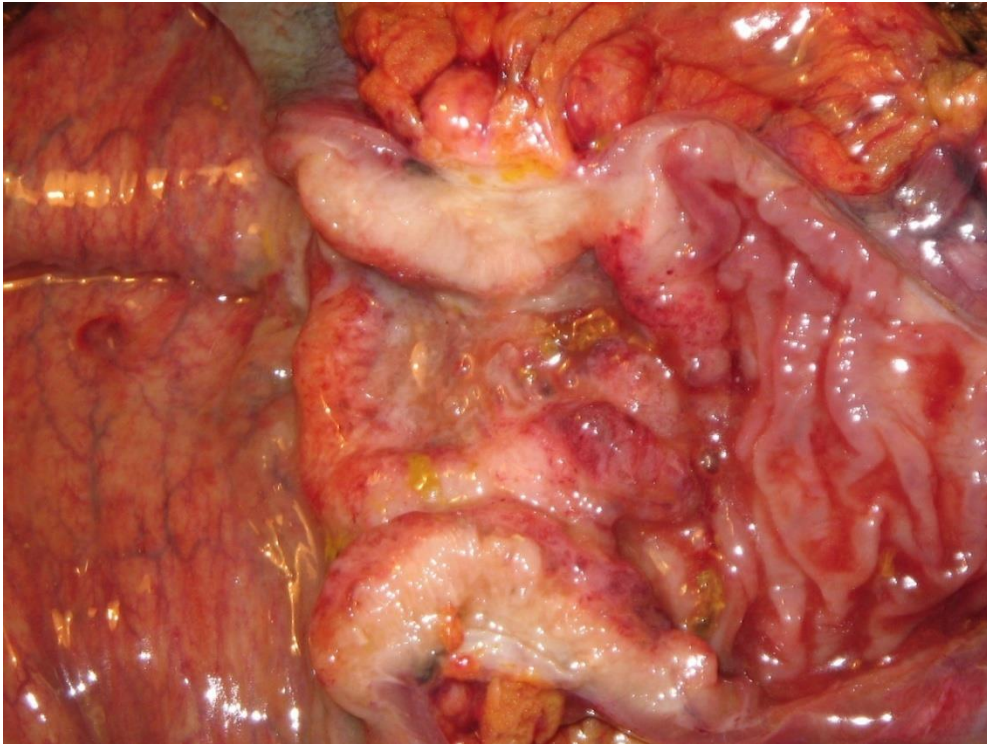
Слика бр.9. Макроскопски изглед: стенозирајући аденокарцином



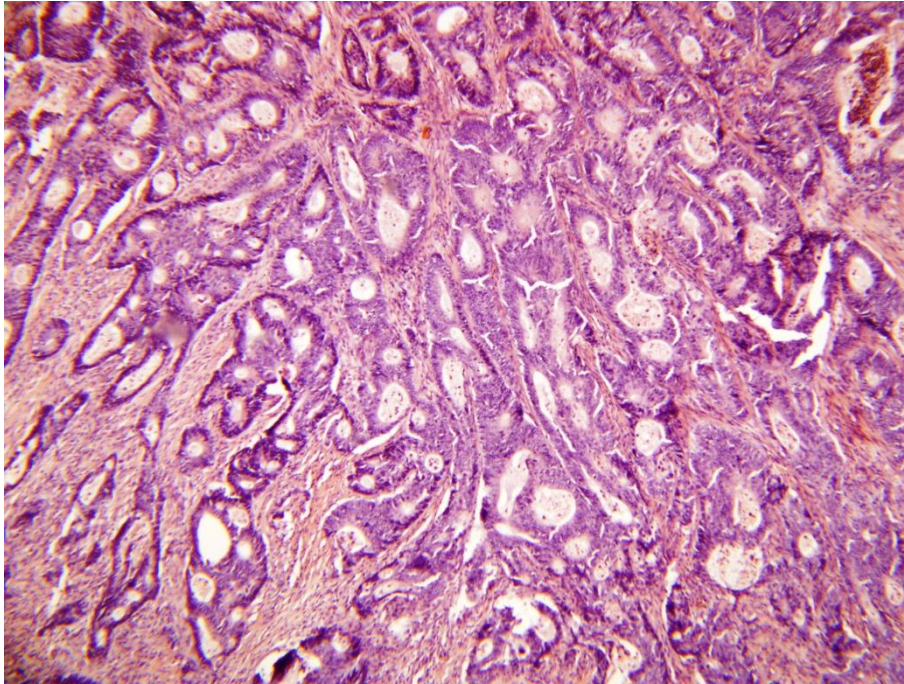
Слика бр.10. Макроскопски изглед: улцерозни аденокарцином



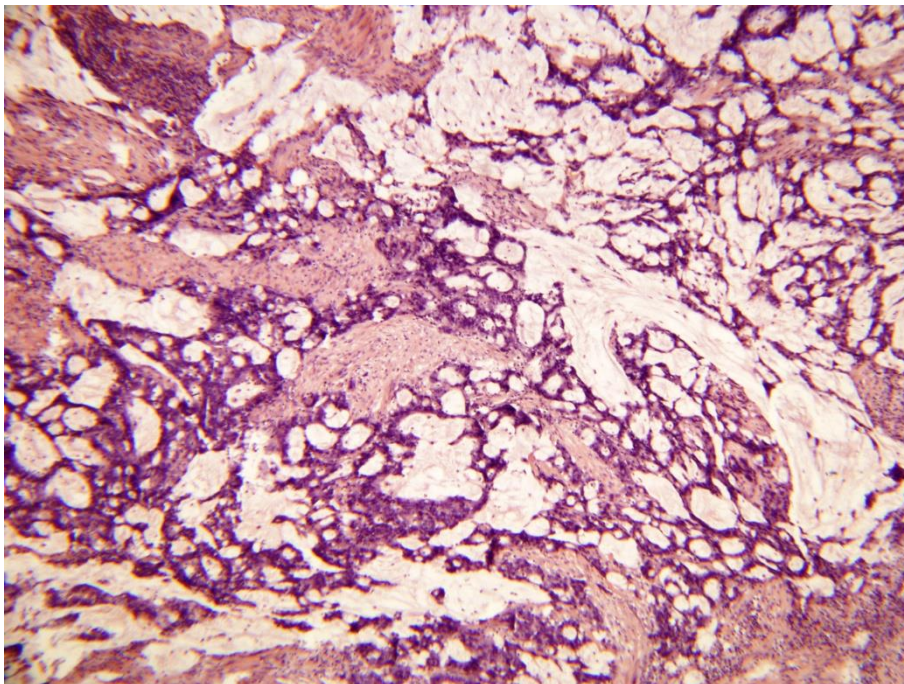
Слика бр.11. Макроскопски изглед: мали аденокарцином (величина 1-2цм)



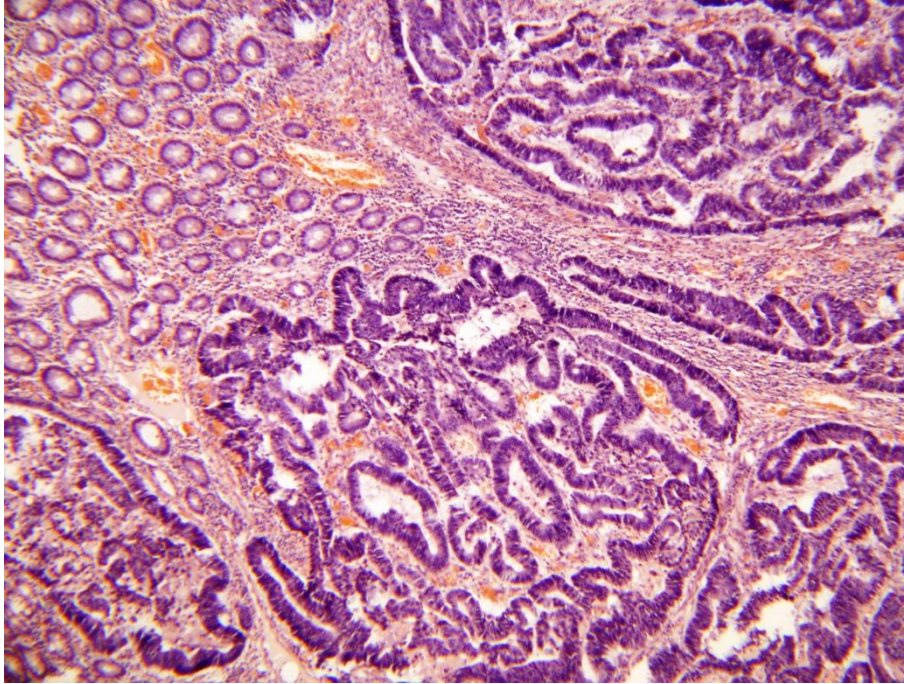
Слика бр.12. Макроскопски изглед пресека аденокарцинома ректума



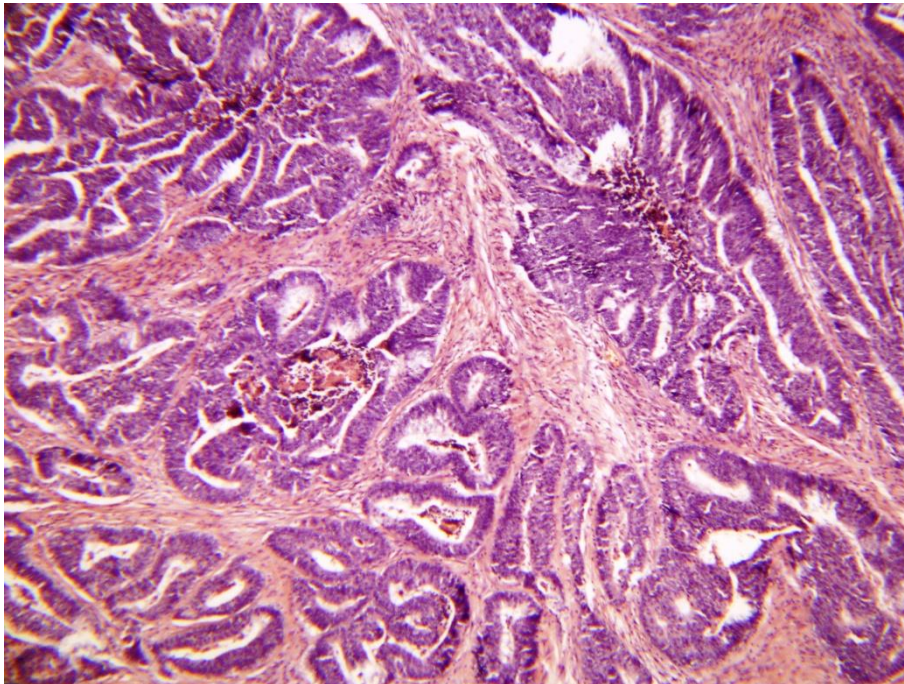
Слика бр.13. Тубуларни аденокарцином (увећање 10x)



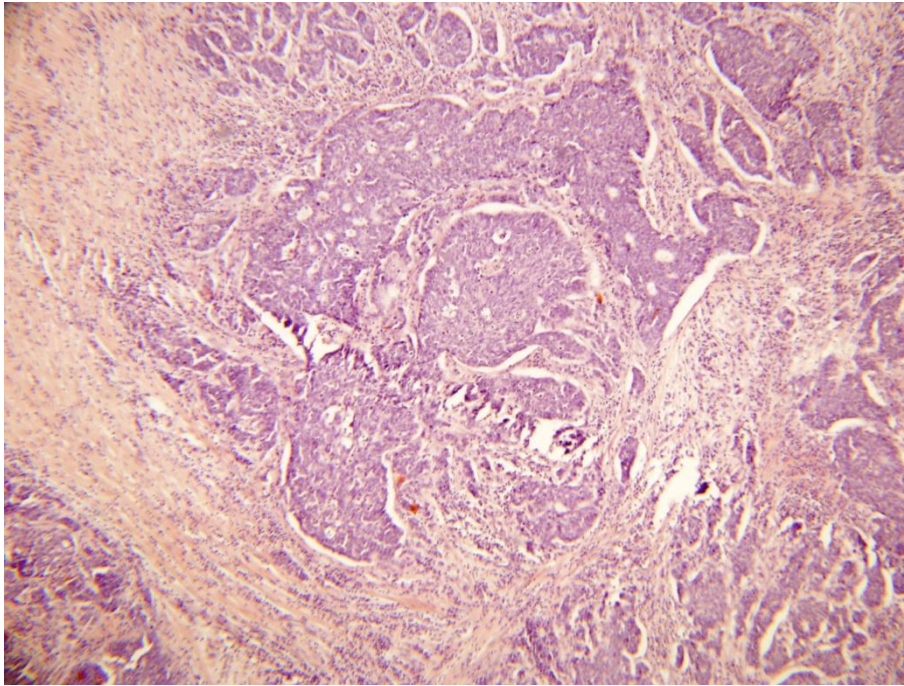
Слика бр.14. Муцинозни аденокарцином (увећање 10x)



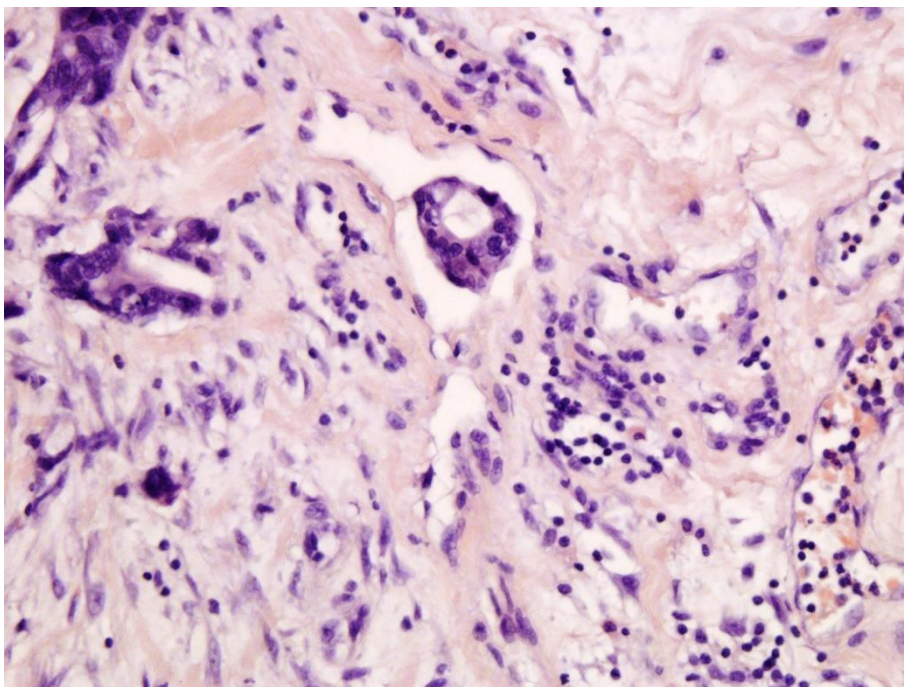
Слика бр.15. Добро диферентовани аденокарцином low grade (HG1, увећање 10x)



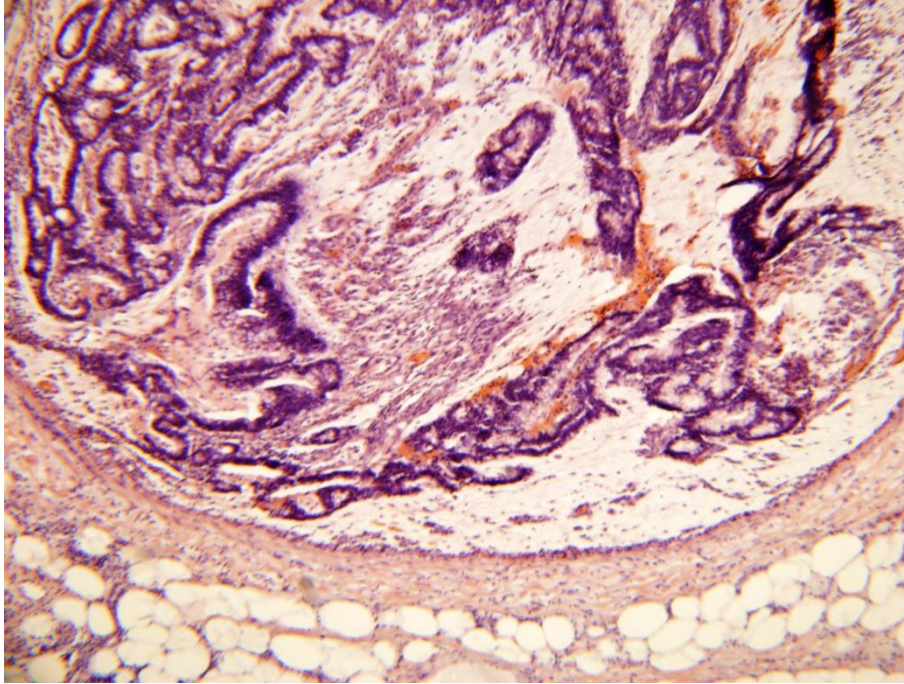
Слика бр.16. Умерено диферентовани аденокарцином low grade (HG2, увећање 10x)



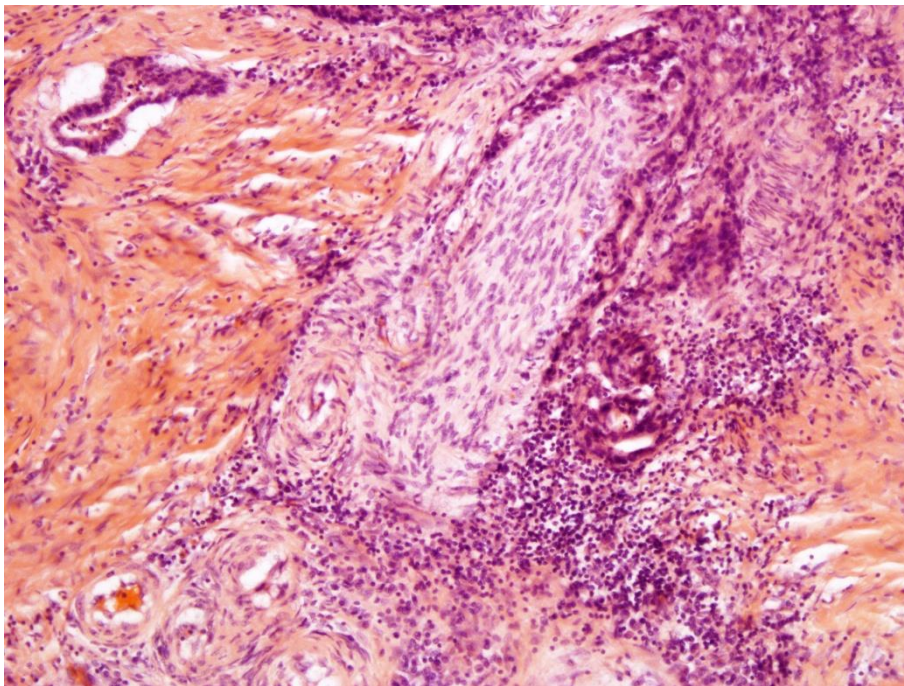
Слика бр.17. Слабо диферентовани аденокарцином , high grade
(увећање 10x)



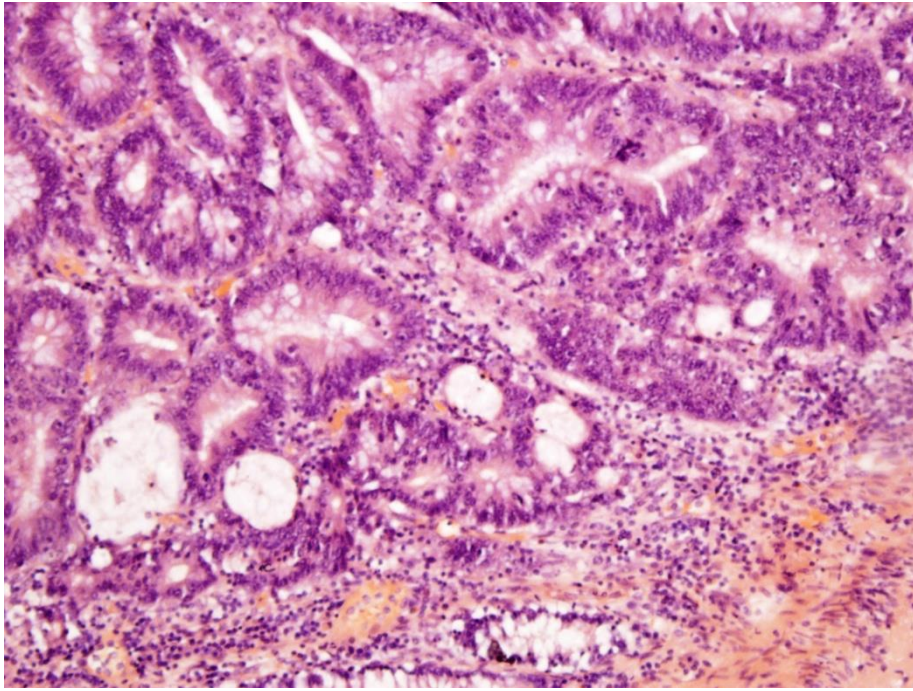
Слика бр.18. Лимфатичка инвазија (увећање 20x)



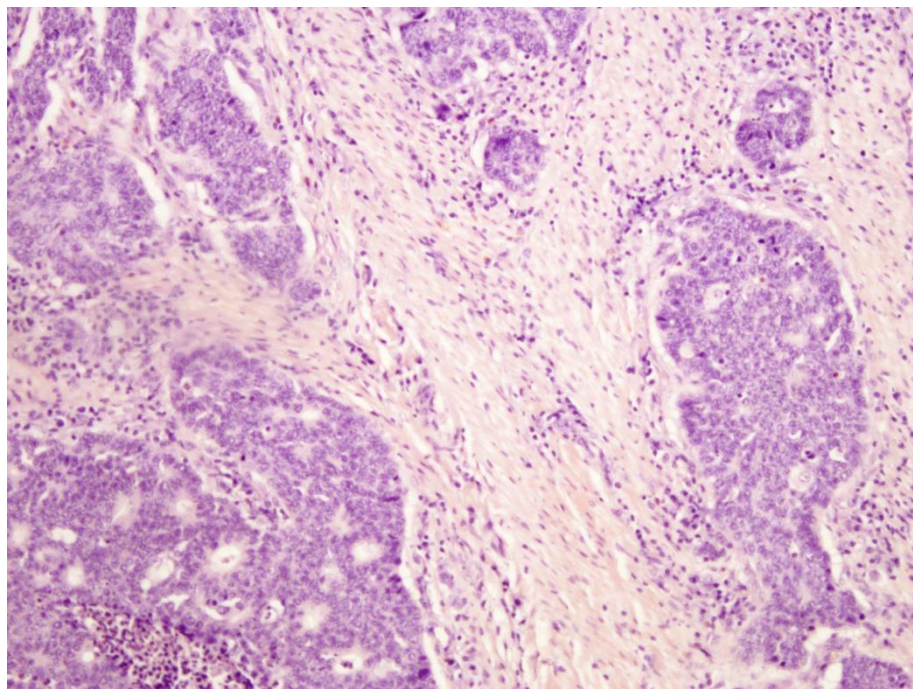
Слика бр.19. Венска инвазија (увећање 20х)



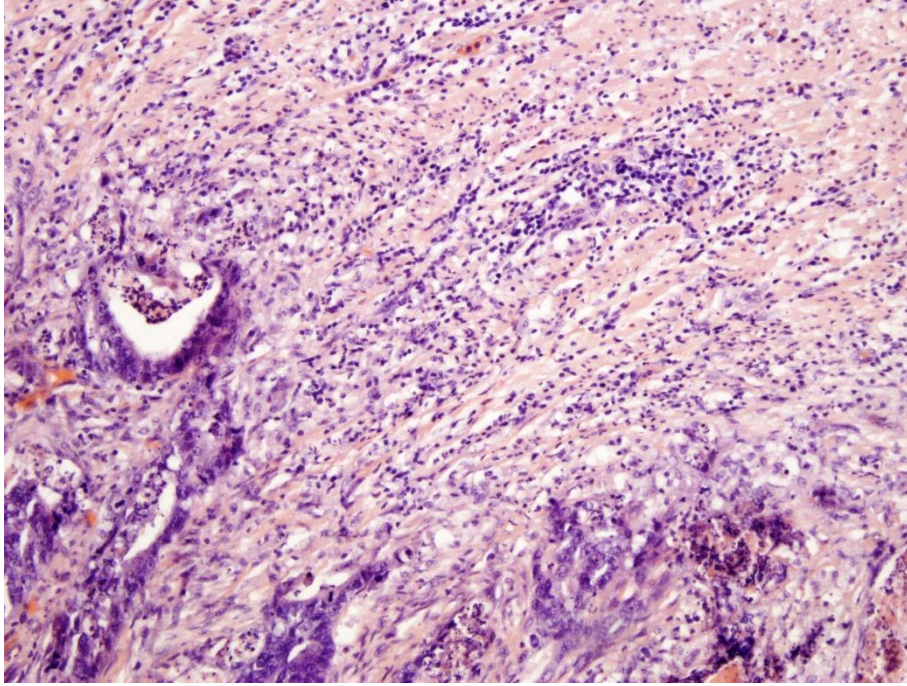
Слика бр.20. Перинеурална инвазија (увећање 20х)



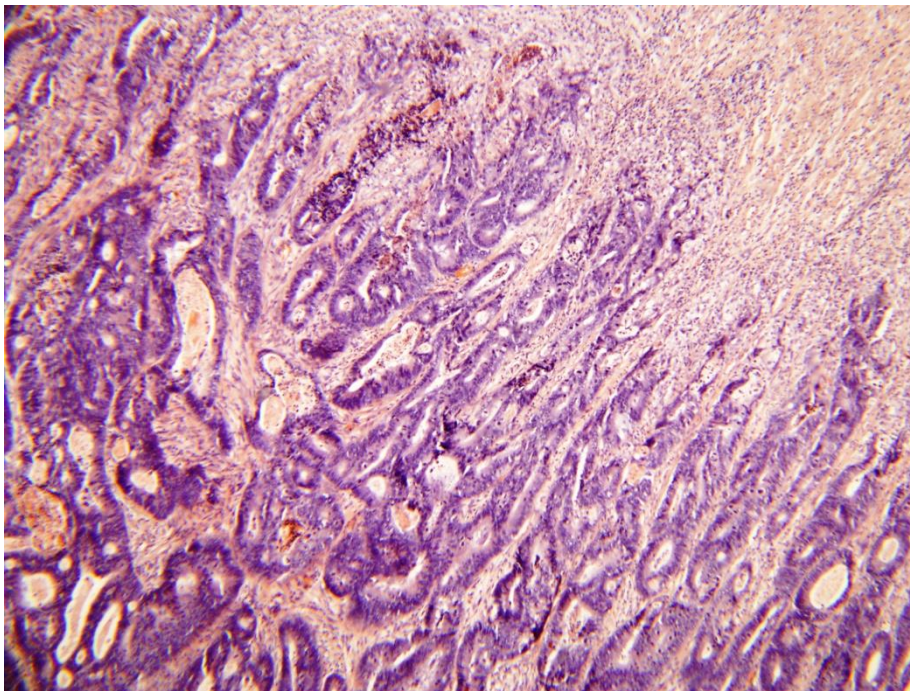
Слика бр.21. Инфламаторни инфилтрат-оскудан (увећање 20х)



