



УНИВЕРЗИТЕТ У НОВОМ САДУ  
МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ НОВИ САД

**КЛИНИЧКИ ЗНАЧАЈ ИДЕНТИФИКАЦИЈЕ ТУМОРСКИХ МАТИЧНИХ  
ЋЕЛИЈА У ТКИВУ АДЕНОКАРЦИНОМА КОЛОНА**

ДОКТОРСКА ДИСЕРТАЦИЈА

Ментори:

проф. др Млађан Протић

проф. др Славица Кнежевић Ушај

Кандидат: асист. др мед. Милана Кресоја Игњатовић

Нови Сад, 2020. године

**УНИВЕРЗИТЕТ У НОВОМ САДУ**

**НАЗИВ ФАКУЛТЕТА МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ**

**KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA**

Redni broj: RBR	
Identifikacioni broj: IBR	
Tip dokumentacije: TD	Monografska dokumentacija
Tip zapisa: TZ	Tekstualni štampani materijal
Vrsta rada (dipl., mag., dokt.): VR	Doktorska disertacija
Ime i prezime autora: AU	Asist. dr med. Milana Kresoja Ignjatović
Mentor (titula, ime, prezime, zvanje): MN	Prof. dr Mlađan Protić, vanr. prof. Medicinskog fakulteta Univerziteta u Novom Sadu  Prof. dr Slavica Knežević Ušaj, red. prof. Medicinskog fakulteta Univerziteta u Novom Sadu
Naslov rada: NR	Klinički značaj identifikacije tumorskih matičnih ćelija u tkivu adenocarcinoma kolona

Jezik publikacije: JP	Srpski (ćirilica)
Jezik izvoda: JI	srp. / eng.
Zemlja publikovanja: ZP	Republika Srbija
Uže geografsko područje: UGP	AP Vojvodina
Godina: GO	2020.
Izdavač: IZ	autorski reprint
Mesto i adresa: MA	Novi Sad, Hajduk Veljkova 3

Fizički opis rada: FO	7 poglavlja, 206 strana, 17 slika, 83 grafikona, 55 tabela, 214 referenci
Naučna oblast: NO	Medicina
Naučna disciplina: ND	Hirurgija, onkologija, patologija
Predmetna odrednica, ključne reči: PO	neoplazme debelog creva; kancerske matične ćelije; lokalni relaps neoplazmi; preživljavanje bez bolesti; preživljavanje; tumorski biomarkeri; hijaluronski receptori; aktivni molekul adhezivnih leukocitnih ćelija; G-proteinski vezani receptori
UDK	616.348-006.6-036.8:577.2
Čuva se: ČU	Biblioteci Medicinskog Fakulteta Univerziteta u Novom Sadu
Važna napomena: VN	nema
Izvod: IZ	Karcinom debelog creva predstavlja treći uzrok smrtnosti od maligniteta kod muškaraca i drugi kod žena. Postoji osnovana sumnja da kancerske matične ćelije (KMĆ) imaju veliki značaj u karcinogenezi, invazivnosti, širenju i rezistenciji na hemioterapiju primarnog tumora. Njihova identifikacija u primatnom kolorektalnom karcinomu (KRK) putem markera kancerskih matičnih ćelija bi selektovala visokorizičnu grupu bolesnika,

	<p>omogućila ciljano delovanje na ove ćelije i veću šansu za izlečenje.</p> <p>Cilj ovog istraživanja je bio utvrđivanje uticaja prisustva kancerskih matičnih ćelija u primarnom tumoru obolelih od karcinoma kolona na pojavu relapsa bolesti, dužinu preživljavanja bez bolesti i sveukupno preživljavanje.</p> <p>Istraživanje je sprovedeno kao prospektivno–retrospektivna randomizovana analitička studija na Klinici za operativnu onkologiju i Službi za patološko – anatomsku i laboratorijsku dijagnostiku Instituta za onkologiju Vojvodine u Sremskoj Kamenici u periodu od 2016-2019. godine. U studiju su uključeno 112 bolesnica operisanih na Institutu za onkologiju Vojvodine u periodu od 2007-2012. godine sa patohistološki potvrđenom dijagnozom primarnog, nemetastatskog (stadijumi I, II i III) KRK.</p> <p>Bolesnici su randomizovani u odnosu na pojavu recidiva bolesti i prisustvo metastaza u regionalnim limfnim čvorovima u odnosu 1:1. Uzorci tumorskog tkiva dobijeni hirurškom resekcijom su nakon standardne patohistološke obrade tretirani primenom monoklonskih antitela na CD44, CD166 i <math>\alpha</math>-Lgr5. Određivani su prisustvo, intezitet i lokalizacija kancerskih matičnih ćelija (KMĆ) u primarnom tumoru i njihov uticaj na pojavu relapsa bolesti, dužinu preživljavanja bez bolesti i sveukupno preživljavanje u grupi svih bolesnika a potom bolesnika podeljenih prema stadijumu bolesti.</p> <p>Bolesnici u prvom i drugom stadijumu bolesti koji su imali relaps su imali statistički značajno veće prisustvo CD44+ KMĆ u primarnom tumoru. Kod ovih bolesnika je prisutan kraći period preživljavanja bez bolesti kao i kraće</p>
--	---

	<p>sveukupno preživljavanje. Takođe, uočen je statistički značajan uticaj koekspresije CD44/CD166 u KMĆ na pojavu relapsa bolesti, dužinu preživljavanja bez bolesti i sveukupno preživljavanje kod bolesnika u prvom i drugom stadijumu bolesti. Nije uočena statistička značajnost prisustva KMĆ u primarnom tumoru na pojavu relapsa bolesti, dužinu preživljavanja bez bolesti i sveukupno preživljavanje kod bolesnika u trećem stadijumu bolesti. Prisustvo CD166 i <math>\alpha</math>-Lgr5 obojenih KMĆ nije pokazalo statističku značajnost u pogledu pojave relapsa bolesti, dužine preživljavanja bez bolesti i sveukupnog preživljavanja, kako u grupi svih bolesnika tako i prilikom podele bolesnika na stadijume bolesti.</p>
Datum prihvatanja teme od strane Senata:  DP	8. mart 2018.

Datum odbrane: DO	
Članovi komisije: (ime i prezime / titula / zvanje / naziv organizacije / status) KO	

**UNIVERSITY OF NOVI SAD**

**FACULTY OF MEDICINE**

**KEY WORD DOCUMENTATION**

Accession number: ANO	
Identification number: INO	
Document type: DT	Monograph documentation



Type of record: TR	Textual printed material
Contents code: CC	PhD Thesis
Author: AU	Asst. Milana Kresoja Ignjatović
Mentor: MN	Mlađan Protić, MD Phd, Associate professor, University of Novi Sad, Medical Faculty  Slavica Knežević Ušaj, MD, PhD, Professor, University of Novi Sad, Medical Faculty
Title: TI	Clinical impact of colon cancer stem cells identificaton in adenocarcinoma tumour tissue
Language of text: LT	Serbian (Cyrillic)
Language of abstract: LA	eng. / srp.
Country of publication: CP	Republic of Serbia
Locality of publication: LP	AP Vojvodina
Publication year: PY	2020.
Publisher: PU	University of Novi Sad  Medical Faculty

Publication place: PP	Novi Sad, Hajduk Veljkova 3
Physical description: PD	7 chapters, 206 pages, 17 pictures, 83 figures, 55 tables, 214 references
Scientific field SF	Medicine
Scientific discipline SD	Surgery, Oncology, Pathology
Subject, Key words SKW	Colonic Neoplasms; Neoplastic Stem Cells; Neoplasm Recurrence, Local; Disease-Free Survival; Survival; Biomarkers, Tumor; Hyaluronan Receptors; Activated-Leukocyte Cell Adhesion Molecule; Receptors, G-Protein-Coupled
UC	616.348-006.6-036.8:577.2
Holding data: HD	