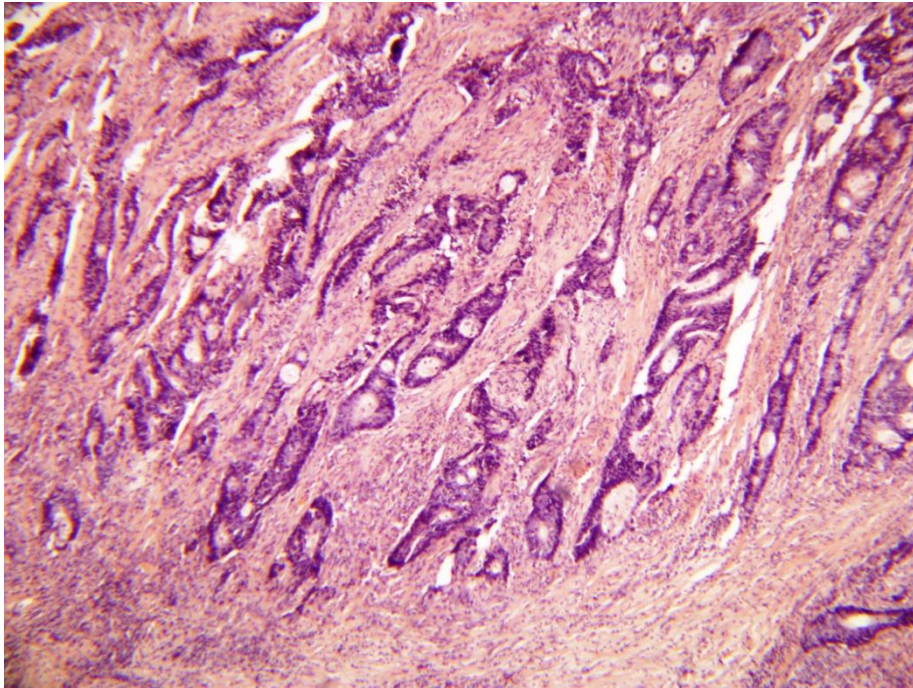
Слика бр.22. Инфламаторни инфилтрат-умерен (увећање 10х)



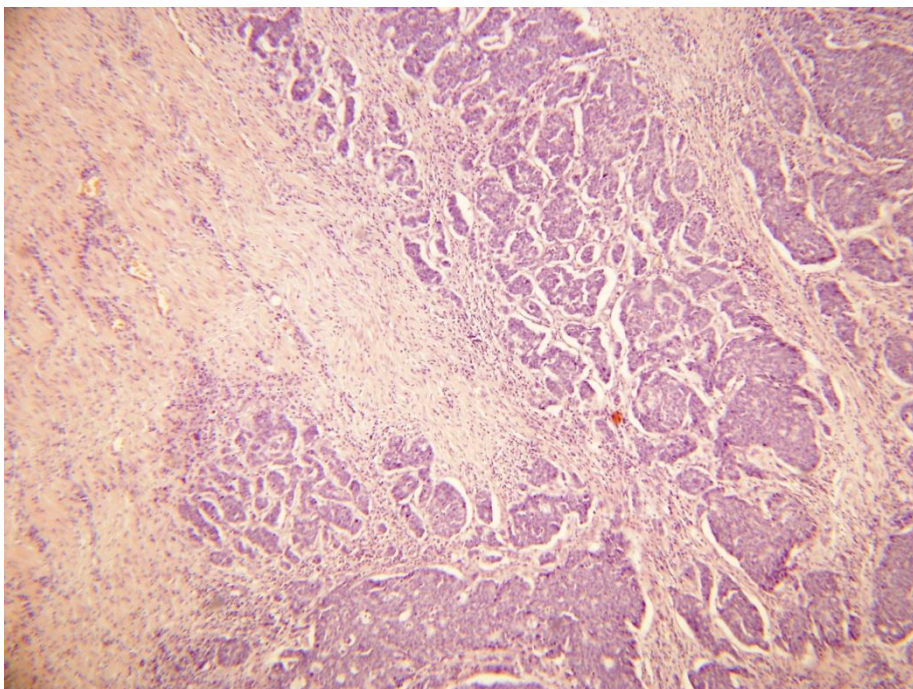
Слика бр.23. Инфламаторни инфилтрат-обилан (увећање 20х)



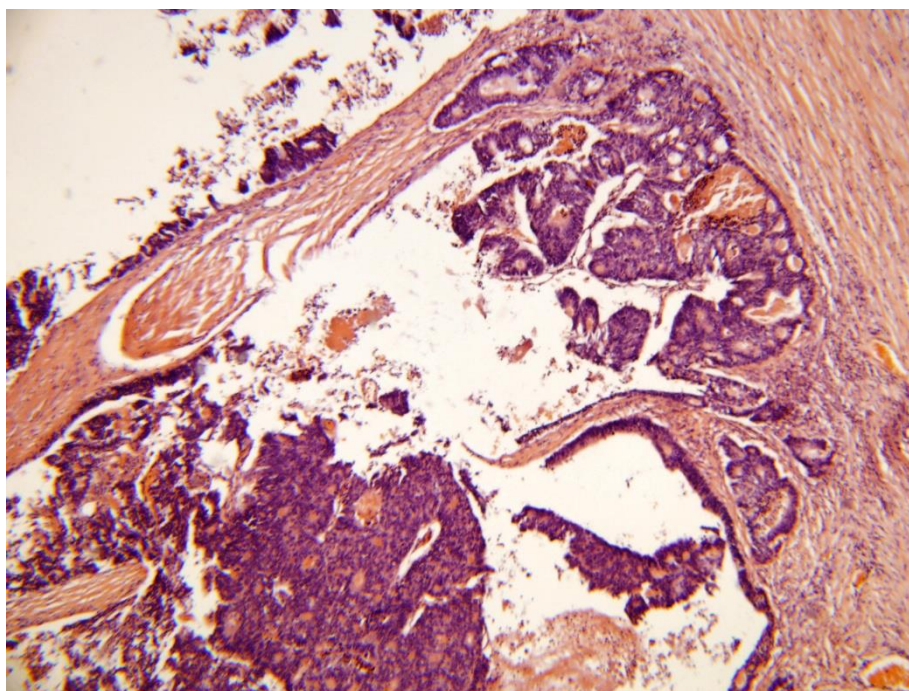
Слика бр.24. Дезмоплазија-оскудна (увећање 10х)



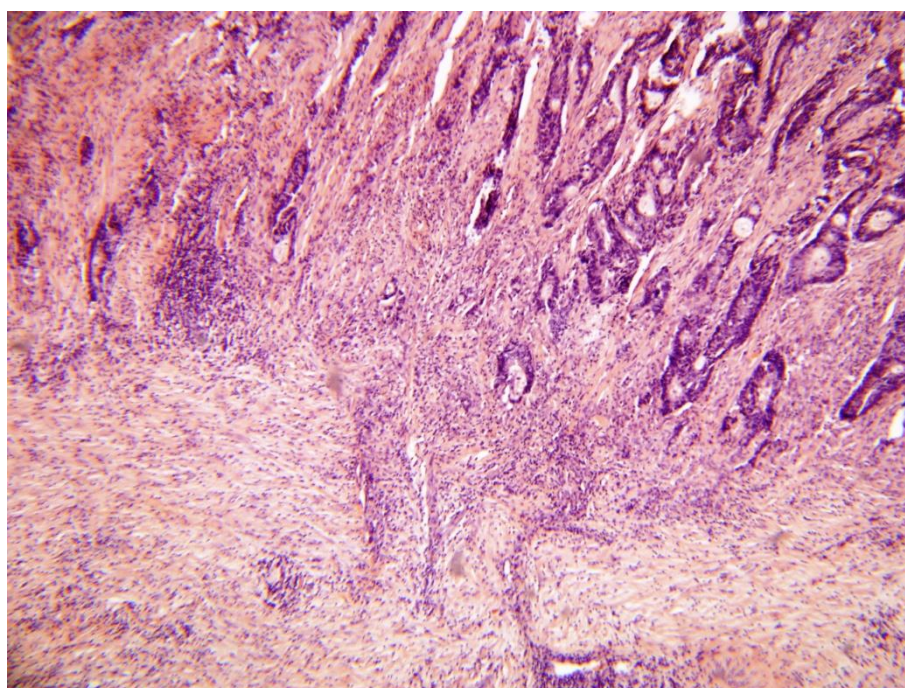
Слика бр.25. Дезмоплазија- умерена (увећање 10х)



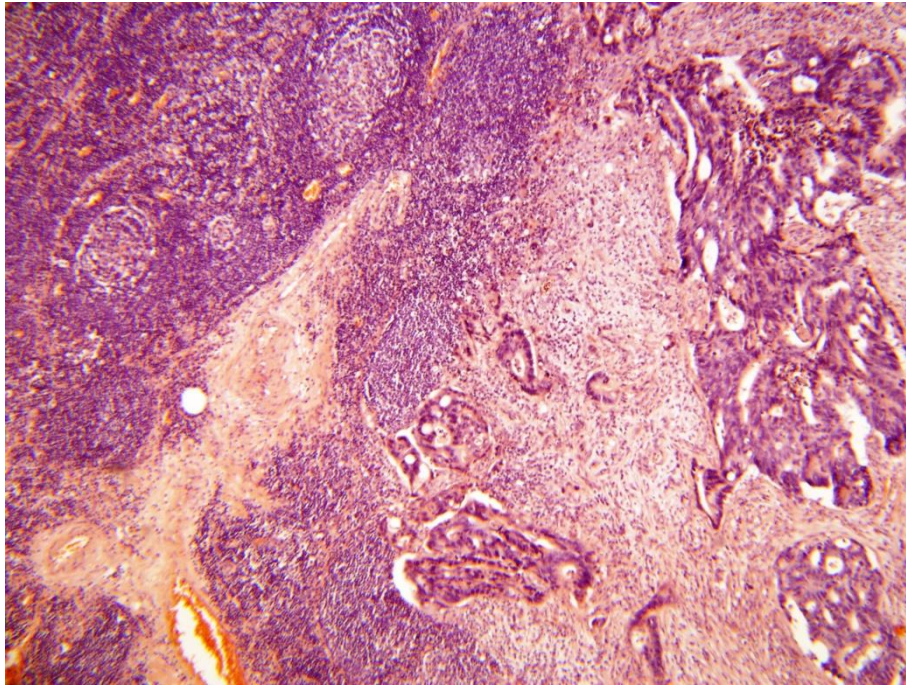
Слика бр.26. Дезмоплазија- обилна (увећање 10х)



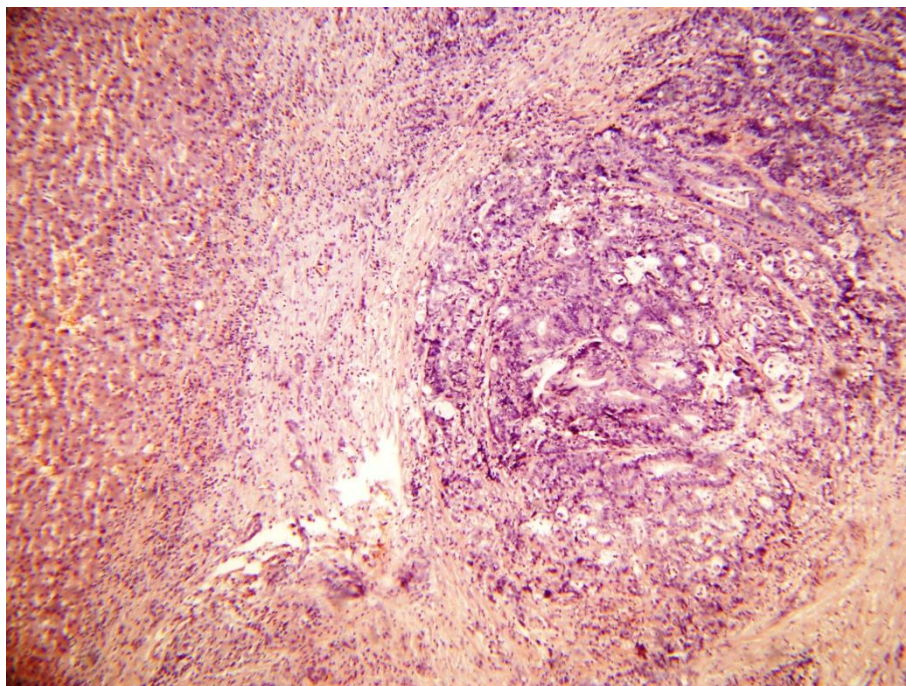
Слика бр.27. Експанзиван начин раста (увећање 10х)



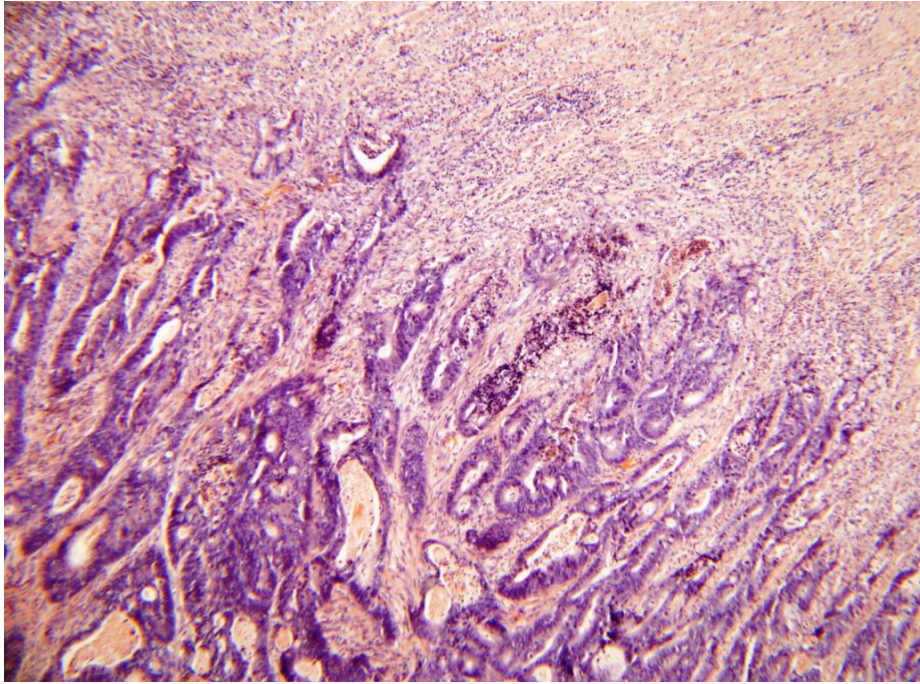
Слика бр.28. Инфилтративан начин раста (увећање 10х)



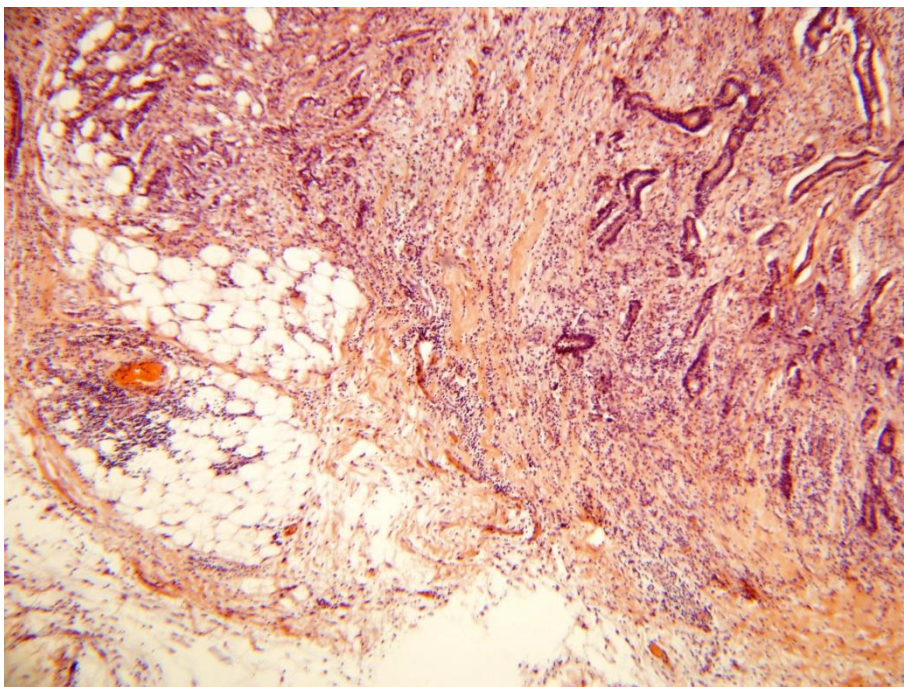
Слика бр.29. Метастаза у лимфном чвору (увећање 10х)



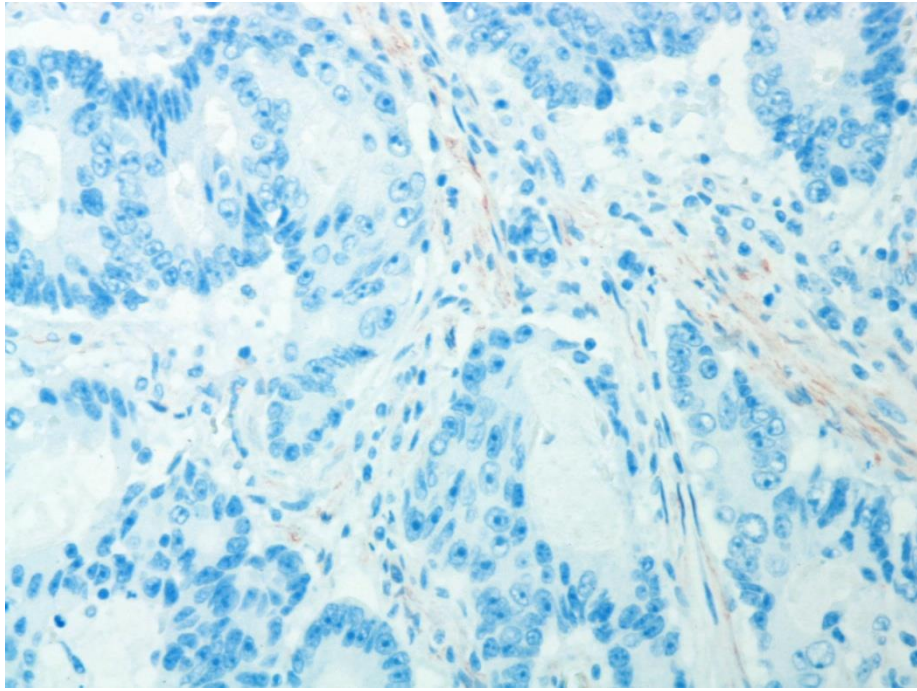
Слика бр.30. Метастаза у јетри (увећање 10х)



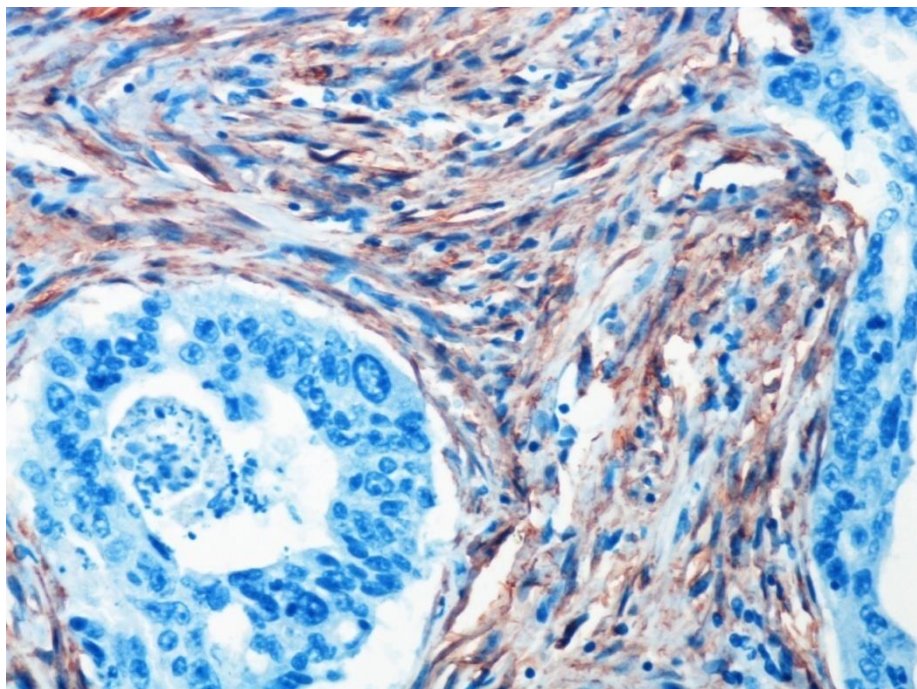
Слика бр.31. Инфилтрација тумора у тунику мускуларис, рТ2 (увећање 10х)



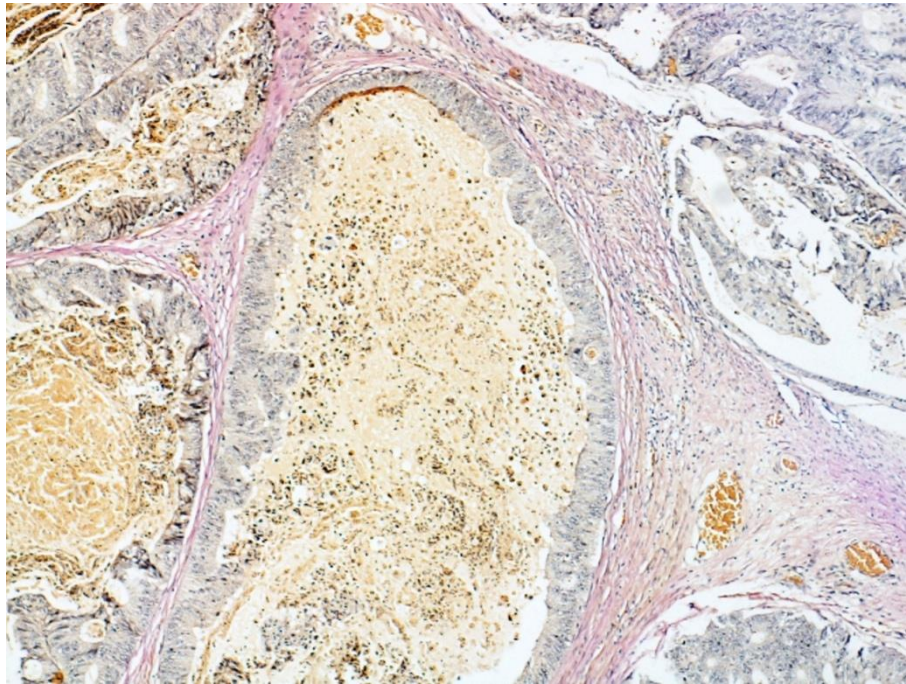
Слика бр. 32. Инфилтрација тумора у масно ткиво, рТ3 (увећање 10х)



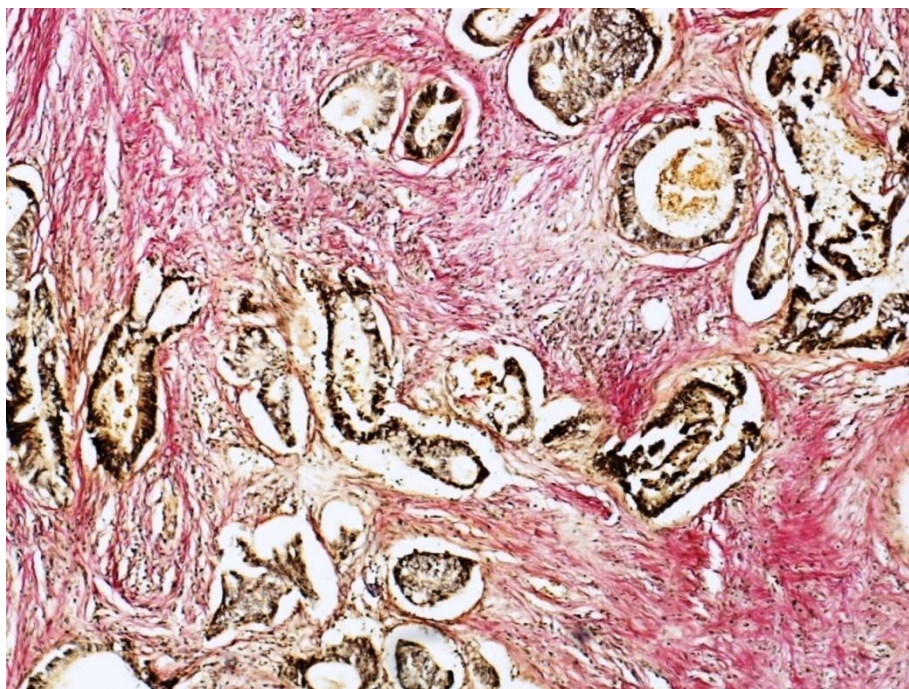
Слика бр. 33. SMA најмања вредност: 0,39 (увећање 20x)



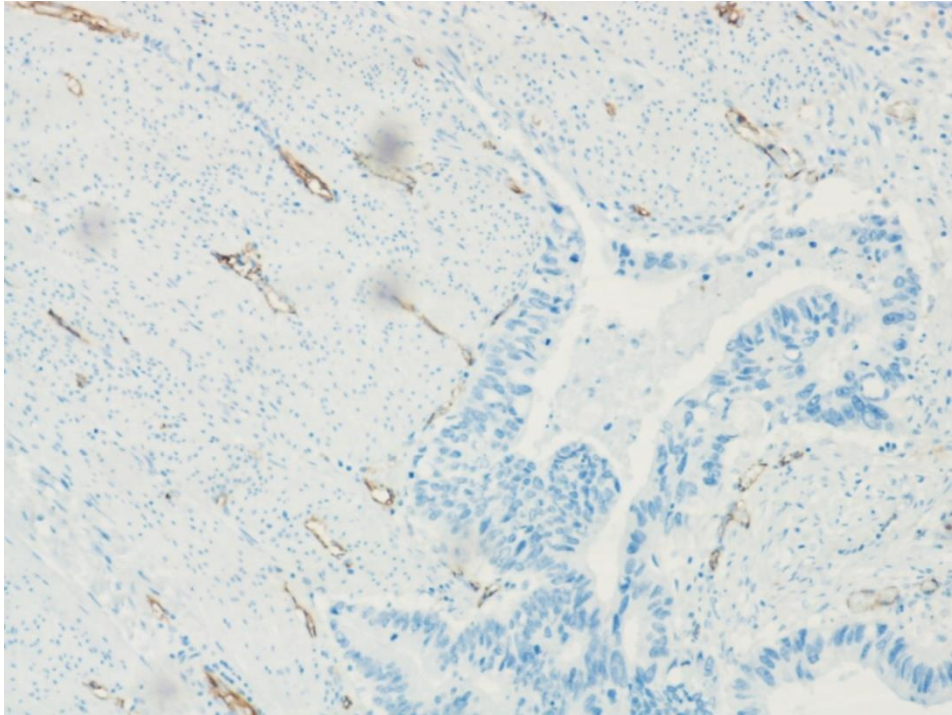
Слика бр.34. SMA највећа вредност: 16,84 (увећање 20x)



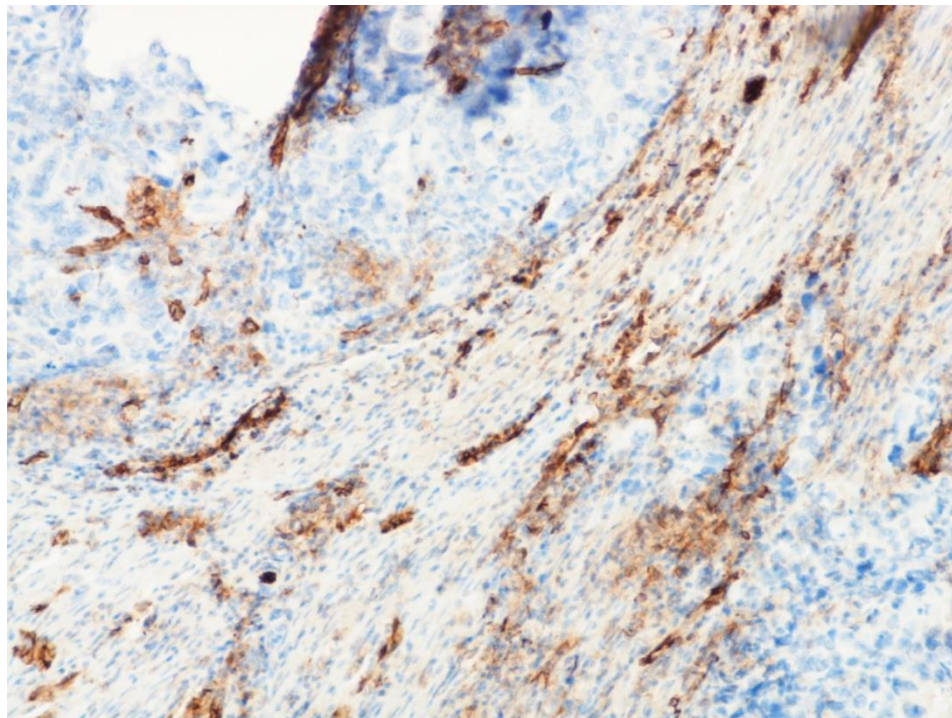
Слика бр. 35.. VG најмања вредност: 1,86 (увећање 5x)



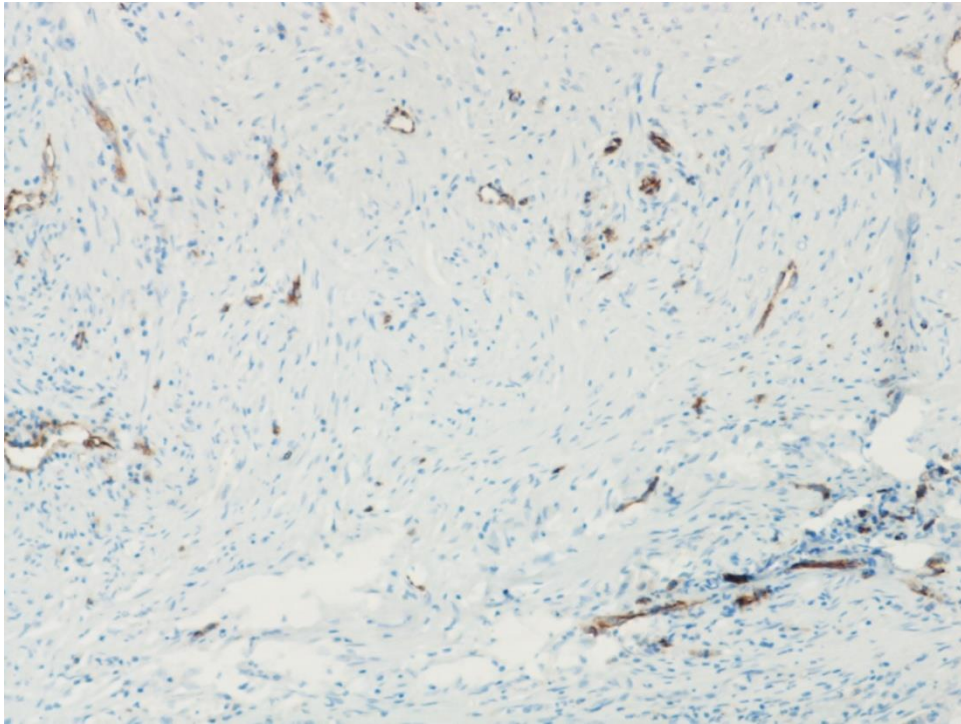
Слика бр.36. VG највећа вредност: 21,07 (увећање 5x)



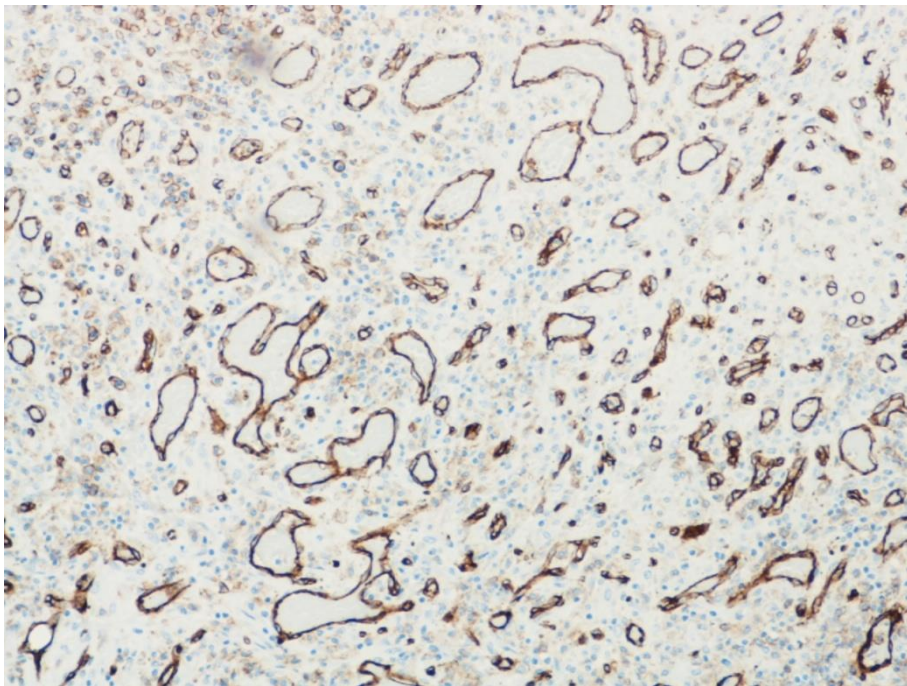
Слика бр.37. CD31 EA1 најмања вредност: 1,06 (увећање 10х)



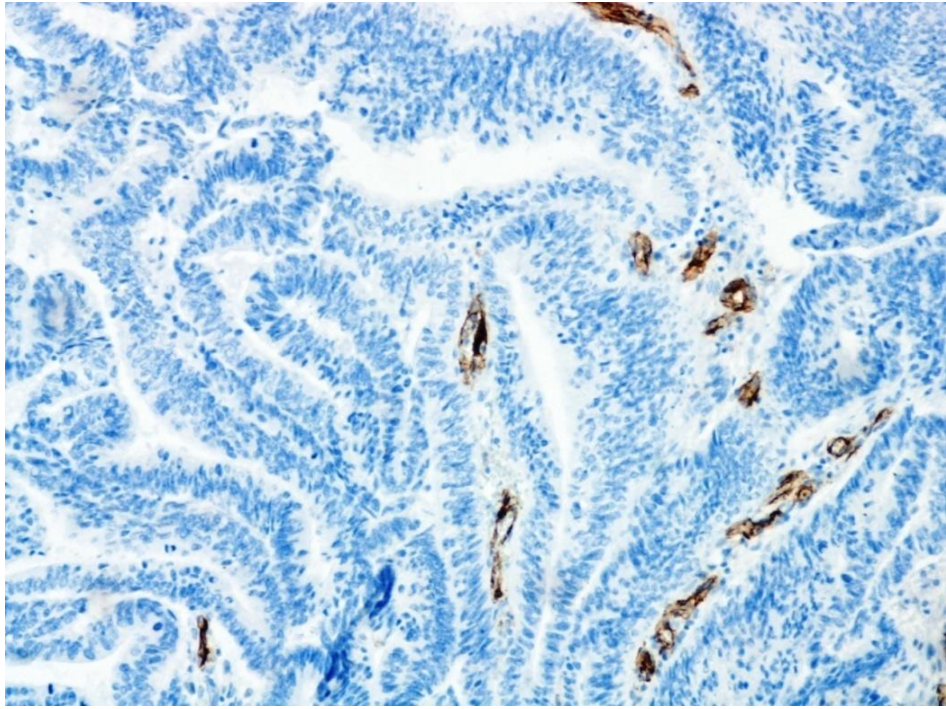
Слика бр.38. CD31EA1 највећа вредности: 8,92 (увећање 10х)



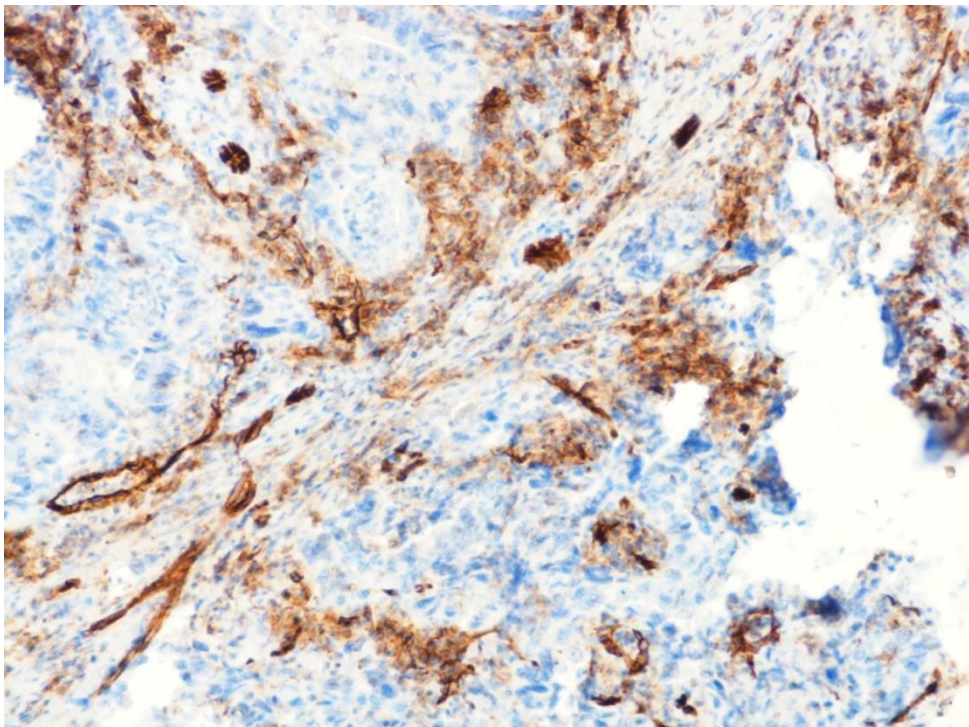
Слика бр.39. CD31 EA2 најмања вредност: 0,69 (увећање 10x)



Слика бр.40. CD31 EA2 највећа вредност: 10,11 (увећање 10x)



Слика бр.41. CD31 ЕА3 најмања вредност: 0,68 (увећање 10х)



Слика бр.42.. CD31 ЕА3 највећа вредност: 10,4 (увећање 10х)

6. ДИСКУСИЈА

6.1. Клиничко и хистопатолошке карактеристике

6.1.1. Клиничке карактеристике

Према подацима Интернационалне агенције за истраживање тумора Светске Здравствене Организације- „Globocana“ аденокарцином колона је у мушкој популацији по учесталости на трећем месту у свету. У току 2012 године је откривено 746000 нових случајева малигних тумора, што обухвата око 10% од свих откривених тумора (1.) Нашим истраживањем је обухваћено 70 болесника од којих су 23 (33%) женског пола и 47 (67%) су мушког пола, што указује на чешћу појаву аденокарцинома ректума код мушкараца. Овакав резултат дистрибуције болести лако одступа од епидемиолошких података који наводе да се у Србији овај тип тумора јавља са скоро поједнаком учесталости код мушкараца и код жена (44). На светском нивоу полна дистрибуција аденокарцинома ректума је у складу са нашим резултатима и показује да се аденокарцином ректума чешће јавља код мушкараца него код жена (2).

Старосна узраст популације коју смо испитивали се кретала од 21 године до 87 година. Ми смо пацијенте поделили у две групе млађе од 50 година којих је било 10 (14,3%) и старије којих је било 60 (85,7%), што је у складу са подацима да се аденокарцином јавља најчешће око 50 године живота, док се у особа млађих од 40 година јавља у 25% (180).

6.1.2. Хистопатолошке карактеристике

Проучавајући карактеристике подтипа аденокарцинома наших испитаника, истраживање је обухватило 63 (85,7%) тубуларних аденокарцинома, док су преостали 7 (14,3%) чинили подтип- муцинозни аденокарцином. Ови подаци корелирају са подацима из литературе, да је епителна компонента тумора чешће тубуларног изгледа, док се док се муцинозни подтип аденокарцинома налази у око 10% свих испитиваних

аденокарцинома ректума (5, 107) Хистолошки подтип аденокарцинома ректума се увек налази у хистопатолошком извештају, али је прогностички значај овог параметра је контроверзан. Нека истраживања су показала да указала да болесници са муцинозним аденокарциномом има лошију прогнозу (110, 111), док је студија оперисаних болесника у другом и трећем стадијуму болести указала да муцинозни подтип аденокарцинома нема прогностички значај у односу на друге подтипове тумора (181).

Неколико студија је указало да степен хистолошке диференције тумора представља независтан прогностички параметар исхода болести пацијената који болују од аденокарцинома ректума и да слабо диферентовани тумори, односно тумори high grade хистолошке диференцијације имају лошију прогнозу (154, 155, 156).

Почетком прошлог века Broders и сарадници су проучавајући хистолошки изглед тумора утврдили карактеристике различитих хистолошких градуса, да би 1928 године Stewart i Spies, користећи четворостепени модел анализе хистолошког градуса, дошли до закључака да аденокарциноми ректума са већим градусом имају и већу склоност ка метастазама, док је преживљавање болесника краће (182). Анализирајући извештаје из литературе запажа се да постоје висока доза субјективности при одређивању степена диференцијације тумора између обсервера, при чему највећа размимоилажење постоји у интерпретацији резултата између добро и умерено диферентованог типа тумора. Зато смо у анализи хистолошког градуса тумора користили од недавно препоручени двостепени начин градирања: low grade (који обухвата добро и умерено диферентоване аденокарциноме) и high grade (који обухвата слабо диферентоване аденокарциноме) и који је једноставнији и репродуктивнији (98). У нашем испитивању смо имали 60 (60%) low grade аденокарцинома и 10 (40%) high grade аденокарцинома.

Хистоморфолошке варијације у начину ширења тумора први је уочио Jass 1987 године, проучавајући ректалне аденокарциноме, који је указао да је начин ширења тумора битан прогностички индикатор. Управо је Jass начин ширења тумора класификовао у две групе: инфилтративан и експанзиван (183). Keum и сарадници су проучавајући 434 ресектата болесника оперисаних раном стадијуму болести, закључили да је инфилтративни начин раста значајан предиктор рецидива болести. (184). Такође је показано да је инфилтративни начин раста предиктор метастазирања тумора у локорегионалне лимфне чворове (185). Код инфилтративног начина ширења се могу видети тзв. „tumor budding“ - микроскопски видљиве појединачне и мале групе канцерских ћелија које се налазе одмах изван инвазивног фронта тумора у околном

ткиву (186), који је индикатор присуства метастаза у лимфним нодусима, слабијег одговора на примењену неоађуванту терапију, појаву локалног рецидива и лошију прогнозу болести (187, 188, 189). Управо због доказаног значаја одређивања начина раста, у наредним студијама би можда требало истражити молекуларне аспекте начина раста тумора, нарочито који су то фактори који одређују директни раст туморских ћелија у околно ткиво (100). Од испитиваних аденокарцинома наше групе инфилтративни начин ширења је имало 50 (71,4%), док је у преосталих 20 (28, 6%) начин ширења тумора био експанзиван.

Проучавајући погностички значај васкуларне инвазије пронашли смо да је један од првих радова који је указао на значај васкуларне инвазије Brown и Warren-а из 1938 године у студији у којој су испитивали повезаност васкуларне инвазије и дужине преживљавања пацијената са колоректалним аденокарциномом (190).

Васкуларна инвазија има два значајна елемената венску инвазију и инвазију лимфатика. Диференцијација венске и лимфатичке инвазије значајна зато што оне имају различити клинички значај: ако постоји венска инвазија чешће се налазе висцералне метастазе, док ако постоји лимфатичка инвазија чешће су присутне метастазе у лимфним чворовима, а тумор се налази у већем стадијуму (191, 192). У нашем истраживању смо нашли лимфатичку инвазију код 41 (58,6%) аденокарцинома, док смо венску инвазију нашли у 19 (27,14 %) испитиваних тумора. Подаци у литератури о присуству васкуларне инвазије веома варирају, присуство лимфатичке инвазије је нађено у од око 8 до око 73% тумора, а венске инвазије у од око 11 до око 89,5 % (95, 193). Овако велике варијације се могу објаснити различитим карактеристикама тумора укључених у истраживања, разликама у обради и процесирању материјала и интеробсерверским разликама патолога (194).

Присуство перинеуралне инвазије је следећи параметар који указује на лошију прогнозу (165). У нашем истраживању перинеурална инвазија је уочена у 36 (51,2%) од испитиваних аденокарцинома, што представља нешто већи постотак од оног који је са јавља у литератури где се перинеурално ширење виђа у 6-31% тумора (196, 197).

Стадијум тумора дефинише степен локалног ширења, као и присуство метастаза. Прогноза исхода болести је уско повезана са дубином инвазије тумора, степеном ширења тумора у околно масно ткиво, односно инфилтрацијом у околне органе, као и са присуством метастаза у лимфним чворовима, односно у јетри или другим органима (5, 96). Од наше испитиване популације у рТ2 стадијуму тумора било је 19 (27,1%)

болесника, док је у рТ3 стадијуму био 51(72,9%) болесник. Истраживања су показала да је 5-годишње преживљавање болесника са локализованим тумором у рТ1 стадијуму 97%, у рТ2 90%, у рТ3 78% и рТ4 63% , без обзира на присуство метастаза у лимфним чворовима или јетри (92). Ми нисмо имали болеснике у рТ1 и рТ4 стадијуму. У стадијуму Б1 по Astler Colleger је било 17 (24,3%), у Б2 16 (22,9%) , у Ц1 1(1,4%), у Ц2 29 (41,4%) и у Д 7(0,1%) болесника. Показано је да болесници у Д стадијуму имају највећу стопу морталитета (198).

Приликом обраде ресектата, брижљиво смо претраживали околно масно ткиво у циљу налажења што већег броја лимфних чворова. Водили смо се препорукама да је адекватан број лимфних нодуса круцијалан за правилно одређивање стадијума болести, да је присуство метастаза у лимфним нодусима предиктиван фактор за исход болести, као и за одређивање даљих терапијских модалитета. Стога смо се трудили да да број лимфних чворова буде већи од 12 (5, 98, 149). У нашем истраживању код 37 (52, 86%) испитиваних болесника постојале су метастазе у лимфним чворовима.

У 7 (10 %) болесника оболелих од аденокарцинома које смо ми испитивали постојале су и метастазе у јетри. То је мањи постотак од оног који постоји у литератури, у око 15% до око 25% болесника се у време дијагностиковања тумора ректума истовремено нађу и метастазе у јетри (95). Присуство метастазе у јетри је један од најбитнијих прогностичких параметара, док је хируршка ресекција њена једина могућа терапијска опција (199).

6.2. Реакција строме

За правилан ембриолошки развој дигестивног система је неопходна епително-мезенхимна реакција, која омогућава правилну диференцијацију ентероцита од ендодерма, као и диференцијацију миофибробласта, фибробласта и глаткомишићних ћелија од мезенхима. У модулацији морфогенезе дигестивног система идентификована је експресија бројних различитих гена: мезенхимно специфичних транскрипторних фактора (Fox L1, Nkx2.3., Нох фамилија гена), ћелијских и матриксних фактора (тенасцин и протеоглигани), као разних секреторних фактора као што су: трансформишући фактор раста бета (TGF-β), фибробласни фактор раста, хепатоцитини фактор раста и кератиноцитини фактор раста (200).

Малигни тумор порекла епитела- карцином се може посматрати као комплексно ткиво које чине малигно алтерисане епителне ћелије и њихова околна микросредина, односно строма која се састоји од различитих екстрацелуларних матриксних супстанци у којима се налазе бројне ћелије строме (201).

По неким подацима више од 60-90% туморске масе карцинома колона чине ћелије строме: фибробласти, миофибробласти, ендотелне ћелије васкуларних простора, перцити, као и у различитој количини инфламаторне ћелије (200).

Екстрацелуларни матрикс се налази у нормалним ткивима и органима, омогућавајући им физичку потпору, али и такође активно учествује у морфогенези, диференцијацији ткива, ако и хомеостази. У сваком ткиву екстрацелуларни матрикс има јединствену грађу, тродимензионална је структура сачињена од воде, колагена, еластина, фибронектина и ламинина, протеогликана, као и бројних фактора раста и цитокина. (201). Органи и ткива се ослањају на миграторну, пролиферативну и секреторну активност стромалних ћелија које генеришу изгед и састав екстрацелуларног матрикса, која је есенцијална за нормалну хомеостазу и физиологију ткива (202).

Колаген чини 30% екстрацелуларног матрикса и одговоран је за чврстину, регулише адхезију и миграцију ћелија и утиче на развој ткива (201, 203). Екстрацелуларни матрикс је виско динамично ткиво, које је у сталном процесу ремоделирања, што је једна од круцијалних функција у одржавању нормалне хомеостазе ткива (204). Структурална је потпора која омогућава адхезију ћелија преко адхезионих рецептора (205) преко којих учествује у миграцији околних ћелија (206) штити факторе раста од деградације и одржава их у латентном стању (207) тако да се може назвати и „резервоаром“ фактора раста који се могу ослободити кад је то потребно (208).

Утицај микросредине на канцерогенезу је јасно уочљив и овај феномен се назива различитим терминима: мезенхимно-епителна реакција, туморско-стромална реакција, реакција тумор-микросредина (200).

Један од најранијих радова о концепту утицаја микросредине на раст и развој карцинома дао је енглески хирург Stephen Paget давне 1889 године, који је анализирао резултате обдукција умрлих болесница од крацинома дојке, али и других тумора, проучавајући метастазе тумора. У свом истраживању је закључио да метастаза у одређеној регији није случајна, односно да је тумор “seed”- “семе”, а ткиво где

метастазира “soil”-односно погодно “гле” где постоје одговарајући услови микросредине за метастазирање, поставивши тако принцип своје "seed and soil" теорије. (209).

Рapidним развојем науке последњих деценија постојала су бројна истраживања која су већином била усмерена на истраживања малигне ћелије, односно њених генетских абнормалности, поремећене генске експресије, као и изгледа ћелије, док се релативно мало обраћала пажња на проучавање строме око туморских ћелија. (210, 211).

Током динамичног процеса епителне канцерогенезе, не мењају се само епителне ћелије, мења се и околна строма, а морфолошки знаци промена околне строме су појава различите количине дезмоплазије, ангиогенезе и инфламаторног инфилтата (103, 201).

Туморско ткиво је чвршће од нормалног, јер долази до активације фибробласта и миофибробласта који секретују компоненте екстрацелуларног матрикса, као и бројне факторе раста, од којих поготово vascular endothelial growth factor (VEGF) индукује раст нових васкуларних простора, односно процес ангиогенезе. Такође, долази до секреције матриксних металопроотеиназа који разграђују базалну мембрану, што поспешује инвазивност канцерских ћелија, секретују се бројни медијатори инфламације који индукују појаву инфламаторне реакције у строми тумора. Ћелије строме у даљем развоју тумора делују на канцерске преко секреције различитих протеина екстрацелуларног матрикса, хемокина, цитокина, факторе раста, протеаза и инхибиторе протеаза (10, 201, 212, 213, 214).

Бројна истраживања ћелија строме су указала да се у њима дешавају интезивне промене. Conkilin и Keely су у проучавању строме карцинома дојке показали да се током канцерогенезе дешавају интезивне промене у експресији гена ћелија строме, што доводи до промена у организацији екстрацелуларног матрикса што повећава инвазивност канцерских ћелија. Такође дешавају се и промене између сигналних путева који повезују епителне и ћелије строме (215). Nasabe и сарадници су показали да су поједине ћелије строме карцинома дојке, као што су фибробласти који се налазе око канцерских ћелија разликују у односу на фибробласте у нормалном ткиву или фибротичном фокусу (216), такође су уочени су фибробласти другачијег морфолошког изгледа, карактеристичног атипичног нуклеуса, који су названи “атипични фибробласти” (217). Изучавања промена у строми карцинома простате Lee

и сарадника су указала да постоји дисбаланс у односу стромалних и околних канцерских ћелија који је медиран преко фактора раста: transforming growth factor β (TGF β) и insulin-like growth factors (IGFs), за које се сматра да су одговорни за даљу туморску прогресију (218)

У нормалној строми колона се налази мало ћелија строми (20). Adegboyeга и сарадници су применом специјалних имунохистохемијских метода анализирали присуство миофибробласта у бенигним туморима порекла епитела- аденомима, као и у хиперпластичним полипима, при чему су показали да постоји повећан број стромалних миофибробласта у односу на нормалну слузницу, што може сугерисати њихову улогу настанку ових промена (219).

У аденокарциномима стромалне ћелије креирају микросредину за раст тумора, фибробласти и миофибробласти поспешују тумогенезу индукцијом ангиогенезе, пролиферације, инвазије и метастатског ширења канцерских ћелија. Доказано је да до активације стромалних миофибробласта долази на различите начине, један од њих је директна индукција ових ћелија од стране туморских ћелија преко секреције TGF β 1, (34, 220), уз дејство бројних протеина екстрацелуларног матрикса који имају про и антиангиогену активност преко различитих механизма, такође архитектуруне карактеристике екстрацелуларног матрикса као што су чврстина и густина делују на формирање и изглед васкуларних просотора насталих у току неоангиогенезе (33). У аденокарциному колоректума туморска строма варира од врло оскудне, чак и одсутне строми, умерено изражене, па до строми склерозних карактеристика (11).

Детаљно разумевање улоге стромалних ћелија и екстрацелуларног матрикса би нам могло омогућити идентификацију прецизнијих прогностичких параметара аденокарцинома, што нам даље може потенцијално указати на пут могућности нових терапијских модалитета. Стога је битно да се даља истраживања базирају и на проучавању стромалних маркера који би могли бити „target“ за терапију. Тумор би требало посматрати као “орган у целини” који би требало да буде „target“ терапије, а не само поједини делови тумора (221).

Сва досадашња истраживања су недосмислено показала да баланс односа епителних ћелија карцинома и стромалне микросредине која их окружује модулише морфологију и понашање тумора, али јединствен маркер који адекватно може “мерити” одговор строми око тумора није још увек прецизно детерминисан.