<p>Note:</p> <p>N</p>	<p>None</p>
<p>Abstract:</p> <p>AB</p>	<p>Colon cancer is the third most common cause of death of malignancy in the world. There is a justified theory that cancer stem cells have a significant impact on colon cancer tumorigenesis, invasiveness, spread and resistance to chemotherapy. Identification of colon cancer stem cells in primary tumor by various biological markers would lead to identification of a high risk group of patients, target therapy of colon cancer and a higher chance to cure.</p> <p>Aim of this study was to determine whether presence of colon cancer stem cells in primary tumor has an impact on recurrence, disease free survival (DFS) and overall survival (OS) in patients with colorectal cancer.</p> <p>An randomized, analytical prospective-retrospective study was performed in the Clinic for Operative Oncology and Department for Anatomical Pathology of the Oncology Institute of Vojvodina in Sremska Kamenica in the period of 2016–2019. The study included 112 patients with pathohistologically proven, non-metastatic colon adenocarcinoma who were operated on at the Oncology Institute of Vojvodina in the period of 2007-2012.</p> <p>Patients were randomized by recurrence and presence of metastatic lymph nodes by 1:1 ratio. After standard pathohistological preparation, tumor specimens were stained for monoclonal CD44, CD166 and <math>\alpha</math>-Lgr5 antibody. Presence, intensity of expression and localization of colon cancer stem cells were observed and their impact on relapse, disease free survival and overall survival in the group of all patients as well as in groups divided by stages of the disease.</p> <p>We demonstrate that patients in Stage I and II of the disease who experience disease recurrence have statistically significant higher expression of CD44+ in primary tumor specimen. They</p>

	<p>also have shorter DFS and OS. Coexpression of CD44/CD166 antibody also have strong negative impact on recurrence, disease free survival and overall survival in Stage I and II patients. There is no correlation between presence of colon cancer stem cells and recurrence nor presence of colon cancer stem cells had impact on disease free survival and overall survival.</p> <p>Presence of CD166 and <math>\alpha</math>-Lgr5 expression did not show significant impact on recurrence nor disease free survival and overall survival as in group of all patients as well in group of patients divided by stages of the disease.</p> <p>High expression of CD44+ and coexpression of CD44/CD166+ colon cancer stem cell markers in primary tumor specimen correlates with higher chance for disease recurrence and also leads to shorter DFS and OS.</p>
Accepted on Senate on: AS	March 8 <sup>th</sup> 2018.
Defended: DE	
Thesis Defend Board: DB	

## *Захвалница*

*Захваљујем се својим менторима проф. др Млађану Протићу и проф. др Славици Кнежевић Ушај на стрпљењу, несебичном залагању приликом израде ове дисертације као и знању које су ми пружили.*

*Посебну захвалност дугујем доц. др Ненаду Шолајићу на помоћи и разумевању као и проф. др Зорану Радовановићу на подршци на мом академском путу.*

*Захваљујем се свим колегама Института за онкологију Војводине који су допринели мом раду.*

*Захваљујем се мојој породици, мом супругу, кћерци, оцу и сестри јер су веровали у мене, омогућили ми напредак и пријили неизмерну љубав и подршку.*

*Највећу захвалност дугујем мојој мајци без чије љубави, васпитања и вере не бих била то што јесам.*