6.2.1 Миофибробласти

Први рад у којем је описан изглед миофибробласта био је Gabbiani-а и сарадника који је објављен 1971 године и у којем је морфологија ових ћелија дефинисана на основу њихове ултраструктуре (31). Иницијално, миофибробласти су били описани на ивицама ране приликом повреде, као фибробласти који су се специјализовали за секрецију екстрацелуларног матрикса и за контракцију. Назив „*миофибробласт*“ је изабран да би се са једне стране указало да ова ћелија има изглед фибробласта, као што је на пример развијен ендоплазматски ретикулум, а са друге да поседује и карактеристике глаткомишићне ћелије односно има контрактилне актинске микрофиламенате (32, 222).

Миофибробласти имају порекло из великог броја ћелија: најчешће из локалних околних фибробласта, адипозне прекурсорске ћелије, периваскуларне ћелије, епителијалне ћелије у процесу епителијано-мезенхимне транзиције, могу бити порекла косне сржи и то фиброцита косне сржи, као и из других ћелија мезенхимног порекла као што су ендотелијалне, глаткомишићне и стелатне ћелије (222, 223, 224, 225, 226, 227). У нормалном ткиву миофибробласти се налазе у лимфним чворовима, крвним судовима, субмукози утеруса, у вилусима мукозе интестиналне слузнице, алвеоларним септама плућа, као истроми тестиса (228). Интестинални миофибробласти се налазе у ламини проприји, одмах испод ламине епителијалис нормалне мукозе и повезани су са глаткомишићним ћелијама ламине мускуларис мукозе (223, 229).

Хистолошки се могу идентификовати као веће ћелије, вретенатог или звездастог обилка, са присутним перичелуларним матриксом који је богат колагеном и гликозоаминогликанима, бледе еозинофилне и обилне цитоплазме. Имунохистохемијским анализама показују позитивност на: SMA, виментин, минимално на десмин, глаткомишићни миозин, фибронектин, трансмембрански гликопротеин подопланин, адхезиони молекули cadherin-11, негативни су на епителијални маркер цитокератин, моноцитни маркер CD14, ендотелијални маркер CD31, фиброцитни маркер CD34 (32, 212)

Посматран електронским микроскопом, миофибробласт је ћелија без присутне целуларне ламине, богата грануларним ендоплазматским ретикулумом, Голџи апаратом који има колаген секретујућу гранулу, периферно локализованим глаткомишићним филаментима са присутним фибронецусима. Ултраструктурном анализом ових ћелија

специјалан значај као миофибробласни маркер имају управо фибронексуси које је прво документовао Сингер 1979 године. Фибронексуси су дискретна поља на површини ћелија где се интрацелуларни миофиламенти и екстрацелуларни фибронектински филаменти спајају. Односно, интрацелуларни миофиламент је повезан за актин везујући субплазмалемални протеин, који је опет повезан са трансмембранским интегринима, који су екстрацелуларном страном спојени за фибронектин, стога су фибронексуси „веза“ интраћелијске компоненте са екстрацелуларним матриксом (32, 230).

Као и све ћелије миофибробласти могу бити неопластичне, али су суштински реактивне ћелије, присутне су гранулационом ткиву током процеса зарастања рана, где је њихова улога прво проучавана. (32). Са друге стране у хуманој патологији је присутан широк спектар тумор-лике лезија, као и бенигних и малигних тумора у којима се може доказати миофибробласта диференцијација ћелија. То су нодуларни фаситис и њему сличне лезије, пролиферативни миозитис, фиброматозе, солитарни фиброзни тумор, миофибробластични тумор, као и малигни тумори везивног ткива, односно миофибробластични саркоми. Ове мезенхимне лезије, као и тумори имају у мањој и већој мери миофибробласну диференцијацију, али је у неким слабо диферентованим саркомима тешко доказати присуство миофибробласта, стога је неопходно применити специјалне имунохистохемијске методе, као и електронскомикроскопску анализу (231).

У туморској строми активација миофибробласта се одвија у две фазе. Током прве се формирају „протомиофибробласти“ који имају вретенасти изглед и грануларни ендоплазматски ретикулум. То су ћелије богате контрактилним протеинима који генеришу довољну миграторну снагу ћелије и иницијацију ремоделовања екстрацелуларног матрикса, али су без алфаглаткомишићног актина. У другој фази највећу улогу имају паракрини сигнали генерисани од стране ткива, при чему је TGF β 1 најпотентији. Такође у другој фази значајну улогу има дејство механичког стреса који ствара ремоделовна околна строма строма. Као последица њиховог утицаја долази до стварања глаткомишићног актина и потпуне диференцијације SMA позитивних миофибробласта (34, 222, 232).

TGF β 1 има бројне функције, узрокује губитак веза између ендотелних ћелија васкуларних простора, тако омогућавајући екстравазацију метастазирајућих туморских ћелија, стимулише инфламаторну реакцију, узрокује ексцесивну продукцију

компонената екстрацелуларног матрикса. Са друге стране инхибише синтезу матриксних металопроотеиназа и стимулише синтезу њихових ткивних инхибитора. TGF β 1 је најпотентнији миофиброгени фактор раста, стимулишући активацију и преживљавање миофибробласта. (222, 233, 234). Секретују га различите ћелије: тромбоцити, за које се показало да снабдевају метастазирајући тумор са биоактивним TGF β 1, епителне ћелије карцинома, инфламаторне ћелије, ендотелне ћелије васкуларних простора, као и фибробласти. И сами миофибробласти доприносе продукцији и активацији TGF β 1 у активисаној строми тумора и на тај начин генеришу аутокрину регулацију његове секреције (235,236, 237,238).

У диференцијацији миофибробласта учествује и механички стрес који генеришу промене околне строми, при чему су неке студије показале међусобну повезаност механичког стреса и TGF β 1 (239).

Много мање се зна о механизмима инхибиције диференцијације миофибробласта. Показано је да инфламаторни цитокини као што је интерферон гама инхибишу трансдиференцијацију, док хијалурон инхибише апоптозу код миофибробласта (212, 240)

Активацијом миофибробласта долази продукције бројних фактора који могу имати улогу у прогресији и метастазирању тумора као што су: фактори раста, цитокини, хемокини, медијатори запаљења, као матриксне протеазе и компоненте екстрацелуларног матрикса. У строми тумора миофибробласти стварају формацију сличну мрежи која се понаша као структура која указује на правац кретања инвазивних малигних ћелија (241, 242). Иако активацијом миофибробласта долази продукције бројних фактора који могу имати улогу у прогресији и метастазирању тумора, прецизан механизам утицаја ових ћелија на канцерогенезу је комплексан и још недовољно истражен (243, 244, 245).

Антиканцерска терпија се може односити и на развијање лекова који би утицали диференцијацију и функционалне способности миофибробласта. Обзиром на централну улогу коју у активацији миофибробласта има TGF β 1, фактори који инхибишу активацију овог протеина су такође проучавани као део таргет терапије (246). Такође, терапијски се може деловати на компоненте екстрацелуларног матрикса као што је фибронектин, који има критичну улогу у развоју и преживљавању миофибробласта. Циљ таргет терапије могу бити и интегрини, специфични рецептори

екстрацелуларног матрикса од којих су неки укључени у TGF- β 1 активацију мезенхимних ћелија (232).

Последњих деценија вршена су бројна истраживања улоге миофибробласта у туморогенези малигних тумора, проучавано је и њихово присуство у бенигним туморима, а нарочито је су интересантна проучавања њихове улоге у малигној алтерацији бенигних тумора у малигне. Kapse и сарадници су поручавали повезаност количине миофибробласта и канцерогнезе сквамозелуларног карцинома усне дупље. Њихови резултати су показали да у нормалној оралној слузници, као и код присутне low grade дисплазија епитела нема миофибробласта, док се присуство ових ћелија у ламини проприји повећава код потенцијално премалигне лезије, high grade дисплазије епитела (247). У локално агресивним одонтогеним лезијама као што је одонтогена кератоциста и солидни амелобластом Mendes и сарадници су доказали присуство миофибробласта и сугерисали су да је управо њихово присуство у овим лезијама показатељ инвазивнијег понашања (248). Ochicha и сарадници су проучавајући присуство миофибробласта у слузници пренеопластичних промена у једњаку показали присуство веће количину субепително локализованих миофибробласта око метапластичног Barrett -овог епитала, као и око епитела који показивао знаке high grade дисплазије, док их није било око нормалног сквамозног епитела једњака (249).

Истраживања присуства миофибробласта у бенигним туморима колоне порекла епитала, аденомима Adegboyega и сарадника, као и Cui и сарадника су показала да осим што долази до промена епителне компоненте, долази и до динамичних промена у строми, односно ламини проприји аденома. У ламини проприји се дешавају интезивне промене у смислу повећања њене целуларности, са појавом већег броја лимфоцита, макрофага, али и већом количину миофибробласта, што је потврдило и резултате и других истраживача да ове ћелије могу имати улогу у даљем развоју тумора (219, 250).

Са друге стране је показана и протективна улога миофибробласта. Истраживања карцинома дојке Pavlakisa и сарадника су показала да миофибробласти који се налазе око карцинома „in situ“ омогућавају стабилизацију перитуморског матрикса преко секреције лизил оксидазе и на тај начин онемогућавају инвазију канцерских ћелија (251). У хепатоцелуларном карциному јетре је Slany и сарадници су детектовали SMA позитивну ћелијску популацију не само у тумору већ и око тумора, док су Bridle и сарадници показали да болесници који болују од хепатоцелуларног карцинома око

којег се налази капсула имају бољу прогнозу од оних чији је тумор без капсуле, јер се сматара да управо миофибробласти секретују колаген капсуле (252, 253).

Интересантно је питање зашто примарни малигни тумор јетре порекла хепатоцита- хепатоцелуларни карцином има оскуднију строму у односу на други примарни малигни тумор јетре холангиокарцином којег карактерише обилна строма, Darby и сарадници су показали да код обе врсте тумора миофибробласти воде порекло из стелатних ћелија и фибробласних ћелија портних простора, али оно што их разликује јесте и експресија различитих протеина миофибробласта, који су одговорни за даљи процес формирања туморске строме (254).

6.2.1.1. Експресија SMA и клиничке и хистопатолошке карактеристике тумора

Улога миофибробласта у прогресији, као и склоности ка инвазији и метастазирању малигну тумора још није довољно разјашњена. Tsujino и сарадници су истраживали ране аденокарциноме колоне, односно туморе који су инвадирали најдубље у субмукозу и дошли до закључка да количина миофибробласта у аденокарциному колоректума може бити предиктор рецидива болести, као и да је код болесника са већом количином миофибробласта у тумору време између два рецидива краће. Стога су закључили да количина миофибробласта може бити независан прогностички фактор исхода болести, слично као присуство метастаза у лимфним нодусима (255).

Ми смо за визуелизацију миофибробласта користили често употребљаван комерцијални реагенс „clone 1A4“, који познат као *anti-(α)smooth muscle actin* (SMA) (SMA) високо сензитиван маркер ових ћелија. Овим маркером се могу визуелизовати осим миофибробласта и глаткомишићне и миоепителне ћелије, али и туморске ћелије које су вретенастог изгледа, као што су неке врсте ћелија саркома. Нема га у нормалном скелетном мишићу и ретко се експримира у малигну тумору порекла скелетних мишића- рабдомиосаркому (256). Такође се у миофибробластима може експримирати и мишићни интермедијарни филамент desmin, али у изузетно ретким случајевима (257). Ohno и сарадници су у испитивању дезмопластичне реакције код

раног карцинома колона користили SMA и desmin и доказали су да су миофибробласти преобладајућа ћелијска субпопулација у строми канцера (258).

За квантитативно мерење миофибробласти смо користили компјутеризовану методу, на тај начин покушавају да избегнемо субјективност која је била присутна у ранијим истраживањима која су користила семиквантитативан начин одређивања присуства миофибробласти. Добијене вредности су биле изражене у % , минимална вредност је била 0,39 максимална вредност је била 16,84, док су Tsujino и сарадници који су такође користили компјутеризоване системе, вредности количине миофибробласти биле минимална 0,35, а максимална 19 % (255).

Наша истраживања су показала да тумори са већим хистолошким градусом, односно high grade аденокарциноми имају већу количину миофибробласти. Овакве корелације није било у радовима Tsujino и сарадника, као ни код Ohno и сарадника и Liang и сарадника који су проучавали ране аденокарциноме колона (255, 258, 259). Резултате сличне нашим су добили Алеха и сарадници у истраживању карцинома мокраћне бешике, који су показали да high grade уротелни карциноми имају већу количину миофибробласти у односу на low grade туморе (260). Обзиром да тумори са већим хистолошким градусом имају већи инвазивни потенцијал, имају лошију прогнозу, чешће метастазирају у локорегионалне лимфне чворове и чешће дају удаљене метастазе, такође се чешће јављају рецидиви и краће је преживљавање болесника, количина миофибробласти би могла указати на агресивније биолошко понашање тумора (154, 155, 156, 160, 161, 162, 165, 166, 167).

У нашем истраживању смо дошли до закључака да се аденокарциноми са присутном лимфатичком инвазијом, венском и перинеуралном инвазијом имају већу количину миофибробласти. Друга истраживања корелације количине миофибробласти и склоности тумора ка инвазији су дала опречне резултате, тако да Tsujino и сарадници у проучавању аденокарцинома ректума нису потврдили ову корелацију (255) док су Liang и сарадници у истраживању раног колоректалног аденокарцинома закључили да је количина перитуморалних миофибробласти у позитивној корелацији са лимфатичком инвазијом (259).

Наши резултати су показали да тумори са мањом количином инфламаторног инфилтрата имају већу количину миофибробласти, што управо може потврдити резултат Halvorsen и Seim-a и Huh и сарадника да тумори са мање инфламаторног

инфилтрата губе протективну улогу ћелија имунолошког система на развој аденокарцинома (13, 169).

У нашем истраживању тумори са већом количином дезмоплазије имају значајно већу количину миофибробласта, што је у корелацији са подацима Rozario и сарадника, Egeblad и сарадника, и Mueller и сарадника да активирани миофибробласти стварају компоненте екстрацелуалног матрикса који је богат колагеном одговорним за дезмопластичну реакцију строме. (203, 204, 261)

Тумори са инфилтративним начином раста у нашем истраживању имају значајно већу количину миофибробласта, што су потврдили и Tsujino и сарадници (255). Обзиром да су Koelzer и сарадници показали да је инфилтративни изглед границе тумора према околном ткиву предиктор агресивнијег понашања тумора, количина миофибробласта такође може сугерисати ову тврдњу (100).

У нашем истраживању тумори који су били у већем стадијуму по Astler Collier-у, као и у већем патолошком стадијуму су имали значајно већу количину миофибробласта, односно pT3 тумори који су инвадирали кроз мускуларис проприју и инфилтрисали у околно масно ткиво су имали већу количину миофибробласта него pT2 тумори који су инвадирали до нивоа субмукозе. Стадијум тумора је снажан прогностички параметар болести и наше истраживање је указало да миофибробласти могу бити одговорни за већи инфилтративни потенцијал тумора. У прилог ове тврдње иду резултати Ohno и сарадника који су у проучавању раног колоректалног аденокарцинома показали да SMA ћелијска популација може бити добар индикатор дубине инвазије (258). Наше резултате могу потврдити и истраживања присуства SMA позитивне популације у строми ткива карцинома дојке Catteau и сарадника, који су показали да у нормалном ткиву није присутна SMA позитивна ћелијска популација, да је око дукталног low grade „in situ“ ситу карцинома слабо изражена, а да је око high grade дукталног „in situ“ карцинома и инвазивног карцинома изразито повећана количина миофибробласта. (262). Слично су показала и проучавања строме сквамозелуларног карцинома усне дупље Rao и сарадника који су доказала ову тврдњу резултатом да сквамозелуларни карциноми који су инвадирали у ламину проприју имају већу количину миофибробласта од интраепителних лезија (228), као и проучавања Карсе и сарадника који показали да инвазивни сквамозелуларни карцином усне дупље има већу количину миофибробласта у односу на оне који су плитко инвадирали у субмукозу, односно имају фокусе микроинвазије (247). Опречне

результате су имали Alexa и сарадници у истраживању карцинома мокраћне бешике, где су показали да није било значајније разлике у количини миофибробласта код тумора у већем патолошком pT3 у односу на pT2 стадијум. Такође су показали да није било миофибробласта у ламини проприји нормалне мукозе, као ни код интраепителног карцинома (260).

Наша истраживања су показала да тумори који су дали метастазе у лимфне чворове, као и они који су дали удаљене метастазе у јетри имају значајно већу количину миофибробласта. Позитивну корелацију количине миофибробласта у тумору и присуства метастаза у лимфним нодусима су потврдили Liang и сарадници, док су Tsuino и сарадници показали да је количина миофибробласта користан индикатор присуства метастаза у лимфним чворовима (259, 255). Слично су доказали Sridhara и сарадници у истраживању сквамозелуларних карцинома усне дупље, који су показали да постоји већа количина миофибробласта у туморима који су дали метастазе у регионалне лимфне нодусе у односу на туморе који су били без метастаза (263).

Са друге стране истраживања метастатских депозита аденокарцинома колоректума у лимфним чворовима Yeung и сарадника су показала да у постоји повећана количина миофибробласта у односу на нормалне нодусе, као и да су у микрометастазама присутни у мањој мери него у макрометастазама (264). Сличне резултате су дала истраживања метастатских депозита карцинома дојке у лимфним чворовима и депозита у јетри, Catteau и сарадника која су показала присуство изражене SMA реакције око канцерских жлезда (265). Присуство метастаза је снажан прогностички параметар лошег исхода болести (87, 95), а наши резултати су потврдили да су миофибробласти строге учествују у индукцији метастатске субпопулације канцерских ћелија.

Није било корелације количине миофибробласта и клиничких података о полу и старости болесника. Истраживањем односа клиничких параметара, пола и старости, и односа количине миофибробласта у аденокарциному ректума Tsuino и сарадници, као и Ohno и сарадници су дошли до истог закључка (255, 258) док су Rao и сарадници у истраживању улоге количине миофибробласта код карцинома оралне регије показали да код старијих болесника постоји већа количина ових ћелија, али није било корелације у односу на пол болесника (228).

6.2.2. Дезмоплазија

Реч “*desmoplasia*” води порекло од грчких речи “*δεσμός*” - израслина, веза и “*πλασις*” - формирање. Dvorcak и сарадници су 1986 године предложили концепт да је тумор “рана која не зараста” (266) и да се у строми тумора током његовог раста и развоја дешавају динамичке промене који подсећају на оне које се дешавају и током зарастања рана, стога је та реакција названа је „дезмопластичном реакцијом“ (11).

Строма у тумору је чвршће конзистенице него у нормалном ткиву (267). Настаје умножавањем густог везивног ткива око канцерских ћелија, при чему активирани миофибробласти продукују компоненте екстрацелуларног матрикса, нарочито богате у колагену, који су битни делови дезмопластичне реакције и који су одговорни за чврсту конзистенцију строми карцинома (200, 202, 204). Промене у чврстини тумора се дешавају приликом укрштања снопова колагена дејством ензима лизил оксидазе или њима сличних ензима, стога инхибиција ових ензима има за резултат супресију развоја тумора (268, 269, 270). Оно што доприноси чврстоћи тумора је и повећан интерстицијални притисак који настаје као последица веће количине интерстицијалне течности и веће лимфатичке дренаже (271). У многим туморима чврсто везивно ткиво које окружује групе туморских ћелија је изразито изражено, као што је то случај код аденокарциномом панкреаса, док се у аденокарцину колони налази у различитим количинама (272). Активацију фибробласта и миофибробласта омогућавају различити фактори, који стимулишу ове ћелије на стварање компоненти везивног ткива, као што су активирани трансформишући фактор раста бета TGF β 1 (233) фактор раста везивног ткива (273).

Иако је показано да је у вези са канцерском инвазијом, прецизна улога дезмоплазије у развоју и прогресији тумора још није разјашњена, изражена дезмопластична реакција строми није карактеристика карцинома ин ситу и бенигних тумора, виђа се код инвазивних тумора (14).

Сматра се да је дезмоплазија у раним фазама туморогенезе протективна реакција околног ткива која инхибише даљи развој тумора (245). Истраживања количине и присуства колагена као главне компоненте дезмопластичног одговора строми у меланомима су показала да он иницијално има протективни ефекат на прогресију, односно да повећана секреција колагена на ивици тумора ограничава његов раст. Дезмопластична строма иницијално има протективни ефекат у односу малигни

потенцијал овог тумора, односно његову склоност ка инвазији и метастазирању, управо зато што је за настанак ових процеса потребна оркестрација свих делова строме која фаворизује прогресију меланома. (274). У једној опсежној студији која је обухватила 222 узорка метастатских депозита колоректалног аденокарцинома у јетри Brunner и сарадници су проучавали присуство и улогу капсуле око туморског ткива. Показали су да ако је око туморског ткива била присутна капсула, то је обично сугерисало да су рубови ресекције били без тумора, стога туморска капсула има протективну улогу у даљем ширењу тумора и може бити прогностички параметар дужег преживљавања болесника (275).

Са друге стране бројна су истраживања хуманих малигнух тумора су која у указала дезмоплазија ових тумора индукује раст и поспешује прогресију, што је доказано у карциному дојке (215) простате (218) холангиокарцинома (276) тиреоиде (277) панкреаса (278) и сквамозног карцинома оралне регије (279).

Због оваквих различитих података, дезмоплазију је неопходно посматрати као ткиво које добро дефинисано са својим индивидуалним особинама и различитим карактеристикама у различитим туморим (280).

Истраживање улоге дезмопластичне реакције аденокарцинома колоректума и његове склоности ка инвазији и метастазама су такође дала опречне резултате. Једно од првих истраживања прогностичког значаја различитих параметара тумора Jass-a 1986 године нису указала на прогностички значај фиброзног одговора строме код карцинома ректум (102). Нешто касније године Halvorsen и Seim су показали супротно, да је туморска дезмоплазија независни прогностички параметар и да болесници чији аденокарциноми имају обилнију дезмоплазију имају 1,5 пута већи ризик од смртног исхода него они чији тумори имају малу количину или су чак и без дезмопластичног одговора (13).

Проучавања “раног” колоректалног аденокарцинома, су дала информације о корелацији количине дезмоплазије и дубине инвазије аденокарцинома. Рани аденокарцином је тумор откривен у „раном стадијуму“ болести, са присутним ткивом аденокарцинома који инвадирао до мукозе или субмукозе најдубље (pT1) (281). У овом стадијуму болести се могу наћи метастазе у околним лимфним нодусима, при чему се налазе различити подаци о евентуалном присуству метастаза, по подацима Matsuda и сарадника 3,5 % (282), док се по Mou и сарадницима налазе до 13%, при чему је овај проценат већи нарочито кад се ради о туморима који се налазе дубље у

субмукози (283). Обзиром да се рани аденокарцином се лечи одговарајућим терапијским процедурама, ови подаци указују на потребе унапређивања дијагностичких процедура у циљу што прецизнијег одређивања дубине инвазије тумора, стога је опсежно истраживање Hirose и сарадника 359 болесника са раним аденокарциномом колона показала да је евалуација присуства дезмоплазије у преоперативном биоптичком материјалу туморске лезије значајан показатељ дубине инвазије и да су тумори са израженом дезмопластичном реакцијом дубље инфилтрирали субмукозу (284). Овакав резултат је потврђен и у каснијим истраживањима Tomita и сарадника, као и Kimura и сарадника (281,285).

Сматра се да је дезмопластична реакција строме најизраженија на инвазивном фронту тумора, који је богат ангиогеним факторима раста, као и протеинима који ремоделују компоненте екстрацелуларног матрикса, који даље утичу на прогресију аденокарцинома (33). О улози дезмоплазије у инвазивном потенцијалу тумора постоје супротна мишљења. Присуство околног фиброзног ткива може представљати баријеру против дифузног раста канцерских ћелија као и развоја строме која је њихова потпора. Опсежно истраживање Caronale-а и сарадника у којем су користили компјутеризоване системе за одређивање количине дезмоплазије је показало да болесници у чијим је аденокарциномима нађена већа количина дезмоплазије живе два пута дуже од оних код којих нема овакве реакције строме (280). Док су Conti и сарадници у својим истраживањима показали опречне резултате, односно код аденокарцинома са израженом дезмопластичном реакцијом постоји редукован имунолошки одговор, чешћи су рецидиви, стога изражена дезмопластична реакција може бити независан прогностички показатељ лошег исхода болести (9).

6.2.2.1. Дезмоплазија (експресија VG) и клиничке и хистопатолошке карактеристике тумора

Контроверзна мишљења о улози дезмоплазије у развоју хуманих тумора могу бити последица различитих начина визуелизације дезмопластичне реакције строме. Ми смо за визуелизацију дезмоплазије користили специјално хистохемијско бојење Van Gieson зато што се употребљава у већини лабораторија као рутинско хистохемијско бојење, лако се примењује и није потребна употреба специјализованих микроскопа као

што је на пример поларизациони микроскоп, односно у анализи смо користили наш микроскоп за рутинску употребу (286).

У нашем истраживању за мерење количине дезмоплазије строме у аденокарциному ректума смо компјутеризовани систем, са циљем смањења субјективности мерења. Добијени резултати су били изражени % , минимална вредност је била 1,86, а максимална вредност 21,07, вредности мерења Sis и сарадника су биле минимална вредност је била 1, максимална 18 (287).

Проучавањем односа хистолошког градуса и количине дезмоплазије у нашем истраживању показано је да high grade тумори имају значајно већу количину дезмоплазије у перитуморалној строми у односу на low grade tumore. Kimura и сарадници су добили сличне резултате у проучавању дезмоплазије код раног инвазивног аденокарцинома колоне, тумори умерене диференцијације чешће имају присутну дезмопластичну стромалну реакцију у односу на добро диферентоване (285). Други истраживачи као што су Sis и сарадници, који су испитали вредности количине дезмоплазије 112 аденокарцинома ректума, нису показали значајну повезаност између количине дезмоплазије и степена хистолошке диферентованости тумора (287). Опречан резултат нашем је показало и истраживање Espinosa и сарадника строме карицнома ендометријума, при чему је закључено да тумори са нижим степеном хистолошког градуса имају израженији дезмопластични одговор (288).

У нашем истраживању је показано да аденокарциноми који су имали присутну инвазију у лимфатике, вене, као и перинеуралну инвазију имају и значајно већу количину дезмоплазије од оних који нису показали лимфатичку и венску инвазију. Sis и сарадници су такође показали да тумори са већом количином дезмоплазије имају већу склоност ка инвазији у лимфатике и вене, али не и чешћу перинеуралну инвазију (287) , док су Crispino и сарадници у истраживању колоректаног аденокарцинома који је дао рецидив у периоду од пет година након хируршке интервенције показали да ови тумори имају израженију количину дезмоплазије и учесталију инвазију у вене у односу на оне који нису рецидивирали (289)

Наше истраживање је показало је да тумори са мањом количином инфламаторног инфилтрата имају већу количину дезмоплазије у односу на оне са умереним или израженим перитуморалним инфламаторним одговором. Обзиром да су Ни и сарадници у опсежном истраживању 546 аденокарцинома колоректума показали да је лимфоцитни инфилтрат користан предиктор преживљавања болесника, односно да

тумори са већом количним инфламаторног инфилтрата имају више ћелија имунолошког система који учествују у одбрани од инвазије тумора, самим тим и бољу поргнозу (169), овакав наш резултат може сугерисати да већа количина дезмоплазије узрокује смањено супресивно дејство имунолошког система. Друго истраживање аденокарцинома колоректума Carogale и сарадника није показало корелацију количине дезмоплазије и количине инфламаторног и инфилтрата у тумору (15).

Наша истраживања су показала да тумори са инфилтративним растом имају значајно већу количину дезмоплазије, што је потврдило истраживање аденокарцинома Carpole-a и сарадника (15). Обзиром да су истраживања Halvorsen и Seim-a показала да су тумори са експанзивним начином раста у нижем стадијуму болести (13), док су Koelzer и сарадници уочили да тумори са инфилтративним начином раста имају агресивније понашање (100), количина дезмоплазије може сугерисати да тумори са инфилтративним растом имају већу склоност ка инвазивности.

Резултат наше анализе је показао да тумори у већем стадијуму, односно тумори који су дубље инфилтрисали зид колона, као и тумори у већем стадијуму по Astler Collet-у имају већу количину дезмоплазије. Сличне резултате су имали Kimura и сарадници који су доказали да тумори који су дубље инвадирани у субмукозу имају већу количину дезмоплазије у перитуморалној строми (285). И друга проучавањима аденокарцинома ректума, у којима је доказано да се количина дезмоплазије повећава кад дође до пробијања канцерских ћелија изван ламине мускуларис мукозе, односно у дубље слојеве зида колона потврђују овај резултат (13, 14, 245, 287). Овакви резултати би управо могли потврдити мишљење Kimura и сарадника да количина дезмоплазије може бити добар индикатор инвазивног потенцијала карцинома (285)

У нашем истраживању није било значајне корелације између количине дезмоплазије и склоности тумора да удаљене метастазе у јетри, али су аденокарциноми који су метастазирали у лимфне нодусе имали значајно већу количину дезмоплазије од оних без метастаза. Ови резултати су нашли потврду и у проучавањима дезмоплазије аденокарцинома колоректума Sis и сарадника (287). Наши резултати су у корелацији са бројним потврдама утицаја микросредине на канцерске ћелије, која указују да се током туморогенезе у строми тумора дешавају бројне међусобно повезане динамичне промене које поспешују инвазивну и метастатску активност канцерских ћелија (201, 202, 239).

Није било корелације количине дезмоплазије и клиничких података о полу и старости болесника. Проучавања дезмоплазије код раног колоректалног карцинома Kimura и сарадника су потврдила наше резултате (285), такође Espinosa и сарадници нису нашли корелацију између старости болесника и количине дезмоплазије у строми карцинома утеруса (288).

6.2.3. Ангиогенеза

У физиолошким условима ангиогенеза је феномен карактеристичан за раст ткива, зарастање ткива приликом повреда, као и код репродуктивних циклуса, стога је популација ендотелних ћелија високо стабилна ћелијска популација, ниске митотске активности John Hunter, хирург који се залагао за увођене научних метода у извођење хируршких процедура, је 1787 године први употребио термин *ангиогенеза*. Нешто касније, Thiersch је користећи ињекције са контрастом указао на постојање васкулатуре у строми карцинома, откривши и да ови нови крвни судови воде порекло од већ постојећих капилара, Virchow и Viroth су у својим радовима објавили да делови тумора који су први настали у процесу туморогенезе имају крвне судове широког лумена, често тромбозирани и атрофичног изгледа, док је Ide у свом експерименталном моделу изучавао епителиоме и закључио да је раст тумора у директној конекцији са инфилтрацијом новостворених васкуларних простора (290).

„Оцем ангиогенезе“ се сматра Moses Judah Folkman 1933-2003 године, творац хипотезе да раст тумора зависи од ангиогенезе и да тумор величине преко 2мм не може више да прима кисеоник и нутритивне из околних васкуларних простора у довољној мери за преживљавање, већ да се у њему стварају нови, сопствени васкуларни простори. Ангиогенеза је високо регулисан и комплексан процес, који настаје као последица нарушавања равнотеже између фактора који стимулишу и фактора који је инхибишу, а који се у нормалном ткиву налазе у равнотежи. Туморска ангиогенеза је процес у којем се од већ постојећих крвних судова нормалног ткива пупљењем стварају нови и током које се дешава низ прогамираних догађаја које чине пролиферација ендотелних ћелија, њихова миграција у перитуморалну строми вођена ангиогеним стимулусима, са следственим формирањем васкуларних тубуса (291, 292).

Формирање нових крвних судова од ендотелних ћелија постојећих крвних судова је есенцијални процес за ангиогенезу. Од оног тренутка кад ендотелијалне ћелије испоље пролиферативни и миграторни фенотип, околне ћелије строме омогућавају њихову стабилизацију, формирање лумена и одговарајући проток крви. У оном моменту кад тумор почне да стимулише раст нових васкуларних простора, каже се да је дошло до ангиогеног „switch“-а, при чему се сматра да је главни стимулус туморска хипоксија, онкогене мутације, али и друге динамичне промене туморске строме представљају факторе који стимулишу овај процес (293, 294)

Активација фактора који стимулишу ангиогенезу и одговарајућих целуларних програма у тумору су контролисани на неколико нивоа од стране бројних медијатора, који се у нормалном ткиву налазе у балансираној равнотежи. Бројни су фактори који врше стимулацију, али и инхибицију ангиогенезе и који се луче од стране туморских ћелија, као и од стране стромалних ћелија. Од првих проучавања осамдестих година прошлог века, па на овамо откривени су многи, док се као главни медијатор стимулације туморске ангиогенезе сматра васкуларни ендотелијални фактор раста (295).

Ferrara је изоловао ангиогени протеин из питуитарне жлезде краве, који је добио име vascular endothelial growth factor (VEGF), фактор који стимулише раст васкуларних ендотелијалних ћелија, док је у исто време Rosenthal из Folkman-о-ове лабораторије изоловао протеин истих особина (290). VEGF је фамилија гликопротеина, можда најспецифичнији за ендотелијалне ћелије, он стимулише ендотелијалну диференцијацију, миграцију и пролиферацију, повећану васкуларну пермеабилност и ослобађање прекурсора ендотелијалних ћелија из косне сржи и такође спречава апоптозу. VEGF стварају туморске ћелије или под дејством ензима као што су матриксне протеиназе и плазмин, долази до активације из његових изоформи које се налазе у екстрацелуларном матриксу. Постоји шест врста гликопротеина VEGF фамилије. VEGF омогућава ослобађање других ангиогених фактора и протеолитичких ензима који разлажу базалну мембрану. Интегрини и хипоксија у туморској микросредини могу имати улогу у стимулацији VEGF, али може бити стимулисана стеченим генетским мутацијама, као што је p53, маркером тешке дисплазије код аденома у колону (296,297,298,299)

Екстрацелуларни матрикс учествује у туморској ангиогенизи на неколико нивоа: деградацијом базалне мембране, ремоделирањем изгледа екстрацелуларног матрикса,

активацијом ћелијске миграције, као и активацијом екстрацелуларних матриксних протеиназа, од чега је су последње најбитније. Екстрацелуларне матриксне протеиназе чини их фамилија од преко 20 цинквезујућих протеиназа, које могу секретовати скоро све ћелије. Оне разграђују компоненте екстрацелуларног матрикса и формирају физички простор за новонастале крвне судове, али омогућавају пролиферацију и диференцијацију ендотелијалних ћелија преко ослобађања фактора раста који даље стимулишу формирање васкуларних простора. Екстрацелуларне протеиназе регулишу и ослобађање других стимулатора ангиогенезе, као што су VEGF и базични фибробласни фактор раста, омогућавајући њихову интеракцију са рецепторима на ендотелним ћелијама и њихову активацију (300).

Новонастала туморска васкулатура је другачијег изгледа од нормалне која има уобичајену васкуларну хијерархију артериоле-капилари-венуле, уједначен распоред и правилан однос између мишићног зида и околних перицита који им омогућава правилну перфузију. Туморска васкулатура је хаотичне организације, изувјаног и неправилног разгранатог изгледа (301). Проучавајући морфолошке и функционалне карактеристике истраживачи су открили 6 типова васкуларних простора у тумору (301, 106). Туморски крвни судови су већег дијаметра, поремећеног односа површине и волумена, што резултира смањеном могућношћу допремања нутритивних компоненти као и одношења метаболичких продуката (301). Ендотелијални слој је ирегуларан, са просторима који дозвољавају повећану пропустљивост за макромолекуле, перицити око крвних судова су јако слабо причвршћени за зид, што доводи до дисфункционалности ендотела у транспорту флуида и узоркује повећање интерстицијалног притиска (301, 302).

Све ово доводи до смањене могућности туморских васкуларних простора да доносе кисеоник и односе распадне продукте метаболизма, што доприноси повећању хипоксије и ацидозе (303).

У даљем истраживању ангиогенезе Folkam је увео и термин „антиангиогеназа“ који би означавао инхибицију стварања нових капиларних простора у новоствореном туморском ткиву (304) и на тај начин отворио ново научно поље испитивања инхибитора ангиогенезе који су постали део антиканцерске терапије, која ће у последњим деценијама доживети процват. Први успешни третман антиангиогенезе је био 1988 године, кад је Folkam предложио да се употреби

интерферон алфа у циљу лечења пулмоналне хемангиоматозе који је код пацијента довео до ремисије болести пуних 18 година (290).

Даља истраживања ангиогенезе и терапијских могућности у лечењу тумора су показала да нови терапијски модалитети који инхибишу ангиогензу у туморима показују оптимистичне резултате. Антиангиогени лекови су бројни, међу њима се налазе инхибитори VEGF, чија примена је показала значајно побољшање у преживљавању болесника са метастатским аденокарциномом колона (305), као и лекови који инхибишу медијаторе ангиогенезе као што је COX 2, ензима који је локализован на туморским ћелијама већине колоректалних аденокарцинома, али не и нормалним епителним ћелијама колона, и чија примена је показала постизање већег степена регресије тумора, као и успешнији одговор на свеукупно примењену терапију (306)

6.2.3.1. Ангиогенеза (експресија CD31) и клиничке и хистопатолошке карактеристике тумора

Обзиром на изузетну комплексност односа туморских ћелија, васкуларних ендотелијалних ћелија, околних стромалних ћелија, као и циркулишућих крвних ћелија, о улози васкуларних простора на прогресију, склоност ка метастазама и појаву рецидива малигних тумора у литератури постоје контрадикторни резултати. Нека истраживања аденокарцинома колоректума су показала да је једини прогностички параметар присуства удаљених метастаза хистолошки градус тумора, док ангиогенеза није (307), док су друга показала сасвим супротно (308). Узрок разноликости резултата изучавања васкулатуре тумора се може наћи у методолошким разликама у микроскопској визуелизацији васкуларних простора, као и самој методологији бројања. (309, 310).

Постоји неколико имунохистохемијских бојења за визуелизацију ендотелијалних ћелија. Ми смо користили CD31 маркер, који је трансмембрански гликопротеин ендотелијалних ћелија. Применом ове имунохистохемијске методе постоји „cross“ реакција са неким ћелијама као што су мијелобласти, плазма ћелије и хистиоцити, али се ове ћелије морфолошки могу лако разликовати од ендотела васкуларних простора. FVIII (von Willenbrandov faktor) је такође могуће користити за

визуелизацију ендотелних ћелија. FVIII је протеин којег синтетишу ендотелијалне ћелије и мегакариоцити, који има функцију у активацији коагулације, као и круцијалну улогу у агрегацији тромбоцита на зид крвног суда током повреде (311).

Истраживања *Pusztaszeri* и сарадника су показала да је CD31 најсензитивнији ендотелијални маркер, за разлику од FVIII који не визуелизује све ендотелне ћелије и код васкуларних тумора је присутна позитивност у 50-75% (312).

CD34 је још један маркер ендотелијалних ћелија. CD34 је трансмембрански гликопротеин, али и он такође боји и околне периваскуларне стромалне ћелије и позитиван је код широког спектра стромалних тумора, стога је препоручено да користи у комбинацији са другим маркерима у циљу диференцијације ендотелијалних ћелија (311).

Даља квантитативна евалуација васкуларних простора је изузетно битна, али се разликује не само због примене поменутих различитих методологија визуелизације васкуларних простора у смислу коришћења различитих антитела, већ се разликује и у смислу постојања различитих метода процене густине и осталих морфометријских карактеристика васкуларних простора. Први интернационални консензус о методологији и критеријумима квантитативног мерења ангиогенезе у солидним туморима је објављен од стране *Wermeulena* и сарадника 1996 године, 2001 године је објављен наредни консензус у којем су дати нови концепти механизма туморске васкуларизације и трећи консензус је објављен 2006 године (313).

Weidner и сарадници су даље утврдили дефиницију карактеризације бројивог микроваскуларног простора, при чему свака ендотелијална ћелија или свака група ћелија која је визуелизована имунохистохемијском методом и која је јасно одвојена од друге микроваскуларне формације представља бројив микроваскуларни простор, без обзира да ли или не постоји лумен или пак еритроцити у њима. Највећи број студија у проучавању неоваскуларизације се водио принципом који обухвата интратуморално проналажење „*hots spots*“ односно места највеће густине васкуларних простора и бројањем крвних судова, чиме се добија информација о густини васкуларних простора. Међутим селекција васкуларних „*hots spots*“ -а окарактерисала као субјективна и да доста зависи од искуства истраживача (309, 310).

Даља истраживања су указала да би осим најчешће проучавана карактеристике туморске васкулатуре густине васкуларних простора, за коју се сматрало да најбоље осликава степен туморске ангиогенезе и друге карактеристике као што су величина и

облик васкуларних простора би могли рефлектовати степен туморске ангиогенезе и њен утицај на прогресију тумора (314).

Напредовањем науке развиле су се и различите методе базиране на компјутеризованом систему, које су развијене да би се квантификовало примењено имунохистохемијско бојење, а у циљу да се избегне субјективност у анализи васкуларних простора. Предложено је мерење „*endothelial area*“ (EA), као и обима васкулатуре јер се даљим проучавањем васкуларних простора тумора дошло до закључка да су у односу на број, друге карактеристике као што су обим и ендотелијална ареа (EA) можда значајније за процену утицаја на развој тумора јер прецизније рефлектују волумен крви која прође кроз новостворне васкуларне просторе, као и ендотелијалну површину васкуларних простора доступну за интеракцију са туморским ћелијама (315).

Испитујући утицај ангиогенезе на развој колоректалног карцинома, наишли смо на једну велику студију Tiwari и сарадника у којој је проучавана канцерогенеза аденокарцинома колоне 344 пацова и у којој је показано да се у нормалној слузници васкуларни простори налазе у већем броју у премалигној хиперпролиферативној фази, као и да је густина васкуларних простора повећана код малих аденома (316). Са друге стране проучавања неких бенигних тумора, као што је микроаденом питуитарне жлезде Jasek и сарадника су показала да су аденоми у раној фази или аваскуларни или значајно мање васкуларизовани него нормално ткиво питуитарне жлезде (317). Saptefrati и сарадници су проучавали *in situ* карциноме и сквамозну метаплазију епитела грлића материце и закључили да код ових премалигних лезија постоји повећана вредност густине лимфоваскуларних простора (318).

Методолошки приступ проучавања васкуларних простора који подразумева анализу „*hots spots*“ и броја васкуларних простора смо допунили анализом места изабраним методом случајног избора, инвазивним фронтом, анализом обима, као и „*endothelial area*“ (EA) васкуларних простора (309, 315).

Мерење EA се показало нарочито погодним код тумора са великим степеном густине васкуларних простора, где су васкуларни простори близу једни другима и тешко их је раздвојити. Обзиром да EA представља укупну количину васкуларног простора на танком пресеку ткива, није потребно идентификовати сваки појединачно (315).

Резултати нашег мерења изражени у % сз показали: са места „*hots spots*“ ЕА има максималну вредност 8,92, минималану 1,06, са инвазивног фронта тумора ЕА има максималну вредност 10,11 минималану 0,69, са места изабраних методом случајног избора ЕА максималну вредност 10,4 минималану 0,68. Резултати мерења ЕА Leme и сарадника колоректалног аденокарцинома са места „*hots spots*“ су показала да је максимална вредност 14.4 минимална вредност 1,5 (319), Проучавања васкуларних простора аденокарцинома простате *van Niekerk* и сарадника су показала да је минимална вредност ЕА у нормалном ткиву простате 0.36, максимална 92, док је у ткиву аденокарцинома минимална вредност 1.16, максимална вредност 9.04 (320). У нашем истраживању је утврђена је позитивна корелација између вредности ендотелијалне површине са места највеће густине васкулатуре „*hots spots*“ - CD31 ЕА2) и врсте аденокарцинома по подтипу, односно ЕА је већа код аденокарцинома тубуларни подтип у односу на аденокарциноме муцинозни подтип. Овакав резултат се може објаснити чињеницом да муцинозни аденокарциноми по својој природи имају веће количине муцина, а мању количину строме са васкуларним просторима, за разлику од тубуларних који имају између жлезданих формација имају већу количину васкуларне строме (5, 87, 94, 95, 98).

У нашем истраживању је утврђена позитивна корелација између вредности ендотелијалне површине са места изабраних методом случајног избора (CD31 ЕА3) и присуства венске инвазије, односно да тумори са присутном венском инвазијом имају већу ЕА у односу на оне који немају венску инвазију. Обзиром да је присуство венске инвазије показатељ веће склоности тумора да метастазе у регионалне лимфне нодусе као и удаљене метастазе у јетру (95, 127), као и да ЕА осликава укупну ендотелијалну површину васкуларних простора доступну за интеракцију са туморским ћелијама, можемо сугерисати да ЕА може бити показатељ већег метастатског потенцијала тумора.

У односу на пол, старост, као и остале хистолошке карактеристике аденокарцинома ректума није било значајне корелације са вредностима ендотелијалне површине. Проучавајући вредности ЕА аденокарцинома колоректума Leme и сарадници су дошли до сличних резултата, није било значајније повезаности вредности ЕА, клиничких података о полу и старости болесника, као ни релапса болести и свеукупног преживљавања (319). Са друге стране *van Niekerk* и сарадници

су показали да је вредност EA код аденокарцинома простате значајно већа него у нормалном ткиву (320).

У нашем истраживању обима васкуларних простора различитих зона аденокарцинома ректума и корелацијом резултата у односу на пол, старост и хистолошке карактеристике тумора није потврђена значајна разлика ни за један од испитиваних параметара. Резултати нашег мерења изражени у микрометрима су показали да са места „*hots spots*“ обим има максималну вредност 1021,31, минималану 28,72, са инвазивног фронта тумора обим има максималну вредност 1333,08, минималану 26,38, са места изабраних методом случајног избора обим има максималну вредност 663, 46, минималану 29,21. Средња вредност обима васкуларних простора „*hots spots*“ аденокарцинома интратуморалне локализације Velmsa и сарадника је била 21,4, док је са инвазивног фронта 18,3. (315). van Niekerk и сарадници су код нормалног ткива простате измери минималну вредност обима 1.75, максимална вредност 8.76, док је код аденокарцинома минимална вредност је 4.12, максимална вредност 16.4. (320). Проучавања утицаја обима васкулатуре малигних тумора на њихово биолошко понашање других истраживача су дала различите резултате. Vlems и сарадници су у истраживању обима васкулатуре аденокарцинома колоне показали да је обим на инвазивном фронту места изабраних методом случајног избора једини у корелацији са присуством удаљених метастаза. Тумори са већим обимом васкуларних простора су имали процентуално мање присуство удаљених метастаза него они са мањим, као и већу количину перитуморалног инфламаторног инфилтратата. (315). Мерења обима васкуларних простора у аденокарциному простате van Niekerk и сарадника су показала да је он значајно већи него у нормалном ткиву (320). Mikalsen и сарадници су показали да је обим васкуларних простора карцинома дојке је у позитивној корелацији са већим хистолошким градусом тумора, прогностички лошијим хистолошким типом, присутном некрозом, при чему није било корелације са величином тумора, лимфонодалним статусом и венском инвазијом. Овакви резултати могу бити последица чињенице да обим васкуларних простора осликава функционалне карактеристике васкуларних простора, односно да има снажне биолошке импликације протока крви, а вероватно осликава и њихову способност да се прилагоде механичком стресу, што може довести до хипоксије, инфарцерације и некрозе ткива (321). Већи обим васкуларних простора указује на битну улогу

ендотелијалних ћелија, односно рефлектује већу површину контакта ендотелијалних ћелија и туморских ћелија (106,315).

У нашем истраживању броја васкуларних простора различитих зона аденокарицнома ректума и корелацијом резултата у односу на пол, старост и хистолошке карактеристике тумора није потврђена значајна разлика ни за један од испитиваних параметара. Резултати нашег мерења изражени бројем васкуларних простора по мм² су показали да је са места „*hots spots*“ - а максималан васкуларних простора 338, минималан 42, са инвазивног фронта тумора максималан број васкуларних простора 396, минималан 54 и са места изабраних методом случајног избора максималан број васкуларних простора је био 296, минималан 46. Истраживања Leme и сарадника су дала другачије резултате, са места „*hots spots*“ минимална вредност је била 56.3, максимална 267.8 (319). van Niekerk и сарадници су код нормалног ткива простате измери минималну вредност броја васкуларних простора 27.9, максимална вредност је била 147.8, док је код аденокарцинома минимална вредност 48.3, максимална 238.2 вредност (320). Мерење густине васкуларних простора дојке El-moneim и сарадника је показало вредности код нормалне дојке, минимална вредност 2, максимална вредност 6, код карцинома минимална вредност 44, максимална вредност 88 (323).

Проучавања густине је најчешће проучаван параметар васкуларних простора неоангиогенезе, бојна су истраживања различитих тумора која су покушала да укажу на повезаност броја васкуларних простора са клиничким и морфолошким особинама различитих тумора и која су дала различите резултате. Истраживања броја васкуларних простора аденокарицнома колона Leme и сарадника су била слична нашим, нису показале значајну повезаност са полом, старошћу, временом између два рецидива болести и преживљавања (319). Нешто другачији резултати су били El-moneim и сарадника, који су показали да карциноми дојке који су дали метастазе у аксиларним лимфним чворовима имају значајно већу густину васкулатуре, док није доказана повезаност густине васкуларних простора са старошћу, величином, хистолошким градусом, као ни са хормонским статусом тумора (322). Проучавања утицаја густине васкуларних других тумора дигестивног система су дала другачије резултате Coşkun и аутори су показали да је густина перитуморалних лимфатика карцинома желуца у значајној корелацији сав величином тумора, присутним висцералним метастазама, као и метастазама у лимфним нодусима, код болесника

чији су тумори имали већу густину васкуларних простора свеукупно преживљавање је било краће (323). Истраживања лејомиосаркома утеруса Avdalyani сарадника такође нису показала значајну повезаност густине васкуларних простора са величином тумора, хистолошким градусом и стадијумом тумора (324). Са друге стране проучавања карцинома прелазног епитела мокраћне бешике Јумаа и сарадника су показала да тумори већег хистолошког градуса имају већу густину васкуларних простора, као и они који су у већем патолошком стадијуму болести (325). Мерења густине васкуларних простора аденокарцинома простате van Niekerk и сарадника су показала да су она значајно већа него у нормалном ткиву (320).

Густина васкуларних се током раста тумора смањује у централним зонама тумора што доводи до исхемије и некрозе тумора, док се за инвазивни фронт сматра да је зона активне ангиогенезе богат факторима стимулације раста васкуларних простора, као и протеинима који врше ремоделацију екстрацелуларног матрикса (референца бр. (33, 106). Stanczyk и сарадници су у проучавању васкуларних простора аденокарцинома колоректума показали да је највероватније место где туморске ћелије улазе у лимфатике зона инфилтрације тумора у околно ткиво и зато се сматра да би ова зона требало да буде место будућег истраживања „таргет“ терапијских опција (313)

6.2.4. Граничне вредности испитавних параметара за присуство метастаза у лимфне нодусе и јетру

Иако постоји напредак у хируршком лечењу пацијената, као и развој постојеће хемиотерапије, ипак је већина болесника од аденокарцинома ректума инкурабилна. За исход болести, као и за одређивање модалитета терапијског приступа лечењу болесника оболелих од аденокарцинома ректума, најзначајни фактори су присуство метастаза у лимфним чворовима и у ткиву јетре (87, 96, 98)

Liang и сарадници су након семиквантитативног мерења количине миофибробласта у строми аденокарцинома ректума анализом добијених резултата закључили са количина миофибробласта перитуморалне локализације може бити независни предиктор метастаза у лимфне чворове (259). Исти резултат су добили и Alexa и сарадници у истраживању улоге миофибробласта у метастатском потенцијалу

уротелног карцинома, показали су да они могу бити предиктивни фактор метастаза у лимфне нодусе (260). Svagzdys и сарадници су истраживањем карактеристика васкуларних простора аденокаринома колоректума показали да се након радиотерапије значајно смањио њихов број, стога густина васкуларних простора може бити нови прогностички маркер дејства радиотерапије на ткиво аденокарцинома. (326) Применом ROC теста на добијене резултате се дошло до закључка да је густина од 130 крвних судова на 1мм² cut off за повећан ризик смртности након радиотерапије, стога су ови истраживачи закључили да анализом густине васкуларних простора у тумору након радиотерапије терапије даљи терапијски приступ може бити индивидуализован (326). ROC крива је коришћена од стране Caporale и сарадника да би се одредио cut off за дефинисање вредности које би кољчину дезмоплазије поделиле на ниске и високе, ова вредност је била 0,106 и болесници чији су тумори имали већу вредност од ове су дуже живели, на име петогодишње преживљавање је било 21,7 % (280).

Поређењем са осталим параметрима строге који су били предмет нашег истраживања утврђено је да од просечних вредности испитиваних параметара строге које могу указати на присуство метастазе у лимфним чворовима статистички значајну вредност имају количина миофибробласта, као и количина дезмоплазије, док је за присуство метастазе у јетри једино статистички значајна вредност количине миофибробласта.

За вредности количине миофибробласта веће од 5,65 (са сензитивноћу од 89,19% у распону од 74,6 до 96,9, са специфичношћу од 78,79%, у распону од 61,1 до 91,0) можемо тврдити да постоји метастаза у лимфним чворовима. А за вредности количине миофибробласта веће од 5,712 (са сензитивноћу од 100% у распону од 58,9 до 100,0, а са специфичношћу од 49,2%, у распону од 36,4 до 62,1) можемо тврдити да постоји метастаза у јетри.

За вредности количине дезмоплазије веће од 8,89 (са сензитивноћу од 86,49 % у распону од 71,2 до 95,4, са специфичношћу од 84,85 %, у распону од 68,1 до 94,8) можемо тврдити да постоји метастаза у лимфним чворовима.

Наше истраживање је показало да количина миофибробласта и дезмоплазије у строми аденокарцинома ректума могу бити показатељи веће склоности тумора ка перинеуралној и лимфоваскуларној инвазији, као и већем капацитету тумора да инвадира у дубље слојеве зида колоне.

Такође, количина миорфиборбласта и дезмоплазије у строми аденокарцинома ректума су у позитивној корелацији са прогностичким параметрима који указују на лошији исход болести као што су *high grade* хистолошки градус тумора, мања количина инфламаторног инфилтрата и инфилтративани начин раста.

У овом раду су одређене граничне вредности за исход присуства метастаза у лимфним чворовима за миофибробласте (5,65) и за дезмоплазију (8,89), а такође је одређена и гранична вредност за исход присуства метастаза у јетри за миофибробласте (5,71), што указује да би евалуација дезмоплазије и миофибробласта у преоперативном биопсијском материјалу била корисна као прогностички параметар за аденокарцином ректума.