## САДРЖАЈ

<b>1. УВОД.....</b>	<b>1</b>
1.1. Историјат.....	1
1.2. Колоректални карцином.....	1
1.2.1. Анатомска локализација колоректалног карцинома.....	1
1.2.2. Епидемиологија.....	2
1.2.3. Етиологија и фактори ризика за настанак карцинома колона.....	6
1.2.3.1. Променљиви фактори ризика.....	7
1.2.3.2. Непроменљиви фактори ризика.....	9
1.2.3.2.1. Стечени фактори.....	9
1.2.3.2.2. Наследни фактори.....	10
1.2.4. Дијагностика карцинома колона.....	12
1.2.4.1. Симптоми карцинома колона.....	12
1.2.4.2. Лабораторијска дијагностика.....	14
1.2.4.3. Радиолошка дијагностика карцинома колона.....	14
1.2.4.4. Ендоскопска дијагностика карцинома колона.....	15
1.2.5. Карциногенеза карцинома колона.....	15
1.2.6. Макроскопска презентација.....	18
1.2.7. Микроскопска презентација.....	18
1.2.8. Стејџинг, градус и прогностички фактори карцинома колона.....	21
1.2.8.1. <i>TNM</i> класификација карцинома колона.....	21
1.2.8.2. Одређивање стадијума болести.....	24

1.2.8.3. Прогностички фактори.....	28
1.2.9. Лечење карцинома колона.....	33
1.2.9.1. Хируршко лечење карцинома колона.....	33
1.2.9.2. Хемиотерапија колоректалног карцинома.....	33
1.2.9.3. Адјувантна хемиотерапија за II и III стадијум болести.....	35
1.2.9.4. Биолошка таргет терапија.....	36
1.2.9.5. Маркери одговора на хемиотерапију.....	36
1.3. Канцерске матичне ћелије.....	38
1.3.1. Организација крипти колона, интестиналне матичне ћелије и њихова идентификација.....	38
1.3.2 Теорија канцерских матичних ћелија и колоректална карциногенеза.....	41
1.3.3. Идентификација канцерских матичних ћелија.....	44
1.3.4. Маркери канцерских матичних ћелија.....	45
1.3.5. Значај канцерских матичних ћелија у лечењу карцинома колона.....	52
<b>2. ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА И РАДНА ХИПОТЕЗА.....</b>	<b>54</b>
2.1. Циљеви рада.....	54
2.2. Радна хипотеза.....	54
<b>3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДОЛОГИЈА.....</b>	<b>55</b>
3.1. Карактеристике болесника укључених у студију.....	55
3.2. Добијање сагласности.....	55
3.3. Дизајн студије.....	56
3.4. Патохистолошка обрада препарата и идентификација канцерских матичних ћелија.....	56

3.5. Формирање базе података.....	57
3.6. Статистичке методе.....	58
3.7. Приватност болесника.....	59
<b>4. РЕЗУЛТАТИ.....</b>	<b>60</b>
4.1. Старосна и полна структура болесника.....	60
4.2. Дистрибуција болесника према <i>TNM</i> стадијуму.....	61
4.3. Дистрибуција болесника у односу на број метастатски измењених лимфних чворова.....	64
4.4. Дистрибуција болесника у односу на захваћеност тумором.....	66
4.5. Дистрибуција болесника у односу на локализацију тумора.....	68
4.6. Дистрибуција болесника у односу на присуство лимфоваскуларне инвазије.....	70
4.7. Дистрибуција болесника у односу на присуство перинеуралне инвазије.....	71
4.8. Дистрибуција болесника у односу на присуство муцина у тумору.....	72
4.9. Дистрибуција болесника у односу на присуство некрозе у тумору.....	73
4.10. Дистрибуција болесника у односу на хитност оперативног захвата.....	75
4.11. Дистрибуција болесника у односу на примену хемиотерапије.....	76
4.12. Дистрибуција болесника у односу на релапс болести.....	78
4.12.1. Анализа појаве релапса у односу на стадијум болести.....	79
4.12.2. Анализа болесника у односу на појаву релапса и исход болести .....	80
4.12.3. Анализа болесника у односу на појаву релапса и исход болести, дистрибуција према стадијуму болести.....	81
4.12.4. Анализа преживљавања у односу на стадијум болести.....	82
4.12.5. Анализа преживљавања у односу на појаву релапса болести.....	83
4.12.6. Анализа места релапса болести.....	84