Показано је да је вредност мерења ендотелијалне површине васкуларних простора једини васкуларни параметар који је указао на лошији исход болести.

Даља истраживања би се могла односити на утврђивање прецизних молекуларних механизма који се односе на учешће миофибробласта, дезмоплазије и васкуларних простора у карциногенези аденокарцинома ректума. Тако би се евентуално издвојили фактори који носе највећи ризик за прогресију и рецидив болести и можда издиференцирала нова стратегија антитуморског третмана аденокарцинома ректума.

7. ЗАКЉУЧАК:

На основу нашег истраживања се могу извести следећи закључци:

1. Количина миофибробласта и дезмоплазија су у позитивној корелацији са:
 - а) хистолошким градусом тумора
 - б) патолошким (pT) стадијумом тумора и стадујом тумора по *Astler Coller*-у
 - в) инфилтративним начином раста
 - г) присуством лимфатичке, венске и перинеуралне инвазије
 - д) корелацији присуством метастаза у лимфним чворовима.
2. Количина миофибробласта и дезмоплазије је у обрнутој корелацији са количином инфламаторног инфилтрата
3. Количина миофибробласта је у позитивној корелацији са присуством удаљених метастаза у јетри.
4. Вредности ендотелијалне површине на местима изабраним методом случајног избора су у позитивној корелацији са присуством венске инвазије.
5. Вредности ендотелијалне површине на местима највеће густине васкулатуре тумора су позитивној корелацији са тубуларним подтипом .
6. За исход присуства метастаза аденокарциома у лимфним чворовима утврђено је да постоји гранична вредност количине миофибробласта (5,65% испитиваног поља) и количине дезмоплазије (8,89% испитиваног поља).
7. За исход присуства метастазе аденокарцинома у јетри утврђено је да постоји гранична вредности количине миофибробласта (5,71 % испитиваног поља)

8. ЛІТЕРАТУРА

1. Jemal A., Bray F., Center MM., Ferlay J., Ward E., Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin.* 2011; 61(2):69-90.
2. Ferlay J., Soerjomataram I., Ervik M., Dikshit R., Eser S., Mathers C., Rebelo M., Parkin DM., Forman D., Bray F. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2013. Available from: <http://globocan.iarc.fr>, accessed on day/month/year.
3. Valentini V., Aristei C., Glimelius B., Minsky BD., Beets-Tan R., Borrás JM., Haustermans K., Maingon P., Overgaard J., Pahlman L., Quirke P., Schmoll HJ., Sebag-Montefiore D., Taylor I., Van Cutsem E., Van de Velde C., Cellini N., Latini P. Scientific Committee. Multidisciplinary Rectal Cancer Management: 2nd European Rectal Cancer Consensus Conference (EURECA-CC2). *Radiother Oncol.* 2009;92(2):148-63. doi: 10.1016/j.radonc.2009.06.027.
4. Lieberman D., Douglas K., Winawer S., Giardiello F, Johnson D., Levin T. Guidelines for Colonoscopy Surveillance After Screening and Polypectomy: A Consensus Update by the US Multi-Society Task Force on Colorectal Cancer *GASTROENTEROLOGY* 2012;143:844–857
5. Fletcher C. Diagnostic histopathology of tumors (4th Edition.). Elsevier Saunders. 2013, pp:452-468.
6. Marzouk O., Schofield J. "Review of histopathological and molecular prognostic features in colorectal cancer." *Cancers* 2011; 3 (2): 2767-2810.
7. Ahmed D., Eide P.W., Eilertsen I.A., Danielsen S.A., Eknæs M., Hektoen M., Lind G.E, Lothe R.A. Epigenetic and genetic features of 24 colon cancer cell lines. *Oncogenesis.* 2013;2:e71. doi: 10.1038/oncsis.2013.35.
8. Glaysher S, Cree IA. Isolation and culture of colon cancer cells and cell lines. *Methods Mol Biol.* 2011;731:135-40. doi: 10.1007/978-1-61779-080-5_12.
9. Conti J., Thomas g. The Role of Tumour Stroma in Colorectal Cancer Invasion and Metastasis *Cancers* 2011, 3, 2160-2168; doi:10.3390/cancers3022160
10. Hu M., Polyak K. Microenvironmental regulation of cancer development *Curr Opin Genet Dev.* 2008 February ; 18(1): 27–34.
11. Zalatnai A. Molecular aspects of stromal-parenchymal interactions in malignant neoplasms. *Curr Mol Med* 2006; 6:685-693

12. Tlsty TD., Coussens LM. Tumor stroma and regulation of cancer development. *Annu Rev Pathol.* 2006;1:119-50
13. Halvorsen TB, Seim E. Association between invasiveness, inflammatory reaction, desmoplasia and survival in colorectal cancer. *J Clin Pathol.* 1989;42:162–166.
14. Rose C., Wu H. Morphologic Criteria of Invasive Colonic Adenocarcinoma on Biopsy Specimens. *The Internet Journal of Pathology.* 2010;12 (1).
15. Caporale A, Vestri AR, Benvenuto E, Mariotti M, Cosenza UM, Scarpini M, Giuliani A, Mingazzini P, Angelico F. Is desmoplasia a protective factor for survival in patients with colorectal carcinoma? *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2005;3(4):370-5.
16. Domnić-Stošić T. Anatomija male karlice. 1994, pp.92-95
17. Šljivić B. Sistematska i topografska anatomija – abdomen i karlica; Naučna knjiga, Beograd, 1979
18. Sakorafas GH, Zouros E, Peros G. Applied vascular anatomy of the colon and rectum: clinical implications for the surgical oncologist. *Surg Oncol.* 2006;15(4):243-55.
19. Irving MH, Catchpole B. ABC of Colorectal Diseases: anatomy and physiology of the colon, rectum, and anus. *BMJ* 1992; 304: 1106-8.
20. Mills S.E. *Histology for Pathologists.* (3rd Edition), Lippincott Williams & Wilkins, 2007, pp 628-648
21. Mabbott NA, Donaldson DS, Ohno H., Williams I.R, Mahajan M. Microfold (M) cells: important immunosurveillance posts in the intestinal epithelium *Mucosal Immunology.* 2013; 6, 666–677; doi:10.1038/mi.2013.30; published online 22 May 2013
22. Kirby JA, Bone M, Robertson H, Hudson, M, Jones DE. The number of intraepithelial T cells decreases from ascending colon to rectum. *J Clin Pathol* 2003;56:158.
23. Johansson ME, Hansson GC. Mucus and the Goblet Cell. *Digestive Diseases* 2013; 31: 305–309. doi:10.1159/000354683. PMC 4282926. PMID 2424697
24. Neutra MR., Mantis NJ., Kraehenbuhl JP. Collaboration of epithelial cells with organized mucosal lymphoid tissues. *Nat Immunol.* 2001;2:1004–1009.
25. Gunawardene A.R., Corfe B.M, Staton C.A. Classification and functions of enteroendocrine cells of the lower gastrointestinal tract *Int J Exp Pathol.* 2011; 92(4): 219–231. doi: 10.1111/j.1365-2613.2011.00767.x
26. Van der Flier LG, Clevers H. Stem cells, self-renewal, and differentiation in the intestinal epithelium. *Annu Rev Physiol.* 2009 ;71:241-60. doi: 0.1146/annurev.physiol.010908.163145.

27. Dunn SJ, Fletcher A, Chapman S, Gavaghan D, Osborne J .Modelling the role of the basement membrane beneath a growing epithelial monolayer. *J Theor Biol* 2012;298: 82–91.
28. Biberthaler P, Langer S. Comparison of the new OPS imaging technique with intravital microscopy: analysis of the colon microcirculation. *Eur Surg Res* 2002;34:124–128.
29. Spahn TW, Kucharzik T. Modulating the intestinal immune system: the role of lymphotoxin and GALT organs. *Gut* 2004; 53:456–465.
30. Fenoglio CM, Richart RM, Kaye GI: Comparative ultrastructural features of normal, hyperplastic, and adenomatous human colonic epithelium. *Gastroenterology* 1975;69:100.
31. Gabbiani G, Ryan GB, Majno G. Presence of modified fibroblasts in granulation tissue and their possible role in wound contraction. *Experientia* 1971; 27: 549-550
32. Eyden B. The myofibroblast in health and disease. *Rev Esp Patol* 2008; 41 (1): 3-10.
33. Vong S, Kalluri R. The Role of Stromal Myofibroblast and Extracellular Matrix in Tumor Angiogenesis. *Genes & Cancer*. 2011;2(12):1139-1145. doi:10.1177/1947601911423940.
34. Worthley D., Giraud A., Wan T. Stromal Fibroblasts in Digestive Cancer *Cancer Microenvironment* 2010; 3:117–125
35. Shirol P., Shirol D.. "Myofibroblasts in health and disease." *International Journal of Oral and Maxillofacial Pathology* 2012; 3(1): 23-27.
36. Costa M., Brookes S., Hennig G. Anatomy and physiology of the enteric nervous system. *Gut* 2000;47:iv15-iv19 doi:10.1136/gut.47.suppl_4.iv15
37. Pace JL, Williams I. Organisation of the muscular wall of the human colon. *Gut*, 1969; 10: 352.
38. Krivokapić Z. Karcinom rektuma. *Zavod za udžbenike Beograd*, 2012, pp 23-36.
39. Walls E. Anorectal anatomy in the scientific basis of medicine. *Kondon. Athlone Press* 1963:113-124
40. Suzuki H, Fujioka M. Rectal pressure and rectal compliance in ulcerative colitis. *Jpn J Surg*. 1982;12(1):79-81.
41. Varma JS, Smith AN, Busuttill A. Correlation of clinical and manometric abnormalities of rectal function following chronic radiation injury. *Br J Surg*. 1985 Nov;72(11):875-8.
42. Kohler BA, Ward E, McCarthy BJ, et al. Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2007, featuring tumors of the brain and other nervous system. *J Natl Cancer Inst* 2011; 103:714.
43. Center MM, Jemal A, Ward E. International trends in colorectal cancer incidence rates. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2009; 18:1688.

- 44** Vlainac H., Šipetić–Grujičić S, Janković S, et al. Burden of cancer in Serbia. *CMJ* 2006; 47:134– 141.
- 45** Mihajlović J, Pechlivanoglou P, Miladinov-Mikov M, Zivković S, Postma MJ. Cancer incidence and mortality in Serbia 1999-2009. *BMC Cancer*. 2013,15;13:18
- 46.** Center MM, Jemal A, Smith RA, Ward E. Worldwide variations in colorectal cancer. *CA Cancer J Clin* 2009; 59:366.
- 47.** Edwards BK, Ward E, Kohler BA, et al. Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2006, featuring colorectal cancer trends and impact of interventions (risk factors, screening, and treatment) to reduce future rates. *Cancer*. 2010;116(3):544-573,
- 48.** Link KH, Kornmann M, Staib L, Redenbacher M, Kron M, Beger HG. Increase of survival benefit in advanced resectable colon cancer by extent of adjuvant treatment: results of a randomized trial comparing modulation of 5-FU + levamisole with folinic acid or with interferon-alpha. *Ann Surg*. 2005;242:178–187.
- 49.** American Cancer Society. *Colorectal Cancer Facts & Figures 2011-2013*. Atlanta: American Cancer Society, 2011.
- 50.** Fearon ER. Molecular genetics of colorectal cancer. *Annu Rev Pathol*. 2011;6:479-507. doi: 10.1146/annurev-pathol-011110-130235.
- 51.** Steele SR, Park GE, Johnson EK, Martin MJ, Stojadinovic A, Maykel JA, Causey MW. The impact of age on colorectal cancer incidence, treatment, and outcomes in an equal-access health care system. *Dis Colon Rectum*. 2014;57(3):303-10.
- 52.** Ciarrocchi A, Amicucci G. Sporadic carcinoma of the colon-rectum in young patients: a distinct disease? A critical review *J Gastrointest Cancer*. 2013;44(3):264-9.
- 53.** Michalopoulos G., Tzathas C. Serrated polyps of right colon: guilty or innocent? *Annals of Gastroenterology*. 2013; 26, 212-219
- 54.** Dewanji A, Jeon J, Meza R, Luebeck EG. *PLoS Comput Biol*. Number and size distribution of colorectal adenomas under the multistage clonal expansion model of cancer. 2011 ;7(10):e1002213. doi: 10.1371/journal.pcbi.1002213.
- 55.** Zauber A, Winawer S, Michael M., O'Brien J., Lansdorp-Vogelaar I, van Ballegooijen M., Hankey B., Shi W., Bond J., Schapiro M., Panish J., Stewart E., Wayne J... Colonoscopic Polypectomy and Long-Term Prevention of Colorectal-Cancer Deaths . *N Engl J Med* .2012; 366:687-696 DOI: 10.1056/NEJMoa1100370

- 56.** Skibber J, Minsky B, Hoff P. In: DeVita VT Jr, Hellmann S, Rosenberg SA, editor. *Cancer: principles & practice of oncology*. 6th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; Cancer of the colon and rectum, 2001, pp. 1216–1271.
- 57.** World Cancer Research Fund and American Institute for Cancer Research Food, Nutrition, Physical Activity, and the Prevention of Cancer: A Global Perspective. Washington, DC: American Institute for Cancer Research; 2007.
- 58.** Jones P., Scobey M., Cheng J. The Risk of Colon Cancer in Inflammatory Bowel Disease. *J Gastroint Dig Syst* 2014; 4:1
- 59.** Jess T, Simonsen J, Jørgensen KT, Pedersen BV, Nielsen NM, Frisch M. Decreasing risk of colorectal cancer in patients with inflammatory bowel disease over 30 years. *Gastroenterology*. 2012 ;143(2):375-81.e1; quiz e13-4. doi: 10.1053/j.gastro.2012.04.016.
- 60.** Jasperson KW, Tuohy TM, Neklason DW, Burt RW. Hereditary and familial colon cancer. *Gastroenterology*. 2010;138(6):2044-58. doi: 10.1053/j.gastro.2010.01.054.
- 61.** Lynch HT, Krush AJ: Cancer family "G" revisited: 1895-1970. *Cancer* 1971, 27:1505-1511
- 62.** Lagerstedt Robinson K, Liu T, Vandrovcova J, Halvarsson B, Clendenning M, Frebourg T, Papadopoulos N, Kinzler KW, Vogelstein B, Peltomäki P, Kolodner RD, Nilbert M, Lindblom A. Lynch syndrome (hereditary nonpolyposis colorectal cancer) diagnostics. *J Natl Cancer Inst*. 2007;21;99(4):291-9.
- 63.** Al-Sukhni W, Aronson M, Gallinger S. Hereditary colorectal cancer syndromes: familial adenomatous polyposis and lynch syndrome. *Surg Clin North Am* 2008;88(4):819–844
- 64.** Half E., Bercovich D., Rozen P., Familial adenomatous polyposis. *Orphanet Journal of Rare Diseases* 2009, 4:22
- 65.** Nishisho I. Nakamura Y., Miyoshi Y., Miki Y., Ando H., Horii A, Koyama K., Utsunomiya H., Baba S., Hedge P. Mutations of chromosome 5q21 genes in FAP and colorectal cancer patients. *Science* 1991;253(5020) 665-669 DOI: 10.1126/science.1651563
- 66.** Plawski A, Banasiewicz T, Borun P, Kubaszewski L, Krokowicz P, Skrzypczak-Zielinska M, Lubinski J. Familial adenomatous polyposis of the colon. *Hered Cancer Clin Pract*. 2013 ;11(1):15. doi: 10.1186/1897-4287-11-15.
- 67** Lynch HT, Lynch JF, Lynch PM, Attard T. Hereditary colorectal cancer syndromes: molecular genetics, genetic counseling, diagnosis and management. *Fam Cancer* 2008;7(1):27–39

- 68.** Randi G, Edefonti V, Ferraroni M, La Vecchia C, Decarli A. Dietary patterns and the risk of colorectal cancer and adenomas. *Nutr Rev.* 2010;68(7):389-408. doi: 10.1111/j.1753-4887.2010.00299.x.
- 69.** Huxley RR, Ansary-Moghaddam A, Clifton P, Czernichow S, Parr CL, Woodward M. The impact of dietary and lifestyle risk factors on risk of colorectal cancer: a quantitative overview of the epidemiological evidence. *Int J Cancer.* 2009;125(1):171-180.
- 70.** Miller PE, Lesko SM, Muscat JE, Lazarus P, Hartman TJ. Dietary patterns and colorectal adenoma and cancer risk: a review of the epidemiological evidence. *Nutr Cancer.* 2010;62(4):413-424.
- 71.** Chan AT, Giovannucci EL. Primary prevention of colorectal cancer. *Gastroenterology.* 2010;138(6):2029-2043
- 72.** Santarelli RL, Pierre F, Corpet DE. Processed meat and colorectal cancer: a review of epidemiologic and experimental evidence. *Nutr Cancer* 2008;60(2):131–144
- 73.** Wei Zheng, M.D., Ph.D. and Sang-Ah Lee, Ph.D. Well-done Meat Intake, Heterocyclic Amine Exposure, and Cancer Risk *Nutr Cancer.* 2009; 61(4): 437–446.
- 74.** Cho E, Smith-Warner SA, Spiegelman D, et al. Dairy foods, calcium, and colorectal cancer: a pooled analysis of 10 cohort studies. *J Natl Cancer Inst.* 2004;96(13):1015-1022.
- 75.** Chen J, Iverson D. Estrogen in obesity-associated colon cancer: friend or foe? Protecting postmenopausal women but promoting late-stage colon cancer. *Cancer Causes Control.* 2012 (11):1767-73. doi: 10.1007/s10552-012-0066-z. Epub 2012 Sep 26.
- 76.** Wolin KY, Yan Y, Colditz GA, Lee IM. Physical activity and colon cancer prevention: a meta-analysis. *Br J Cancer.* 2009;100(4):611-616.
- 77.** Wolin K, Patel A., Campbell P., Jacobs, E., McCullough M., Colditz G., Gapstur S. Change in Physical Activity and Colon Cancer Incidence and Mortality *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2010;19(12):3000-4.
- 78.** Lee KJ, Inoue M, Otani T, Iwasaki M, Sasazuki S, Tsugane S; JPHC Study Group. Physical activity and risk of colorectal cancer in Japanese men and women: the Japan Public Health Center-based prospective study. *Cancer Causes Control.* 2007;18(2):199–209
- 79.** Campbell PT, Cotterchio M, Dicks E, Parfrey P, Gallinger S, McLaughlin JR. Excess body weight and colorectal cancer risk in Canada: associations in subgroups of clinically defined familial risk of cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2007;16(9):1735–1744.

- 80.** Ferrari P, Jenab M, Norat T, et al. Lifetime and baseline alcohol intake and risk of colon and rectal cancers in the European prospective investigation into cancer and nutrition (EPIC). *Int J Cancer*. Nov 1 2007;121(9):2065-2072.
- 81.** Zisman AL, Nickolov A, Brand RE, Gorchow A, Roy HK. Associations between the age at diagnosis and location of colorectal cancer and the use of alcohol and tobacco: implications for screening. *Arch Intern Med* 2006;166(6): 629–634
- 82.** Poynter JN, Haile RW, Siegmund KD, Campbell PT, Figueiredo JC, Limburg P, Young J, Le Marchand L, Potter JD, Cotterchio M, Casey G, Hopper JL, Jenkins MA, Thibodeau SN, Newcomb PA, Baron JA; Colon Cancer Family Registry. Associations between smoking, alcohol consumption, and colorectal cancer, overall and by tumor microsatellite instability status. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2009 Oct;18(10):2745-50. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-09-0517.
- 83.** Meschino J., Alcohol Consumption Strongly Linked to Risk of Colorectal . *Chiropractic* – December 15, 2014;32 (24).
- 84.** Botteri E, Iodice S, Raimondi S, Maisonneuve P, Lowenfels AB. Cigarette smoking and adenomatous polyps: a meta-analysis. *Gastroenterology* 2008;134(2): 388–395; e3
- 86.** Parajuli R, Bjerkaas E, Tverdal A, Selmer R, Le Marchand L, Weiderpass E, Gram IT. The increased risk of colon cancer due to cigarette smoking may be greater in women than men. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2013;22(5):862-71. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-12-1351. Epub 2013 Apr 30.
- 85** Parajuli R, Bjerkaas E, Tverdal A, Le Marchand L, Weiderpass E, Gram IT. Cigarette smoking and colorectal cancer mortality among 602,242 Norwegian males and females. 2014;2014 (6): 137—145.
- 87** Rosai J: Colon. In : Rosai and Ackerman's Surgical Pathology, 10th Edition, Elsevier. 2011, pp:752-771
- 88** Wargovich M., Brown B., Morris J. Aberrant Crypt Foci: The Case for Inclusion as a Biomarker for Colon Cancer *Cancers* 2010; (2): 1705-1716; doi:10.3390/cancers2031705
- 89.** Cheng L, Lai MD. Aberrant crypt foci as microscopic precursors of colorectal cancer. *World J Gastroenterol*. 2003;9(12):2642-9.
- 90.** Mueller JD, Bethke B, Stolte M: Colorectal de novo carcinoma: A review of its diagnosis, histopathology, molecular biology, and clinical relevance. *Virchows Arch* 2002; 440:453-460

- 91.** Hornick JL, Farraye FA, Odze RD: Clinicopathologic and immunohistochemical study of small, apparently “de novo” colorectal adenocarcinomas. *Am J Surg Pathol* 2007; 31:207-215.
- 92.** Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Mitchell RN: *Robinsove osnove patologije*. 8 prevedeno izdanje, Datastatus, Beograd, 2010 str.619-625
- 93.** Stewart SL, Wike JM, Kato I, Lewis DR, Michaud F. A population-based study of colorectal cancer histology in the United States, 1998-2001. *Cancer*.2006;107(5 Suppl):1128-1141
- 94.** Day D.W., Jass J.R., Price A.B. Shepherd N.A., Sloan J.M., Talbot I.C., Warren B. Williams G. Morson and Dawson’s *Gastrointestinal Pathology*, 4th Edition. Blackwell. 2003, pp 578-579
- 95.** Fenoglio-Preiser, Cecilia M.; Noffsinger, Amy E.; Stemmermann, Grant N.; Lantz, Patrick E.; Isaacson, Peter G.. *Gastrointestinal Pathology: An Atlas and Text*, 3rd Edition. Lippincott Williams & Wilkins. 2008, pp 962-964.
- 96.** Compton CC, Fielding LP, Burgart LJ, Conley B, Cooper HS, Hamilton SR, Hammond ME, Henson DE, Hutter RV, Nagle RB, Nielsen ML, Sargent DJ, Taylor CR, Welton M, Willett C.: Prognostic factors in colorectal cancer. College of American Pathologists consensus statement 1999. *Arch Pathol Lab Med* 2000; 124:979-994.
- 97.** Živković V. Clinico-pathological characteristics of colonic carcinoma in relation to localization and histologic type *Vojnosanit Pregl* 2007; 64(12): 827–831.
- 98** Tang. Protocol for the Examination of Specimens From Patients With Primary Carcinoma of the Colon and Rectum Based on AJCC/UICC TNM, 7th edition, Protocol web posting date: October 2013.
- 99.** Fenoglio-Preiser, Cecilia M.; Noffsinger, Amy E.; Stemmermann, Grant N.; Lantz, Patrick E.; Isaacson, Peter G.. *Gastrointestinal Pathology: An Atlas and Text*, 3rd Edition. Lippincott Williams & Wilkins .2008.pp 908-946.
- 100** Koelzer V., Lugli A. The tumor border configuration of colorectal cancer as a histomorphological prognostic indicator gastrointestinal cancers. *Front Oncol*. 2014;4:29. doi: 10.3389/fonc.2014.00029.
- 101.** Krivokapić Z. *Karcinom rektuma*. Zavod za udžbenike Beograd, 2012, pp 361-374.
- 102.** Jass JR: Lymphocytic infiltration and survival in rectal cancer. *J Clin Pathol* 1986;39:585.

- 103.** De Wever O, Mareel M. Role of tissue stroma in cancer cell invasion. *J Pathol* 2003;200:429–27
- 104.** Kim J.H, Kim K.J., Bae J. M., Rhee Y.Y., Cho N.Y, Lee H.S., Kang G. K. Comparative validation of assessment criteria for Crohn-like lymphoid reaction in colorectal carcinoma. *J Clin Pathol* 2015;68:22-28 doi:10.1136/jclinpath-2014-202603
- 105.** Weis SM, Cheresh DA. Tumor angiogenesis: molecular pathways and therapeutic targets. *Nat Med.* 2011;17(11):1359-70. doi: 10.1038/nm.2537.
- 106** Nagy J.A., Chang S., Dvorak A., Dvorak H. Why are tumour blood vessels abnormal and why is it important to know? *British Journal of Cancer* 2009;100: 865–869. doi:10.1038/sj.bjc.6604929
- 107.** Hamilton SR, Bosman FT, Boffetta P, et al. Carcinoma of the colon and rectum. In: WHO Classification of Tumours of the Digestive System. Bosman FT, Carneiro F, Hruban RH, Theise ND, eds. Lyon: IARC Press, 2010:134-46.
- 108.** Mărgăritescu I, Pirici D, Mogoantă SS. Mucinous adenocarcinoma of the colon - a histochemical study. *Rom J Morphol Embryol.* 2011;52(3):783-90.
- 109.** Langner C, Harbaum L, Pollheimer M J, Kornprat P, Lindtner R A, Schlemmer A, Vieth M., Rehak P. Mucinous differentiation in colorectal cancer – indicator of poor prognosis? *Histopathology.* 2012;60(7):1060-72. doi: 10.1111/j.1365-2559.2011.04155.x. Epub 2012 Feb 20.
- 110.** Verhulst J, Ferdinande L, Demetter P, Ceelen W. Mucinous subtype as prognostic factor in colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *J Clin Pathol.* 2012;65(5):381-8. doi: 10.1136/jclinpath-2011-200340. Epub 2012 Jan 18.
- 111.** Nitsche U., Zimmermann A., Späth C., Müller T., Maak M., Schuster T., Slotta-Huspenina J., Käser SA., Michalski CW., Janssen KP., Friess H., Rosenberg R., Bader FG. Mucinous and signet-ring cell colorectal cancers differ from classical adenocarcinomas in tumor biology and prognosis. *Ann Surg.* 2013;258(5):775-82
- 112.** Leopoldo S, Lorena B, Cinzia A, et al. Two subtypes of mucinous adenocarcinoma of the colorectum: clinicopathological and genetic features. *Ann Surg Oncol* 2008;15:1429-39
- 113.** Fleming M, Ravula S, Tatishchev SF, Wang HL. Colorectal carcinoma: Pathologic aspects. *Journal of Gastrointestinal Oncology* 2012;3(3):153-173. doi:10.3978/j.issn.2078-6891.2012.030.
- 114.** Chen JS, Hsieh PS, Chiang JM, et al. Clinical outcome of signet ring cell carcinoma and mucinous adenocarcinoma of the colon. *Chang Gung Med J* 2010;33:51-7

- 115.** Kang DB, Oh JT, Jo H.J, Park W.C. Primary adenosquamous carcinoma of the colon J Korean Surg Soc. 2011; 80(1 1): S31–S35.
- 116.** Frizelle FA, Hobday KS, Batts KP, Nelson H: Adenosquamous and squamous carcinoma of the colon and upper rectum: A clinical and histopathologic study. *Dis Colon Rectum* 2001; 44:341-346
- 117.** Raiford TS. Epitheliomata of the lower rectum and anus. *Surg Gynecol Obstet.* 1933;57:21–35.
- 118.** Dyson T, Draganov PV. Squamous cell cancer of the rectum. *World Journal of Gastroenterology : WJG* 2009;15(35):4380-4386. doi:10.3748/wjg.15.4380.
- 119.** Jessurun J, Romero-Guadarrama M, Manivel JC: Medullary adenocarcinoma of the colon: Clinicopathologic study of 11 cases. *Hum Pathol* 1999; 30:843-848.
- 120.** Thirunavukarasu P, Sathaiah M, Singla S, et al. Medullary carcinoma of the large intestine: a population based analysis *Int J Oncol.* 2010;37(4):901-7.
- 121.** Ni S.J, Sheng WQ-, Du X. “Pathologic Research Update of Colorectal Neuroendocrine Tumors. *World J Gastroenterol.* 2010; 16(14): 1713–1719.
- 122.** Bjelović M. M., Babić T. D. Neuroendokrini tumori digestivne cevi - paradigma koja traje *Acta chirurgica iugoslavica.* 2013; 60 (1): 39-45
- 123.** Carol E.H. Scott-Conner Chassin's Operative Strategy in General Surgery: An Expositive Atlas Springer Science & Business Media.2013.pp: 501-529
- 124.** Kiran RP, Lian L, Lavery IC. Does a subcentimeter distal resection margin adversely influence oncologic outcomes in patients with rectal cancer undergoing restorative proctectomy? *Dis Colon Rectum.* 2011;54(2):157-63. doi: 10.1007/DCR.0b013e3181fc9378.
- 125.** Rao Q, Williamson SR, Lopez-Beltran A, Montironi R, Huang W, Eble JN, Grignon DJ, Koch MO, Idrees MT, Emerson RE, Zhou XJ, Zhang S, Baldrige LA, Cheng L. Distinguishing primary adenocarcinoma of the urinary bladder from secondary involvement by colorectal adenocarcinoma: extended immunohistochemical profiles emphasizing novel markers. *Mod Pathol.* 2013; 26(5) : 725-32.
- 126.** Anstadt M.J., Shoup M., Lapetino S., Kapur U. Endometrial Adenocarcinoma Metastatic to the Colon Masquerading as a Primary Colon Cancer. *Journal of Gastroenterology and Hepatology Research* 2012; 1(3): 40-43
- 127.** van Wyk, Hester C. The detection and role of lymphatic and blood vessel invasion in predicting survival in patients with node negative operable primary colorectal cancer *Critical Reviews in Oncology / Hematology.* 2013;90 (1):77 - 90

- 128.** Villeneuve PJ, Sundaresan RS. Surgical Management of Colorectal Lung Metastasis. *Clinics in Colon and Rectal Surgery* 2009;22(4):233-241. doi:10.1055/s-0029-1242463.
- 129.** Santini D, Tampellini M, Vincenzi B, Ibrahim T, Ortega C, Virzi V, Silvestris N, Berardi R, Masini C, Calipari N, Ottaviani D, Catalano V, Badalamenti G, Giannicola R, Fabbri F, Venditti O, Fratto ME, Mazzara C, Latiano TP, Bertolini F, Petrelli F, Ottone A, Caroti C, Salvatore L, Falcone A, Giordani P, Addeo R, Aglietta M, Cascinu S, Barni S, Maiello E, Tonini G. Natural history of bone metastasis in colorectal cancer: final results of a large Italian bone metastases study. *Ann Oncol.* 2012 Aug;23(8):2072-7. doi: 10.1093/annonc/mdr572.
- 130.** Wang LM, Sheaha K. Prognostic markers in colorectal pathology: Is morphology enough? *Diagnostic Histopathology* 2011; 17(9):386-394. DOI: 10.1016/j.mpdhp.2011.06.016
- 131.** Ueno H, Shirouzu K, Eishi Y, Yamada K, Kusumi T, Kushima R, Ikegami M, Murata A, Okuno K, Sato T, et al. Characterization of perineural invasion as a component of colorectal cancer staging. *Am J Surg Pathol.* 2013;37:1542–1549
- 132.** Liebig, C., Ayala, G., Wilks, J. A., Berger, D. H. and Albo, D. Perineural invasion in cancer. *Cancer.* 2009; 115: 3379–3391. doi: 10.1002/cncr.24396
- 133.** Maguire A, Sheahan K. Controversies in the pathological assessment of colorectal cancer. *World Journal of Gastroenterology: WJG* 2014;20(29):9850-9861. doi:10.3748/wjg.v20.i29.9850.
- 134.** Goldstein NS, Turner JR. Pericolonic tumor deposits in patients with T3N+MO colon adenocarcinomas: markers of reduced disease free survival and intra-abdominal metastases and their implications for TNM classification. *Cancer.* 2000;88:2228–2238
- 135.** Wünsch K, Müller J, Jähnig H, Herrmann RA, Arnholdt HM, Märkl B. Shape is not associated with the origin of pericolonic tumor deposits. *Am J Clin Pathol.* 2010;133:388–394
- 136.** Mege D., Ouaisi M., Fuks D., Metellus P., Peltier J., Dufour H., Regimbeau JM., Dahan L., Slelezneff I., Sastre B. Patients with Brain Metastases from Colorectal Cancer Are Not Condemned *Anticancer Research* . 2013;33: 5645-5648
- 137.** Omranipour R, Abasahl A. Ovarian metastases in colorectal cancer. *Int J Gynecol Cancer.* 2009;19(9):1524-8. doi: 10.1111/IGC.0b013e3181a84011.
- 138.** Sokolov M, Toshev S, Todorov G, Velev G, Maslyankov C. Per magna-ovarian metastases from primary locally advanced colorectal cancer--a review of the literature with a description of three clinical cases. *Khirurgiia (Sofia).* 2013;(3):39-47.

- 139.** Abi Saad GS, Hussein M, E-Saghir NS, Termos S, Sharara AI, Shamseddine A. Isolated splenic metastasis from colorectal cancer. *Int J Clin Oncol.* 2011;16(4):306-13. doi: 10.1007/s10147-010-0182-2.
- 140.** Chatterjee S., Scott J., Wadehra V, White S., Nayar M. Solitary metastasis to the pancreas from colorectal cancer– A case report and literature review. *BJMP* 2012;5(2):a516
- 141.** H. Jabir, N. Tawfiq, M. Moukhlissi, et al., “Metachronous Bilateral Isolated Adrenal Metastasis from Rectal Adenocarcinoma: A Case Report,” *Case Reports in Gastrointestinal Medicine*, vol. 2014, Article ID 516403, 4 pages, 2014. doi:10.1155/2014/516403
- 142.** Venkitaraman R, George M, Weerasooriya S, Selva-Nayagam S. Late solitary testicular metastasis from rectal cancer. *J Cancer Res Ther.* 2010 Jan-Mar;6(1):89-91. doi: 10.4103/0973-1482.63562.
- 143.** Lo Russo G, Accarpio F., Spinelli G, Miele E. Borrini F. Cerbone L. Stati V., Prinzi N., Strudel M., Sibio S., Tomao S. Subcutaneous metastases from colon cancer: a case report *Journal of Medical Case Reports* 2012; 6:212 doi:10.1186/1752-1947-6-212
- 144.** Landriscina M., Gerardi A., Fersini A., “Multiple Skeletal Muscle Metastases from Colon Carcinoma Preceded by Paraneoplastic Dermatomyositis,” *Case Reports in Medicine*, 2013, Article ID 392609, 4 pages, 2013. doi:10.1155/2013/392609
- 145.** .Patel SA, Herfel BM, Nolan MA. Metastatic Colon Cancer Involving the Right Atrium. *Texas Heart Institute Journal* 2012;39(1):79-83.
- 146.** Dukes C: The classification of cancer of the rectum. *J Pathol Bacteriol* 1932; 35:323-332.
- 147.** Astler VB, Collier FA. The prognostic significance of direct extension of carcinoma of the colon and rectum. *Ann Surg* 1954;139:846 .
- 148.** Kang H, O'Connell JB, Maggard MA, et al: A 10-year outcomes evaluation of mucinous and signet ring cell carcinoma of the colon and rectum. *Dis Colon Rectum* 2005;48:161
- 149.** Lanza G., Messerini L., Gafà R., Risio M. Colorectal tumors: The histology report. *Digestive and Liver Disease* 2011; 43: 344–355
- 150.** Resch A, Langner C. Lymph node staging in colorectal cancer: old controversies and recent advances. *World J Gastroenterol.* 2013;19:8515–8526.
- 151.** Chou JF, Row D, Gonen M, Liu YH, Schrag D, Weiser MR. Clinical and pathologic factors that predict lymph node yield from surgical specimens in colorectal cancer: a population-based study. *Cancer.* 2010;116:2560–2570.

- 152.** Onitilo AA, Stankowski RV, Engel JM, Doi SA. Adequate lymph node recovery improves survival in colorectal cancer patients. *J Surg Oncol.* 2013;107(8):828-34. doi: 10.1002/jso.23332. Epub 2013 Apr 16.
- 153.** Chang GJ, Rodriguez-Bigas MA, Skibber JM, Moyer VA. *J Natl Cancer Inst.* Lymph node evaluation and survival after curative resection of colon cancer: systematic review. 2007 Mar 21;99(6):433-41.
- 154.** Compton, C. Colorectal carcinoma: Diagnostic, prognostic, and molecular features. *Mod. Pathol.* 2003, 16, 376-388.
- 155.** Mori, T.; Hirota, T.; Ohashi, Y.; Kodaira, S. Significance of histologic type of primary lesion and metastatic lymph nodes as a prognostic factor in stage III colon cancer. *Dis. Colon Rectum* 2006; 49, 982-992.
- 156.** Choi, P.W.; Yu, C.S.; Jang, S.J.; Jung, S.H.; Kim, H.C.; Kim, J.C. Risk factors for lymph node metastasis in submucosal invasive colorectal cancer. *World J. Surg.* 2008; 32, 2089-2094.
- 157.** Quirke P, Durdey P, Dixon MF, Williams NS: Local recurrence of rectal adenocarcinoma due to inadequate surgical resection: Histopathological study of lateral tumour spread and surgical excision. *Lancet* 1986; 2:996-999.,
- 158.** Quirke P, Williams GT, Ectors N, et al. The future of the TNM staging system in colorectal cancer: time for a debate? *Lancet Oncol* 2007;8:651–7.
- 159.** Nagtegaal ID, Quirke P. What is the role for the circumferential margin in the modern treatment of rectal cancer? *J Clin Oncol* 2008;26:303–12.
- 160.** Barresi V, Reggiani Bonetti L, Vitarelli E, Di Gregorio C, Ponz de Leon M, Barresi G. Immunohistochemical assessment of lymphovascular invasion in stage I colorectal carcinoma: prognostic relevance and correlation with nodal micrometastases. *Am J Surg Pathol.* 2012 ;36(1):66-72. doi: 10.1097/PAS.0b013e31822d3008.
- 161.** Sleeman JP, Thiele W. Tumor metastasis and the lymphatic vasculature. *Int J Cancer.* 2009;125(12):2747-56. doi: 10.1002/ijc.24702.
- 162.** Messenger DE, Driman DK, Kirsch R. Developments in the assessment of venous invasion in colorectal cancer: implications for future practice and patient outcome. *Hum Pathol.* 2012;43(7):965-73. doi: 10.1016/j.humpath.2011.11.015. Epub 2012 Mar 9.
- 163.** Betge J, Pollheimer MJ, Lindtner RA, Kornprat P, Schlemmer A, Rehak P, Vieth M, Hoefler G, Langner C. Intramural and extramural vascular invasion in colorectal cancer:

prognostic significance and quality of pathology reporting. *Cancer*. 2012;118(3):628-38. doi: 10.1002/encr.26310.

164. . Ćuk, M., Ušaj, S. K., Klem, I., Gajanin, R., Batinić-Škipina, D., Marić, R., Dukić-Vladičić, N. Prognostički značaj ekstramuralne venske invazije u kolorektalnom karcinomu. *Biomedicinska istraživanja* 2010;1(1), 5-12.

165. Liebig C, Ayala G, Wilks J, Verstovsek G, Liu H, Agarwal N, Berger D Albo D. Perineural invasion is an independent predictor of outcome in colorectal cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 2009; 27(31):5131-7. DOI: 10.1200/JCO.2009.22.4949

166. Poeschl EM, Pollheimer MJ, Kornprat P, Lindtner RA, Schlemmer A, Rehak P, Vieth M, Langner C. Perineural invasion: correlation with aggressive phenotype and independent prognostic variable in both colon and rectum cancer. *J Clin Oncol*. 2010;28:e358–e360; author reply e361-e362.

167. Peng J, Sheng W, Huang D, Venook AP, Xu Y, Guan Z, Cai S. Perineural invasion in pT3N0 rectal cancer: the incidence and its prognostic effect. *Cancer*. 2011;117:1415–1421.

168. Conti J., Thomas g. The Role of Tumour Stroma in Colorectal Cancer Invasion and Metastasis *Cancers* 2011, 3, 2160-2168; doi:10.3390/cancers3022160

169. Huh JW, Lee JH, Kim HR. Prognostic significance of tumor-infiltrating lymphocytes for patients with colorectal cancer. *Arch Surg* 2012;147(4):366–72. doi:10.1001/archsurg.2012.35

170. Ueno H, Hashiguchi Y, Shimazaki H, Shinto E, Kajiwara Y, Nakanishi K, Kato K, Maekawa K, Miyai K, Nakamura T, Yamamoto J, Hase K. Objective criteria for Crohn-like lymphoid reaction in colorectal cancer. *Am J Clin Pathol*. 2013;139(4):434-41

171. Pathak S, Poston GJ. Colorectal Liver Metastases; The Current Scenario. *Indian journal of surgical oncology* 2010;1(4):350-355. doi:10.1007/s13193-011-0066-6

172. Dhir M, Lyden ER, Wang A, Smith LM, Ullrich F, Are C. Influence of margins on overall survival after hepatic resection for colorectal metastasis: a meta-analysis. *Ann Surg*. 2011 Aug;254(2):234-42. doi: 10.1097/SLA.0b013e318223c609.

173. Cucchetti A, Ercolani G, Cescon M, Bigonzi E, Peri E, Ravaioli M, Pinna AD. Impact of subcentimeter margin on outcome after hepatic resection for colorectal metastases: a meta-regression approach. *Surgery*. 2012 May;151(5):691-9. doi: 10.1016/j.surg.2011.12.009. Epub 2012 Jan 18.

174. Kanas GP, Taylor A, Primrose JN, Langeberg WJ, Kelsh MA, Mowat FS, Alexander DD, Choti MA, Poston G. Survival after liver resection in metastatic colorectal cancer: review

and meta-analysis of prognostic factors. *Clin Epidemiol.* 2012;4:283-301. doi: 10.2147/CLEP.S34285. Epub 2012 Nov 7.

175. Feldman M, Friedman L.S, Brandt L.J : Sleisenger and Fordtran's gastrointestinal and liver disease: pathophysiology, diagnosis, management.(9th Edition), 2006, Saunders Elsevier 2006, pp.2786-7.

176. Labianca R, Nordlinger B, Beretta GD. Primary colon cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, adjuvant treatment and follow-up, *Ann Oncol.* 2010; 21(5):70-7

177. Krivokapić Z. Karcinom rektuma. Zavod za udžbenike Beograd, 2012, pp121-126.

178. Levin B., Lieberman DA., McFarland B., Smith RA., Brooks D., Andrews KS., Dash C., Giardiello FM., Glick S., Levin TR., Pickhardt P., Rex DK., Thorson A., Winawer SJ. American Cancer Society Colorectal Cancer Advisory Group; US Multi-Society Task Force; American College of Radiology Colon Cancer Committee: Screening and surveillance for the early detection of colorectal cancer and adenomatous polyps, 2008: a joint guideline from the American Cancer Society, the US Multi-Society Task Force on Colorectal Cancer, and the American College of Radiology. *CA Cancer J Clin* 2008; 58:130-160.

179. Holme Ø, Bretthauer M, Fretheim A, Odgaard-Jensen J, Hoff G. Flexible sigmoidoscopy versus faecal occult blood testing for colorectal cancer screening in asymptomatic individuals. *Cochrane Database Syst Rev.*2013;9:CD009259. doi: 10.1002/14651858.CD009259.pub2.

180. Gado A., Ebeid B. , Abdelmohsen A., Axon. Colorectal cancer in Egypt is commoner in young people: Is this cause for alarm?. *Alexandria Journal of Medicine.* 2014; 5(3):197–201.

181. Catalano V, Loupakis F., Graziano F., Bissoni R., Torresi U., Vincenzi B, Mari D., Giordani P., Alessandrini P., Salvatore L., Fornaro L., Santini D., Baldelli A.M., Rossi D., Giustini L., Silva R. Falcone A., D'Emidio S., Rocchi M., Luzi Fedeli S. Prognosis of mucinous histology for patients with radically resected stage II and III colon cancer. *Ann Oncol.* 2012 ;23(1):135-41. doi: 10.1093/annonc/mdr062. Epub 2011 Apr 29.

182. Stewart FW, Spies JW. Biopsy Histology in the Grading of Rectal Carcinoma. *The American Journal of Pathology* 1929;5(2):109-116.9.

183. JassJR, LoveSB, NorthoverJM. A new prognostic classification of rectal cancer. *Lancet* 1987; 1(8545):1303–6.doi:10.1016/S0140-6736(87)90552-6

184. Keum MA, Lim SB, Kim SA, Yoon YS, Kim CW, Yu CS, et al. Clinicopathologic factors affecting recurrence after curative surgery for stage I colorectal cancer. *J Korean Soc Coloproctol* 2012; 28(1):49–55. doi:10.3393/jksc.2012.28.1.49

- 185.** Akishima-Fukasawa Y, Ishikawa Y, Akasaka Y, Uzuki M, Inomata N, Yokoo T, et al. Histopathological predictors of regional lymph node metastasis at the invasive front in early colorectal cancer. *Histopathology* 2011; 59(3):470–81. doi:10.1111/j.1365-2559.2011.03964.
- 186.** Mitrovic B., Schaeffer D., Riddell R., Kirsch R.. Tumor budding in colorectal carcinoma: time to take notice. *Mod Pathol.* 2012; 25(10): 1315–1325.
- 187.** Rogers A., Gibbons D., M Hanly A., Hyland J., O'Connell R., Winter D., Sheahan K. Prognostic significance of tumor budding in rectal cancer biopsies before neoadjuvant therapy. *Modern Pathology* 2014;27, 156–162; doi:10.1038/modpathol.2013.124; published online 26 July 2013
- 188.** Homma Y, Hamano T, Otsuki Y, Shimizu S, Kobayashi H, Kobayashi Y. Severe tumor budding is a risk factor for lateral lymph node metastasis in early rectal cancers. *J Surg Oncol.* 2010;102(3):230-4. doi: 10.1002/jso.21606.
- 189.** Syk E, Lenander C., Nilsson P.J., Rubio C., Glimelius B.. Tumour budding correlates with local recurrence of rectal cancer. *Colorectal Dis.* 2011; 13(3): 255–262. doi: 10.1111/j.1463-1318.2009.02119.x
- 190.** Brown CE, Warren S. Visceral metastasis from rectal carcinoma. *SurgGynecol Obstet* 1938;66:611–21
- 191.** Sejben I, Bori R, Cserni G. Venous invasion demonstrated by orcein staining of colorectal carcinoma specimens is associated with the development of distant metastasis. *J Clin Pathol.* 2010;63:575–578.
- 192.** Akagi Y, Adachi Y, Ohchi T, Kinugasa T, Shirouzu K. Prognostic impact of lymphatic invasion of colorectal cancer: a single-center analysis of 1,616 patients over 24 years. *Anticancer Res.* 2013;33:2965–2970
- 193.** Kojima M, Shimazaki H, Iwaya K, Kage M, Akiba J, Ohkura Y, Horiguchi S, Shomori K, Kushima R, Ajioka Y, et al. Pathological diagnostic criterion of blood and lymphatic vessel invasion in colorectal cancer: a framework for developing an objective pathological diagnostic system using the Delphi method, from the Pathology Working Group of the Japanese Society for Cancer of the Colon and Rectum. *J Clin Pathol.* 2013;66:551–558.
- 194.** Messenger DE, Driman DK, McLeod RS, Riddell RH, Kirsch R. Current practice patterns among pathologists in the assessment of venous invasion in colorectal cancer. *J Clin Pathol.* 2011;64:983–989.
- 195.** Kojima M, Shimazaki H, Iwaya K, Kage M, Akiba J, Ohkura Y, Horiguchi S, Shomori K, Kushima R, Ajioka Y, Nomura S, Ochiai A. Pathological diagnostic criterion of blood and

lymphatic vessel invasion in colorectal cancer: a framework for developing an objective pathological diagnostic system using the Delphi method, from the Pathology Working Group of the Japanese Society for Cancer of the Colon and Rectum. *J Clin Pathol.* 2013 Jul;66(7):551-8. doi: 10.1136/jclinpath-2012-201076.

196. Weiser MR, Landmann RG, Kattan MW, Gonen M, Shia J, Chou J, Paty PB, Guillem JG, Temple LK, Schrag D, et al. Individualized prediction of colon cancer recurrence using a nomogram. *J Clin Oncol.* 2008;26:380–385

197. Liebl F, Demir IE, Rosenberg R, Boldis A, Yildiz E, Kujundzic K, Kehl T, Dischl D, Schuster T, Maak M, et al. The severity of neural invasion is associated with shortened survival in colon cancer. *Clin Cancer Res.* 2013;19:50–61

198. Secen S, Moljević N, Vuković M, Somer L. Histopathological finding as a prognostic factor of the surgical treatment outcome in colorectal cancer. *Vojnosanit Pregl.* 2010 Aug;67(8):638-43.

199. Zhou L, Zhag G, Tang T, Lian R, Wang W. Retrospective analysis of clinical and pathologic risk factors in liver resection for hepatic colorectal metastases. *J Cancer Res Ther.* 2013;9:178-82 doi: 10.4103/0973-1482.122521.

200. Powell D. W., Adegboyega P. A., Di Mari J. F Mifflin R. C., Epithelial Cells and Their Neighbors I. Role of intestinal myofibroblasts in development, repair, and cancer *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005;289:G2-G7, doi:10.1152/ajpgi.00075.2005.

201. Frantz C, Stewart KM, Weaver VM. The extracellular matrix at a glance. *J Cell Sci* 2010; 123:4195-200; PMID:21123617; <http://dx.doi.org/10.1242/jcs.023820>.

202. Cox TR, Ertler JT. Remodeling and homeostasis of the extracellular matrix: implications for fibrotic diseases and cancer. *Dis Model Mech* 2011; 4:165-78; PMID: 21324931

203. Rozario, T., deSimone, D. W. The extracellular matrix in development and morphogenesis: a dynamic view. *Dev. Biol.* 2010;34:, 126-140.

204. Egeblad, M., Rasch, M. G., Weaver, V. M. Dynamic interplay between the collagen scaffold and tumor evolution. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2010; 22: 697-706.

205. Xian, X., Gopal, S. Couchman, J. R.. Syndecans as receptors and organizers of the extracellular matrix. *Cell Tissue Res.* 2010; 339, 31-46.,

206. Schmidt, S. Friedl, P.. Interstitial cell migration: integrin-dependent and alternative adhesion mechanisms. *Cell Tissue Res.* 2010 ; 339, 83-92.

207. Hynes RO. The extracellular matrix: not just pretty fibrils. *Science* 2009; 326:1216-9; PMID:19965464;<http://dx.doi.org/10.1126/science.1176009>,

- 208.** Schultz GS, Wysocki A. Interactions between extracellularmatrix and growth factors in wound healing. *Wound Repair Regen* 2009; 17:153-62.
- 209.** Paget S. The distribution of secondary growths in cancer of the breast. 1889. *Cancer Metastasis Rev.* 1989;8(2):98-101
- 210.** Ahmed D, Eide PW, Eilertsen IA, Danielsen SA, Eknæs M, Hektoen M, Lind GE, Lothe RA. Epigenetic and genetic features of 24 colon cancer cell lines. *Oncogenesis.* 2013;2:e71. doi: 10.1038/oncsis.2013.35.
- 211.** Mouradov D, Sloggett C, Jorissen RN, Love CG, Li S, Burgess AW, Arango D, Strausberg RL, Buchanan D, Wormald S, O'Connor L, Wilding JL, Bicknell D, Tomlinson IP, Bodmer WF, Mariadason JM, Sieber OM. Colorectal cancer cell lines are representative models of the main molecular subtypes of primary cancer. *Cancer Res.* 2014 ;74(12):3238-47. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-14-0013.
- 212.** De Wever, O., Demetter, P., Mareel, M. and Bracke, M.. Stromal myofibroblasts are drivers of invasive cancer growth. *Int. J. Cancer.* 2008; 123, 2229-2238.
- 213.** Kessenbrock, K., Plaks, V. Werb, Z . Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. *Cell* 2010; 141, 52-67.
- 214.** Butcher, D. T., Alliston, T. Weaver, V. M.. A tense situation: forcing tumour progression. *Nat. Rev. Cancer* 9, 2009; Feb;9(2):108-22
- 215.** Conklin MW, Keely PJ. Why the stroma matters in breast cancer: insights into breast cancer patient outcomes through the examination of stromal biomarkers. *Cell Adh Migr.* 2012;6(3):249-60. doi: 10.4161/cam.20567.
- 216.** Hasebe T. Tumor-stromal interactions in breast tumor progression--significance of histological heterogeneity of tumor-stromal fibroblasts. *Expert Opin Ther Targets.* 2013 ;17(4):449-60. doi: 10.1517/14728222.2013.757305.
- 217.** Hasebe T, Iwasaki M, Akashi-Tanaka S, Hojo T, Shimizu C, Andoh M, Fujiwara Y, Shibata T, Sasajima Y, Kinoshita T, Tsuda H. Atypical tumor-stromal fibroblasts in invasive ductal carcinomas of the breast treated with neoadjuvant therapy. *Hum Pathol.* 2011 ;42(7):998-1006. doi: 10.1016/j.humpath.2010.10.020.
- 218.** Lee C, Jia Z., Rahmatpanah F., Zi X., McClelland M., Mercolaet D., "Role of the Adjacent Stroma Cells in Prostate Cancer Development and Progression: Synergy between TGF- β and IGF Signaling," *Biomed Res Int.* 2014;2014:502093. doi: 10.1155/2014/502093.