4.12.7. Анализа места појаве релапса према стадијуму болести.....	86
4.12.8. Анализа појаве релапса болести у односу на пол и старост приликом поделе оболелих према стадијуму болести.....	87
4.12.9. Анализа појаве релапса у односу на присуство метастаза у прегледаним лимфним чворовима.....	89
4.12.10. Анализа просечних вредности укупног броја и броја одстрањених позитивних (метастатских) лимфних чворова у односу на групе болесника подељене према појави релапса.....	89
4.12.11. Анализа појаве релапса у односу на захваћеност тумором у групи свих болесника и према стадијуму болести.....	90
4.12.12. Анализа појаве релапса у односу на хистолошки градус тумора у групи свих болесника и према стадијуму болести .....	91
4.12.13. Анализа појаве релапса у односу на локализацију тумора у групи свих болесника и према стадијуму болести .....	92
4.12.14. Анализа појаве релапса у односу на врсту операције у групи свих болесника и према стадијуму болести .....	93
4.12.15. Анализа појаве релапса у односу на присуство лимфоваскуларне инвазије у групи свих болесника и према стадијуму болести .....	94
4.12.16. Анализа појаве релапса у односу на присуство перинеуралне инвазије у групи свих болесника и према стадијуму болести .....	95
4.12.17. Анализа појаве релапса у односу на присуство муцина у тумору у групи свих болесника и према стадијуму болести .....	96
4.12.18. Анализа појаве релапса у односу на присуство некрозе у тумору у групи свих болесника и према стадијуму болести.....	97
4.12.19. Анализа појаве релапса у односу на хитност операције у групи свих болесника и према стадијуму болести .....	98
4.12.20. Анализа појаве релапса у односу на лечење хемиотерапијом у групи свих болесника и према стадијуму болести .....	99
4.12.21. Анализа појаве релапса у односу на проценат, интензитет и локализацију обојености канцерских матичних ћелија (КМЋ) са <i>CD44</i> антителима у групи свих болесника са колоректалним карциномом (КРК).....	101

4.12.22. Анализа појаве релапса у односу на проценат, интензитет и локализацију обојености КМЋ са <i>CD44</i> антителима код оболелих од КРК према стадијуму болести.....	103
4.12.23. Анализа појаве релапса у односу на проценат, интензитет и локализацију обојености КМЋ са <i>Lgr5</i> антителима у групи свих болесника са колоректалним карциномом.....	105
4.12.24. Анализа појаве релапса у односу на проценат, интензитет и локализацију обојености КМЋ са <i>Lgr5</i> антителима код оболелих од КРК према стадијуму болести .....	107
4.12.25. Анализа појаве релапса у односу на проценат, интензитет и локализацију обојености КМЋ са <i>CD166</i> антителима.....	109
4.12.26. Анализа појаве релапса у односу на проценат, интензитет и локализацију обојености КМЋ са <i>CD166</i> антителима код оболелих од КРК према стадијуму болести .....	111
4.12.27. Анализа појаве релапса у односу на процентуалну заступљеност са <i>CD44/CD166</i> антителима у групи свих болесника са колоректалним карциномом.....	113
4.12.28. Анализа појаве релапса у односу на проценат обојености КМЋ са <i>CD44/CD166</i> антителима код оболелих од КРК према стадијуму болести .....	114
4.13. Анализа болесника у односу на период преживљавања без болести.....	115
4.13.1. Анализа просечних вредности преживљавања без болести свих болесника са колоректалним карциномом у односу на процентуалну заступљеност <i>CD44</i> позитивних ћелија, интензитет и локализацију обојености.....	115
4.13.2. Анализа просечних вредности преживљавања без болести оболелих од КРК према стадијуму болести у односу на процентуалну заступљеност <i>CD44</i> позитивних ћелија, интензитет и локализацију обојености .....	117
4.13.3. Анализа просечних вредности преживљавања без болести болесника након операције колоректалног карцинома у односу на категорије подељене према проценту, локализацији и интензитету обојености ћелија са <i>Lgr5</i> антителима.....	119
4.13.4. Анализа просечних вредности преживљавања без болести оболелих од КРК према стадијуму болести у односу на процентуалну заступљеност <i>Lgr5</i> позитивних ћелија, интензитет и локализацију обојености .....	120

4.13.5. Анализа просечних вредности преживљавања болесника без болести у односу на категорије подељене према проценту, локализацији и интензитету обојености ћелија са CD166 антителом.....	122
4.13.6. Анализа просечних вредности преживљавања без болести оболелих од КРК према стадијуму болести у односу на процентуалну заступљеност CD166 позитивних ћелија, интензитет и локализацију обојености .....	123
4.13.7. Анализа просечних вредности преживљавања без болести свих болесника са колоректалним карциномом у односу на процентуалну заступљеност CD44/CD166 позитивних ћелија.....	125
4.13.8. Анализа просечних вредности преживљавања без болести оболелих од КРК према стадијуму болести у односу на процентуалну заступљеност CD166 позитивних ћелија .....	126
4.14 Анализа болесника умрлих од релапса болести.....	127
4.14.1. Анализа просечних вредности преживљавања оболелих од КРК према стадијуму болести у односу на процентуалну заступљеност CD44 позитивних ћелија, интензитет и локализацију обојености .....	128
4.14.2. Анализа просечних вредности преживљавања оболелих од КРК према стадијуму болести у односу на процентуалну заступљеност Lgr5 позитивних ћелија, интензитет и локализацију обојености.....	131
4.14.3. Анализа просечних вредности преживљавања умрлих као последица релапса болести након операције колоректалног карцинома у односу на категорије подељене према проценту, локализацији и интензитету обојености ћелија са CD166 антителом.....	133
4.14.4. Анализа просечних вредности преживљавања свих који су умрли од релапса болести у односу на процентуалну заступљеност CD44/CD166 позитивних ћелија.....	135
4.15. Анализа преживљавање и свеукупно преживљавање болесника.....	136
4.15.1. Анализа просечних вредности преживљавања умрлих као последица релапса болести према стадијуму болести у односу на процентуалну заступљеност CD44/CD166 позитивних ћелија, интензитет и локализацију обојености.....	136

4.15.2. Анализа просечних вредности преживљавања умрлих као последица релапса болести према стадијуму болести у односу на процентуалну заступљеност <i>CD44/CD166</i> позитивних ћелија.....	138
4.15.3. Анализа времена преживљавања оболелих од КРК који су умрли као последица релапса болести у групи свих болесника као и приликом поделе на стадијуме болести у односу на процентуалну заступљеност <i>CD44</i> позитивних ћелија.....	139
4.15.4. Анализа времена преживљавања оболелих од КРК који су умрли као последица релапса болести у групи свих болесника као и приликом поделе на стадијуме болести у односу на интензитет обојености ћелија са <i>CD44</i> антителима.....	141
4.15.5. Анализа времена преживљавања оболелих од КРК који су умрли као последица релапса болести у групи свих болесника као и приликом поделе на стадијуме болести у односу на локализацију обојености ћелија са <i>CD44</i> антителима.....	143
4.15.6. Анализа времена преживљавања оболелих од КРК који су умрли као последица релапса болести у групи свих болесника као и приликом поделе на стадијуме болести у односу на процентуалну заступљеност <i>Lgr5</i> позитивних ћелија.....	145
4.15.7. Анализа времена преживљавања оболелих од КРК који су умрли као последица релапса болести у групи свих болесника као и приликом поделе на стадијуме болести у односу на интензитет обојености ћелија <i>Lgr5</i> антителима.....	147
4.15.8. Анализа времена преживљавања оболелих од КРК који су умрли као последица релапса болести у групи свих болесника као и приликом поделе на стадијуме болести у односу на локализацију обојености ћелија са <i>Lgr5</i> антителима.....	148
4.15.9. Анализа времена преживљавања оболелих од КРК који су умрли као последица релапса болести у групи свих болесника као и приликом поделе на стадијуме болести у односу на процентуалну заступљеност <i>CD166</i> позитивних ћелија.....	150
4.15.10. Анализа времена преживљавања оболелих од КРК који су умрли као последица релапса болести у групи свих болесника као и приликом поделе на стадијуме болести у односу на интензитет обојености ћелија <i>CD166</i> антителима.....	151
4.15.11. Анализа времена преживљавања оболелих од КРК који су умрли као последица релапса болести у групи свих болесника као и приликом поделе на стадијуме болести у односу на локализацију обојености ћелија <i>CD166</i> антителима.....	153