- 219.** Adegboyega PA, Mifflin RC, DiMari JF. Immunohistochemical study of myofibroblasts in normal colonic mucosa, hyperplastic polyps, and adenomatous colorectal polyps. *ArchPathol Lab Med* 2002;126(7):829-36.
- 220.** Hawinkels, Lukas JAC, et al. "Active TGF- β 1 correlates with myofibroblasts and malignancy in the colorectal adenoma-carcinoma sequence." *Cancer science* 2009; 100(4):663-70
- 221.** Hagan S, Orr MCM, Doyle B. Targeted therapies in colorectal cancer—an integrative view by PPPM. *The EPMA Journal* 2013;4(1):3. doi:10.1186/1878-5085-4-3.
- 222.** Otranto M, Sarrazy V, Bonté F, Hinz B, Gabbiani G, Desmoulière A. The role of the myofibroblast in tumor stroma remodeling. *Cell Adh Migr.* 2012;6(3):203-19. doi: 10.4161/cam.20377. Epub 2012 May 1.
- 223.** Powell DW, Pinchuk IV, Saada JI, Chen X, Mifflin RC. Mesenchymal cells of the intestinal lamina propria. *Annu Rev Physiol.* 2011;73:213-37. doi: 10.1146/annurev.physiol.70.113006.100646.
- 224.** Festa E, Fretz J, Berry R, Schmidt B, Rodeheffer M, Horowitz M, et al. Adipocyte lineage cells contribute to the skin stem cell niche to drive hair cycling. *Cell.* 2011;146:761–71.
- 225.** Yamanishi H, Fujiwara S, Soma T. Perivascular localization of dermal stem cells in human scalp. *Exp Dermatol.* 2012;21:78–80. doi: 10.1111/j.1600-0625.2011.01407.L
- 226.** Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest.* 2009;119:1420–8. doi: 10.1172/JCI39104
- 227.** Micallef L, Vedrenne N, Billet F, Coulomb B, Darby IA, Desmoulière A. The myofibroblast, multiple origins for major roles in normal and pathological tissue repair. *Fibrogenesis & Tissue Repair.* 2012;5(1):5. doi:10.1186/1755-1536-5-S1-S5.
- 228.** Rao K.B, Malathi N, Narashiman S, Rajan ST. Evaluation of myofibroblasts by expression of alpha smooth muscle actin: a marker in fibrosis, dysplasia and carcinoma. *J Clin Diagn Res.* 2014 ;8(4):ZC14-7. doi: 10.7860/JCDR/2014/7820.4231.
- 229.** Mifflin RC, Pinchuk IV, Saada JI, Powell DW. Intestinal myofibroblasts: targets for stem cell therapy. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2011;300(5):G684-96. doi: 10.1152/ajpgi.00474.2010.
- 230.** Eyden B. The myofibroblast, electron microscopy and cancer research. *Int J Cancer.* 2009 ;125(7):1743-5; author reply 1746. doi: 10.1002/ijc.24550.

- 231.** Rosai J: Colon. In : Rosai and Ackerman's Surgical Pathology (10thEdition), Elsevier, 2011, pp:2106-2192.
- 232.** Klingberg F, Hinz B, White ES. The myofibroblast matrix: implications for tissue repair and fibrosis. *J Pathol.* 2013;229(2):298-309. doi: 10.1002/path.4104
- 233.** Midgley AC, Rogers M, Hallett MB, Clayton A, Bowen T, Phillips AO, Steadman R. Transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1)-stimulated fibroblast to myofibroblast differentiation is mediated by hyaluronan (HA)-facilitated epidermal growth factor receptor (EGFR) and CD44 co-localization in lipid rafts. *J Biol Chem.* 2013;288(21):14824-38. doi: 10.1074/jbc.M113.451336.
- 234.** Meulmeester E, Ten Dijke P. The dynamic roles of TGF- β in cancer. *J Pathol.* 2011;223:205–18..
- 235.** Labelle M, Begum S, Hynes RO. Direct signaling between platelets and cancer cells induces an epithelial-mesenchymal-like transition and promotes metastasis. *Cancer Cell.* 2011;20:576–90.
- 236.** Ikushima H, Miyazono K. TGFbeta signalling: a complex web in cancer progression. *Nat Rev Cancer.* 2010;10:415–24.
- 237.** Joshi A, Cao D. TGF-beta signaling, tumor microenvironment and tumor progression: the butterfly effect. *Front Biosci.* 2010;15:180–94
- 238.** Kojima Y, Acar A, Eaton EN, Mellody KT, Scheel C, Ben-Porath I, et al. Autocrine TGF-beta and stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) signaling drives the evolution of tumor-promoting mammary stromal myofibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107:20009–14.
- 239.** Hinz B. Tissue stiffness, latent TGF-beta1 activation, and mechanical signal transduction: implications for the pathogenesis and treatment of fibrosis. *Curr Rheumatol Rep.* 2009;11:120–6.
- 240.** Webber, J.; Jenkins, R.H.; Meran, S.; Phillips, A.; Steadman, R. Modulation of TGFbeta1-dependent myofibroblast differentiation by hyaluronan. *Am. J. Pathol.* 2009; 175, 148-160.
- 241.** Baum J, Duffy HS Fibroblasts and myofibroblasts: what are we talking about? *J Cardiovasc Pharmacol.* 2011 ;57(4):376-9. doi: 10.1097/FJC.0b013e3182116e39,
- 242.** Sridhara SU, Choudaha N, Kasetty S, Joshi PS, Kallianpur S, Tijare M. Stromal myofibroblasts in nonmetastatic and metastatic oral squamous cell carcinoma: An immunohistochemical study. *J Oral Maxillofac Pathol.* 2013;17(2):190-4. doi: 10.4103/0973-029X.119758.

- 243.** Seifi S, Shafaei S, Shafigh E, Sahabi SM, Ghasemi H. Myofibroblast stromal presence and distribution in squamous epithelial carcinomas, oral dysplasia and hyperkeratosis. *Asian Pac J Cancer Prev* 2010; 11: 359-364.
- 244.** Sampson N, Koziel R, Zenzmaier C et al. ROS signaling by NOX4 drives fibroblast-to-myofibroblast differentiation in the diseased prostatic stroma. *Mol Endocrinol* 2011; 25: 503-515.
- 245.** Angeli F, Koumakis G, Chen MC, Kumar S, Delinassios JG. Role of stromal fibroblasts in cancer: promoting or impeding? *Tumor Biol* 2009; 30: 109-120.
- 246.** Connolly EC, Freimuth J, Akhurst RJ. Complexities of TGF- β targeted cancer therapy. *Int J Biol Sci.* 2012;8(7):964-78. doi: 10.7150/ijbs.4564. Epub 2012 Jul 12.
- 247.** Kapse S, Rathod N., Baad R., Mandlik J., Sharma A., Bommanavar S. Quantitative Assessment of Myofibroblast in Severe Dysplasia, Microinvasion and Oral Squamous Cell Carcinoma .*The Journal of Contemporary Dental Practice*, January-February 2013;14(1):34-38
- 248.** Mendes, R. A., Carvalho, J. F., & van der Waal, I.Characterization and management of the keratocystic odontogenic tumor in relation to its histopathological and biological features. *Oral oncology.* 2010; 46(4), 219-225.
- 249.** Ochicha O, Pringle JH, Mohammed AZ.Immunohistochemical study of epithelial-myofibroblast interaction in Barrett metaplasia. *Indian J Pathol Microbiol.* 2010 ;53(2):262-6. doi: 10.4103/0377-4929.64341.
- 250.** Cui, G.; Yuan, A.; Vonen, B.; Florholmen, J. Progressive cellular response in the lamina propria of the colorectal adenoma—Carcinoma sequence. *Histopathology* 2009; 54: 550-560.
- 251.** Pavlakis K, Messini I, Vrekoussis T, Yiannou P, Keramopoulos D, Louvrou N, Liakakos T, Stathopoulos EN. The assessment of angiogenesis and fibroblastic stromagenesis in hyperplastic and pre-invasive breast lesions. *BMC Cancer* 2008; DOI:10.1186/1471-2407-8-88
- 252.** Slany A, Haudek-Prinz V, Zwickl H, Stättner S, Grasl-Kraupp B, Gerner C. Myofibroblasts are important contributors to human hepatocellular carcinoma: evidence for tumor promotion by proteome profiling. *Electrophoresis.* 2013;34(24):3315-25. doi: 10.1002/elps.201300326.
- 253.** Bridle K. R., Crawford D. H., Powell L. W., Ramm G. A., Role of myofibroblasts in tumour encapsulation of hepatocellular carcinoma in haemochromatosis, *Liver*, 2001; 21(2):96–104.

- 254.** Darby IA, Vuillier-Devillers K, Pinault E, Sarrazy V, Lepreux S, Balabaud C, Bioulac-Sage P, Desmoulière A. Proteomic analysis of differentially expressed proteins in peripheral cholangiocarcinoma. *Cancer Microenviron.* 2010;4(1):73-91. doi: 10.1007/s12307-010-0047-2.
- 255.** Tsujino T, Seshimo I, Yamamoto H et al. Stromal myofibroblasts predict disease recurrence for colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2007; 13: 2082–90.
- 256.** Dabb D. Diagnostic immunohistochemistry: theranostic and genomic applications. theranostic and genomic applications. (4th Edition). Elsevier Saunders 2014, p: 77.
- 257.** Arnoldi R, Chaponnier C., Gabbiani G., Hinz B. Heterogeneity of smooth muscle. In: Hill J, ed. *Muscle: Fundamental Biology and Mechanisms of Disease*: Elsevier Inc, 2012.
- 258.** Ohno K, Fujimori T, Okamoto Y, Ichikawa K, Yamaguchi T, Imura J, Tomita S, Mitomi H. Diagnosis of desmoplastic reaction by immunohistochemical analysis, in biopsy specimens of early colorectal carcinomas, is efficacious in estimating the depth of invasion. *Int J Mol Sci.* 2013;14(7):13129-36. doi: 10.3390/ijms140713129.
- 259.** Liang P., Wei hong J., Ubukata H., Liu G., Katano M., Motohashi G., Kasuga T., Watanabe Y., Nakada I, Tabuchi T. Myofibroblasts Correlate with Lymphatic Microvessel Density and Lymph Node Metastasis in Early-stage Invasive Colorectal Carcinoma. *Anticancer research* 2005; 25: 2705-2712.
- 260.** Alexa A., Baderca F., Lighezan R., Izvernariu D., Myofibroblasts reaction in urothelial carcinomas. *Romanian Journal of Morphology and Embryology* 2009, 50(4):639–643
- 261.** Mueller M., Fusenig N.. Tumor associated fibroblasts and their matrix. Springer. . 2011; pp37-75.
- 262.** Catteau X, Simon P, Vanhaeverbeek M, Noël J-C. Variable Stromal Periductular Expression of CD34 and Smooth Muscle Actin (SMA) in Intraductal Carcinoma of the Breast. Aziz SA, ed. *PLoS ONE.* 2013;8(3):e57773. doi:10.1371/journal.pone.0057773.
- 263.** Sridhara SU, Choudaha N, Kasetty S, Joshi PS, Kallianpur S, Tijare M. Stromal myofibroblasts in nonmetastatic and metastatic oral squamous cell carcinoma: An immunohistochemical study. *J Oral Maxillofac Pathol.* 2013 May;17(2):190-4. doi: 10.4103/0973-029X.119758.
- 264.** Yeung T.M., Buskens C., Wang L.M., Mortensen N.J, Bodmer W.F. Myofibroblast activation in colorectal cancer lymph node metastases *Br J Cancer.* 2013; 108(10): 2106–2115.

- 265.** Catteau X, Simon P, Noël J-C. Myofibroblastic reaction is a common event in metastatic disease of breast carcinoma: a descriptive study. *Diagnostic Pathology*. 2014;9:196. doi:10.1186/s13000-014-0196-6.
- 266.** Dvorak HF. Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *NEngl JMed* 1986;315:1650-9
- 267.** DuFort CC, Paszek MJ, Weaver VM. Balancing forces: architectural control of mechanotransduction. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2011;12:308–19.
- 268.** Santhanam AN, Baker AR, Hegamyer G, Kirschmann DA, Colburn NH. Pcd4 repression of lysyl oxidase inhibits hypoxia-induced breast cancer cell invasion. *Oncogene*. 2010;29:3921–32.
- 269.** Barker HE, Chang J, Cox TR, Lang G, Bird D, Nicolau M, et al. LOXL2-mediated matrix remodeling in metastasis and mammary gland involution. *Cancer Res*. 2011;71:1561–72.
- 270.** Levental KR, Yu H, Kass L, Lakins JN, Egeblad M, Erler JT, et al. Matrix crosslinking forces tumor progression by enhancing integrin signaling. *Cell*. 2009;139:891–906.
- 271.** Swartz MA, Fleury ME. Interstitial flow and its effects in soft tissues. *Annu Rev Biomed Eng*. 2007;9:229–56.
- 272.** Pandol S., Edderkaoui M, Gukovsky I, Lugea A, Gukovskaya A. Desmoplasia of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2009 Nov;7(11 Suppl):S44-7. doi: 10.1016/j.cgh.2009.07.039.
- 273.** Sonnylal S, Shi-Wen X, Leoni P, Naff K, Van Pelt CS, Nakamura H, Leask A, Abraham D, Bou-Gharios G, de Crombrughe B. Selective expression of connective tissue growth factor in fibroblasts in vivo promotes systemic tissue fibrosis. *Arthritis Rheum*. 2010 ;62(5):1523-32. doi: 10.1002/art.27382.,
- 274.** Ruiter D, Bogenrieder T, Elder D, Herlyn M. Melanoma-stroma interactions: structural and functional aspects. *Lancet Oncol*. 2002;3:35–43
- 275.** Brunner S., Kesselring R , Rubner C , Martin M., Jeite T., Boerner T., Ruemmele P, Schlitt H, Fichtner S. Tumor containment by immune cells and fibrotic capsule improve survival of patients following resection of colorectal liver metastasis. *Z Gastroenterol*. 2014;52:4-51DOI: 10.1055/s-0033-1361004
- 276.** Lee J., Campbell J. Role of desmoplasia in cholangiocarcinoma and hepatocellular carcinoma *Journal of Hepatology*. 2014; 61 (2): 432–434

- 277.** Koperek O, Asari R, Niederle B, Kaserer K. Desmoplastic stromal reaction in papillary thyroid microcarcinoma. *Histopathology*. 2011;58(6):919-24. doi: 10.1111/j.1365-2559.2011.03791.x. Epub 2011 Apr 11.
- 278.** Merika E., Syrigos K., Saif M. Desmoplasia in Pancreatic Cancer. Can We Fight It? *Gastroenterology Research and Practice, Gastroenterol Res Pract*. 2012; 2012:781765. doi: 10.1155/2012/781765. Epub 2012 Oct 22.
- 279.** Yang MH Lin BR, Chang CH, Chen ST, Lin SK, Kuo MY, Jeng YM, Kuo ML, Chang CC. Connective tissue growth factor modulates oral squamous cell carcinoma invasion by activating a miR-504/FOXP1 signalling *Oncogene*. 2012;31(19):2401-11.
- 280.** Caporale A, Amore Bonapasta S, Scarpini M, Ciardi A, Vestri A, Ruperto M, Giuliani A. Quantitative investigation of desmoplasia as a prognostic indicator in colorectal cancer. *J Invest Surg*. 2010 ;23(2):105-9.
- 281.** Tomita S, Ichikawa K., Fujimori T. Desmoplastic Reaction in Biopsy Specimens of T1 Stage Colorectal Cancer Plays a Critical Role in Defining the Level of Sub-Mucosal Invasion *Colonoscopy and Colorectal Cancer Screening – Future Directions* 2013;7;161-176.
- 282.** Matsuda T, Fukuzawa M, Uraoka T, Nishi M, Yamaguchi Y, Kobayashi N, Ikematsu H, Saito Y, Nakajima T, Fujii T, Murakami Y, Shimoda T, Kushima R, Fujimori T. Risk of lymph node metastasis in patients with pedunculated type early invasive colorectal cancer: a retrospective multicenter study. *Cancer science* 2011;102(9):1693-1697
- 283.** Mou S, Soetikno R, Shimoda T, Rouse R, Kaltenbach T. Pathologic predictive factors for lymph node metastasis in submucosal invasive (T1) colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *Surg Endosc*. 2013;27(8):2692-703. doi: 10.1007/s00464-013-2835-5. Epub 2013 Feb 8.
- 284.** Hirose M, Fukui H, Igarashi Y, Fujimori Y, Katake Y, Sekikawa A, Ichikawa K, Tomita S, Imura J, Ajioka Y, Ueno H, Hase K, Ohkura Y, Kashida H, Togashi K, Nishigami T, Matsui T, Yao T, Wada R, Matsuda K, Watanabe T, Ochiai A, Sugai T, Sugihara K, Fujimori T. Detection of desmoplastic reaction in biopsy specimens is useful for predicting the depth of invasion of early colorectal cancer: a Japanese collaborative study. *Journal of gastroenterology* 2010;45(12): 1212-1218.
- 285.** Kimura R., Fujimori T., Ichikawa T., Ajioka I., Ueno H. Ohkura Y., Kashida H., Togashi K., Yao Y., Wada R., Watanabe T., Ochiai A., Sugai T., Sugihara K., Igarashi Y. Desmoplastic reaction in biopsy specimens of early colorectal cancer: A Japanese prospective multicenter study *Pathology International* 2012; 62: 525–531.

- 286.** Rosai J: Colon. In : Rosai and Ackerman's Surgical Pathology (10thEdition), Elsevier, 2011, pp:37-73
- 287.** Sis B, Sarioglu S, Sokmen S, Sakar M, Kupelioglu A, Fuzun M.Desmoplasia measured by computer assisted image analysis: An independent prognostic marker in colorectal carcinoma. *JClin Pathol* 2005; 58: 32–8.
- 288.** Espinosa I, Catusus L, D' Angelo E, Mozos A, Pedrola N, Bértolo C, Ferrer I, Zannoni GF, West RB, van de Rijn M, Matias-Guiu X, Prat J. Stromal signatures in endometrioid endometrial carcinomas. *Mod Pathol.* 2014;27(4):631-9. doi: 10.1038/modpathol.2013.131. Epub 2013 Nov 22.
- 289.** Crispino, P., De Toma, G., Ciardi, A., Bella, A., Rivera, M., Cavallaro, G., ... & Paoluzi, P. Role of desmoplasia in recurrence of stage II colorectal cancer within five years after surgery and therapeutic implication. *Cancer investigation.* 2008; 26(4): 419-425.
- 290.** Stephenson J, Goddard J., Al-Ta'an O, Dennison A., Morgan B. Tumour Angiogenesis: A Growth Area—From John Hunter to Judah Folkman and Beyond. *Journal of Cancer Research*, vol. 2013, Article ID 895019, 6 pages, 2013. doi:10.1155/2013/895019.
- 291.** Folkman, “History of angiogenesis,” in *Angiogenesis: An Integrative Approach From Science to Medicine*, W. D. Figg and J. Folkman, Eds., Springer, 2008.
- 292.** Folkman J, Klagsbrun M: Angiogenic factors. *Science* 1987, 235:442–447. 5. Ellis LM, Hicklin DJ: VEGF-targeted therapy: mechanisms of anti-tumour activity. *Nat Rev Cancer* 2008, 8:579–591.
- 293.** Baeriswyl V, Christofori G.The angiogenic switch in carcinogenesis. *Semin Cancer Biol.* 2009t;19(5):329-37. doi: 10.1016/j.semcaner.2009.05.003.
- 294** Bickel ST, Juliano JD, Nagy JD . Evolution of Proliferation and the Angiogenic Switch in Tumors with High Clonal Diversity. *PLoS ONE* 2014; 9(4): e91992. doi:10.1371/journal.pone.0091992
- 295.** Ziyad S, Iruela-Arispe ML. Molecular Mechanisms of Tumor Angiogenesis. *Genes & Cancer.* 2011;2(12):1085-1096. doi:10.1177/1947601911432334.
- 296.** Sundaram P, Hultine S, Smith LM, Dews M, Fox JL, Biyashev D, Schelter JM, Huang Q, Cleary MA, Volpert OV, Thomas-Tikhonenko A.p53-responsive miR-194 inhibits thrombospondin-1 and promotes angiogenesis in colon cancers. *Cancer Res.* 2011 Dec 15;71(24):7490-501. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-11-1124.

- 297.** Nussrat FL, Ali HH, Hussein HG, Al-Ukashi RJ. Immunohistochemical Expression of ki-67 and p53 in Colorectal Adenomas: A Clinicopathological Study. *Oman Medical Journal*. 2011;26(4):229-234. doi:10.5001/omj.2011.57.
- 298.** Sun W .Angiogenesis in metastatic colorectal cancer and the benefits of targeted therapy. *J Hematol Oncol*. 2012;5:63. doi: 10.1186/1756-8722-5-63.
- 299 .** Grünewald, F. S., Prota, A. E., Giese, A., & Ballmer-Hofer, K. Structure–function analysis of VEGF receptor activation and the role of coreceptors in angiogenic signaling. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*. 2010;1804(3), 567-580.
- 300.** Campbell N, Kellenberger L., Greenaway J., Moorehead R., Linnerth-Petrik N., Petrik J. Extracellular Matrix Proteins and Tumor Angiogenesis. *Journal of oncology*, 2010, 2010. doi:10.1155/2010/586905
- 301.** Nagy JA, Chang S-H, Shih S-C, Dvorak AM, Dvorak HF. Heterogeneity of the tumor vasculature. *Semin Thromb Hemost*. 2010;36:321-31
- 302.** Fukumura D, Jain RK. Tumor microenvironment abnormalities: causes, consequences, and strategies to normalize. *J Cell Biochem*. 2007;101: 937-4
- 303.** Fukumura D, Duda DG, Munn LL, Jain RK: Tumor microvasculature and microenvironment: novel insights through intravital imaging in preclinical models. *Microcirculation* 2010, 17:206–225.
- 304.** Folkman J. “Tumor angiogenesis: therapeutic implications,”*New England Journal of Medicine*, 1971;.285 (21): 1182–1186
- 305.** Jitawatanarat P, Wee W. Update on antiangiogenic therapy in colorectal cancer: aflibercept and regorafenib. *Journal of Gastrointestinal Oncology*. 2013;4(2):231-238. doi:10.3978/j.issn.2078-6891.2013.008.
- 306.** Rahman M, Selvarajan K, Hasan MR, et al. Inhibition of COX-2 in Colon Cancer Modulates Tumor Growth and MDR-1 Expression to Enhance Tumor Regression in Therapy-Refractory Cancers In Vivo. *Neoplasia (New York, NY)*. 2012;14(7):624-633.
- 307.** Günther K, Radkow T, Reymond MA, Pflüger R, Dimmler A, Hohenberger W, Papadopoulos T. Angiogenesis and dendritic cell density are not correlated with metachronous distant metastasis in curatively operated rectal cancer. *Int J Colorectal Dis*. 2003 Jul;18(4):300-8.
- 308.** Rajaganeshan R., Prasa R., Guillo P., Chalmers C., Scott N., Sarkar R, Poston G., Jayn G.. The influence of invasive growth pattern and microvessel density on prognosis in

colorectal cancer and colorectal liver metastases *British Journal of Cancer*. 2007;96, 1112–1117. doi:10.1038/sj.bjc.6603677

309. Nico B, Benagiano V, Mangieri D, Maruotti N, Vacca A, Ribatti D. Evaluation of microvascular density in tumors: pro and contra. *Histol Histopathol*. 2008 May;23(5):601-7.

310. Gresta, L. T., I. A. R. Júnior, and M. M. D. Á. Cabral. "Microvessel Density Quantification in Gastric Cancer: Comparing Methods for Standard Measures." *J Cancer Sci Ther* 2014;6: 401-405.

311. Dabb D. Diagnostic immunohistochemistry: theranostic and genomic applications. theranostic and genomic applications. Elsevier Saunders (Fourth edition). 2014. pp: 80-81

312. Pusztaszeri MP., Seelentag W., Bosman F. Immunohistochemical expression of endothelial markers CD31, CD34, von Willebrand factor, and Fli-1 in normal human tissues *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 2006;54(4): 385-395.

313 Stanczyk M, Olszewski WL, Gewartowska M, Domaszewska-Szostek A. Lack of functioning lymphatics and accumulation. *Lymphology* . 2010; 43 : 158-167.

314. Fernández-Carrobles M-M, Tadeo I, Noguera R, et al. A morphometric tool applied to angiogenesis research based on vessel segmentation. *Diagnostic Pathology*. 2013;8(1):20. doi:10.1186/1746-1596-8-S1-S20.

315. Vlems F, van der Worp E, van der Laak J, van de Velde C, Nagtegaal I, van Krieken H. "A study into methodology and application of quantification of tumour vasculature in rectal cancer." *Virchows Archiv* . 2004;445(3): 263-270.

316. Tiwari A.K, Crawford SE, Radosevich A, Wali RK, Stypula Y, Kunte DP, Mutyal N, Ruderman S, Gomes A, Cornwell ML, De La Cruz M, Brasky J, Gibson TP, Backman V, Roy HK. Neo-angiogenesis and the premalignant micro-circulatory augmentation of early colon carcinogenesis. *Cancer letters*. 2011;306(2): 205-213.

317. Jasek E., Furgal-Borzych A, Lis GJ, Litwin JA, Rzepecka-Wozniak E, Trela F. *Endocr Pathol.* Microvessel density and area in pituitary microadenomas. *Endocr Pathol*. 2009;20(4):221-6. doi: 10.1007/s12022-009-9091-1.

318. Saptefrați L., Cîmpean AM, Ciornîi A, Ceaușu R, Eșanu N, Raica M. Identification of lymphatic vessels and prognostic value of lymphatic microvessel density in lesions of the uterine cervix. *Rom J Morphol Embryol*. 2009;50(4):589-94.

319. Leme, M. B. P., Waitzberg, Â. F. L., Artigiani Neto, R., Linhares, M. M., & Matos, D. Assessment of angiogenesis expression and its relationship with prognosis of colorectal

cancer by conventional and computer-assisted histopathological image analysis. *Acta Cirurgica Brasileira*,2006;21(6), 392-397.

320. van Niekerk CG, van der Laak JA, Börger ME, Huisman HJ, Witjes JA, Barentsz JO, Hulsbergen-van de Kaa CA. Computerized whole slide quantification shows increased microvascular density in pT2 prostate cancer as compared to normal prostate tissue. *Prostate*. 2009 Jan 1;69(1):62-9. doi: 10.1002/pros.20855.

321. Mikalsen LT, Dhakal HP, Bruland S, Naume B, Borgen E, Nesland JM, Olsen DR. The clinical impact of mean vessel size and solidity in breast carcinoma patients. *PLoS One*. 2013;8(10):e75954. doi: 10.1371/journal.pone.0075954. eCollection 2013.

322. El-moneim N., El-moneim Ebid S., Kazem A., Saad A., Mousa S., El abd E., Hewala T. The role of angiogenesis assessment in the prognosis of breast carcinoma and in the evaluation of the therapeutic effect of “shark care” drug as an angiogenesis inhibitor *Turkish Journal of Cancer* 2008; 38 (3:) 123-134

323 Coşkun U, Akyürek N, Dursun A, Yamaç D. Peritumoral lymphatic microvessel density associated with tumor progression and poor prognosis in gastric carcinoma. *J Surg Res*. 2010;164(1):110-5. doi: 10.1016/j.jss.2009.03.081.

324. Avdalyan A., Bobrov I., Klimachev V., Lazarev A. Prognostic Value of Microvessel Density in Tumor and Peritumoral Area as Evaluated by CD31 Protein Expression and Argyrophilic Nucleolar Organizer Region Count in Endothelial Cells in Uterine Leiomyosarcom Sarcoma. 2012;2012:594512. doi: 10.1155/2012/594512.

325. Jumaa A., Mahdi L., Al-Arid H., Alabbasi D. Microvessels density in relation to prognostic parameters (grading and staging) in transitional cell carcinoma of urinary bladder (Immunohistochemical study) *Kufa Med. Journal* 2011;14(1): 82-87.

326. Svagzdys S., Lesauskaite V., Pavalkis D., Nedzelskienė I., Pranys D., Tamelis A., Microvessel density as new prognostic marker after radiotherapy in rectal cancer. 2009; *BMC Cancer*, 9:95 doi:10.1186/1471-2407-9-95.