4.15.12. Анализа времена преживљавања оболелих од КРК који су умрли као последица релапса болести у групи свих болесника као и приликом поделе на стадијуме болести у односу на процентуалну заступљеност <i>CD44/CD166</i> позитивних ћелија.....	155
4.16. Мултиваријантна анализа фактора ризика за настанак релапса након операције колоректалног карцинома у групи свих болесника.....	158
4.17. Мултиваријантна анализа фактора ризика за настанак смрти као последица релапса након операције колоректалног карцинома у групи свих болесника.....	159
4.18. Мултиваријантна анализа фактора ризика за настанак релапса након операције колоректалног карцинома у групи болесника подељених према стадијуму болести.....	160
4.19. Мултиваријантна анализа фактора ризика за настанак смрти као последица релапса након операције колоректалног карцинома у групи болесника подељених према стадијуму болести.....	162
<b>5. ДУСКУСИЈА.....</b>	<b>164</b>
5.1. Уводне напомене, дизајн студије и величина узорка.....	164
5.2. Карактеристике болесника и преоперативни статус.....	165
5.3. Прогностички фактори, њихов утицај на релапс болести и свеукупно преживљавање.....	166
5.4. Примена адјувантне хемиотерапије и њен утицај на појаву релапса болести.....	171
5.5. Матичне ћелије колоректалног карцинома.....	171
<b>6. ЗАКЉУЧЦИ.....</b>	<b>180</b>
<b>7. ЛИТЕРАТУРА.....</b>	<b>181</b>

## 1. УВОД

### 1.1. ИСТОРИЈАТ

Један од првих записа о болести дебелог црева налази се на Еберсовом (*Ebers*) папирусу још 1.500 година пре нове ере који описује пролапс ректума. У Хипократовим списима, 400 година п. н. е., могу се наћи релевантнији подаци о болестима дебелог црева и њиховом лечењу, а Аристотел је први који је употребио назив колон (1).

Увођење анатомских дисекција, са циљем бољег упознавања са анатомијом и функционисањем људског организма, довело је до нових сазнања из области колопроктологије. Прве свеобухватније опсервације и описи дебелог црева потичу из 1543. године, од Везалијуса (*Andreas Vesalius*) и његових анатомских дисекција. Пилор (*Pillore*) је 1776. године извео цекостомију код карцинома доњег црева (2). Значајне студије о ембриологији нормалног колона је публиковао Мекел (*Meckel*) 1817. године (3).

Први покушаји хируршког лечења карцинома колона везују се за Лисфранка (*Lisfranc*). Нелатон (*Nélaton*) је 1839. године први говорио о експозицији, фиксацији и инцизији дистениране вијуге црева проксимално од места опструкције (2). Билрот (*Theodore Billroth*) је 1879. године урадио прву ресекцију сигмоидног колона са екстериоризацијом проксималне вијуге у виду трајне колостомије (3). Ребард (*Reybard*) је 1884. године урадио прву успешну ресекцију колона са анастомозом због карцинома. Хартман (*Henri Hartmann*) 1923. године описује хируршки третман опструктивног карцинома дисталног колона (1–3) Ресекционе процедуре на колону условиле су и развој нове класификације карцинома колона чији је аутор Дјукс (*Cuthbert Dukes*) 1932. године (2, 3).

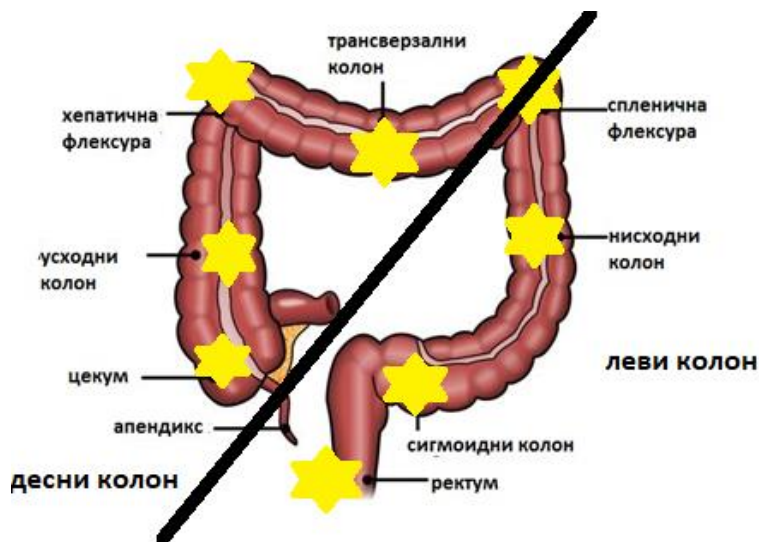
### 1.2. КОЛОРЕКТАЛНИ КАРЦИНОМ

#### **1.2.1. Анатомска локализација колоректалног карцинома**

Ембриолошки и анатомски, дебело црево се протеже терминално од илеума до денталне линије аналног канала (2).

Фиксације колона током ембрионалног развоја омогућавају јаснију поделу на анатомске сегменте. Од предњег црева настају једњак, желудац, јетра, жучна кеса, жучни водови, панкреас и проксимални дуоденум. Средње црево се даље развија у дистални дуоденум, јејунум, илеум, цекум, апендикс, асцендентни колон и проксималне 2/3 трансверзалног колона. Задње црево ће се развити у дисталну трећину трансверзалног

колона, десцедентни колон, сигму и горњи део аналног канала. Дакле, како десни и леви колон имају различито ембриолошко порекло, тако колоректални карцином (КРК) пре свега делимо на карциноме десног и левог колона при чему лијенална флексура представља границу између ова два појма а према прецизнијој анатомској локализацији (подела дебелог црева на сегменте) КРК делимо на карциноме: цекума, асцендентног колона, хепатичне флексура, трансверзалног колона, лијеналне флексура, десцендентног колона, сигмоидног колона, ректума и аналног канала. (2, 4-16).

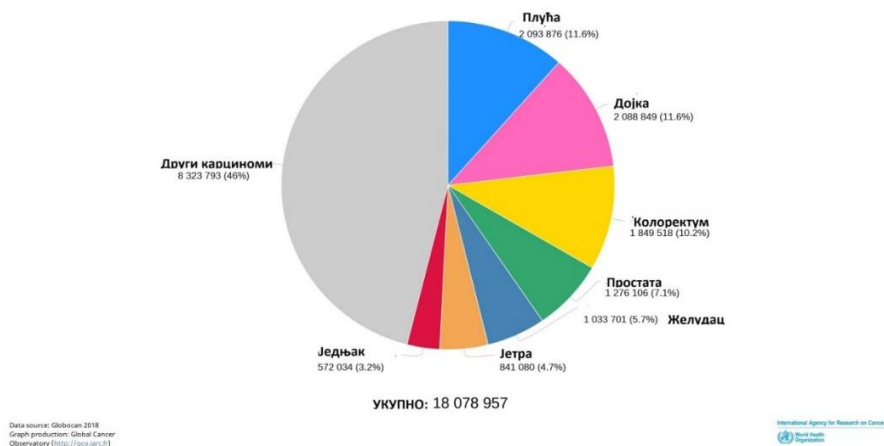


Слика 1. Локализација КРК према анатомским сегментима колона (9)

### **1.2.2. Епидемиологија**

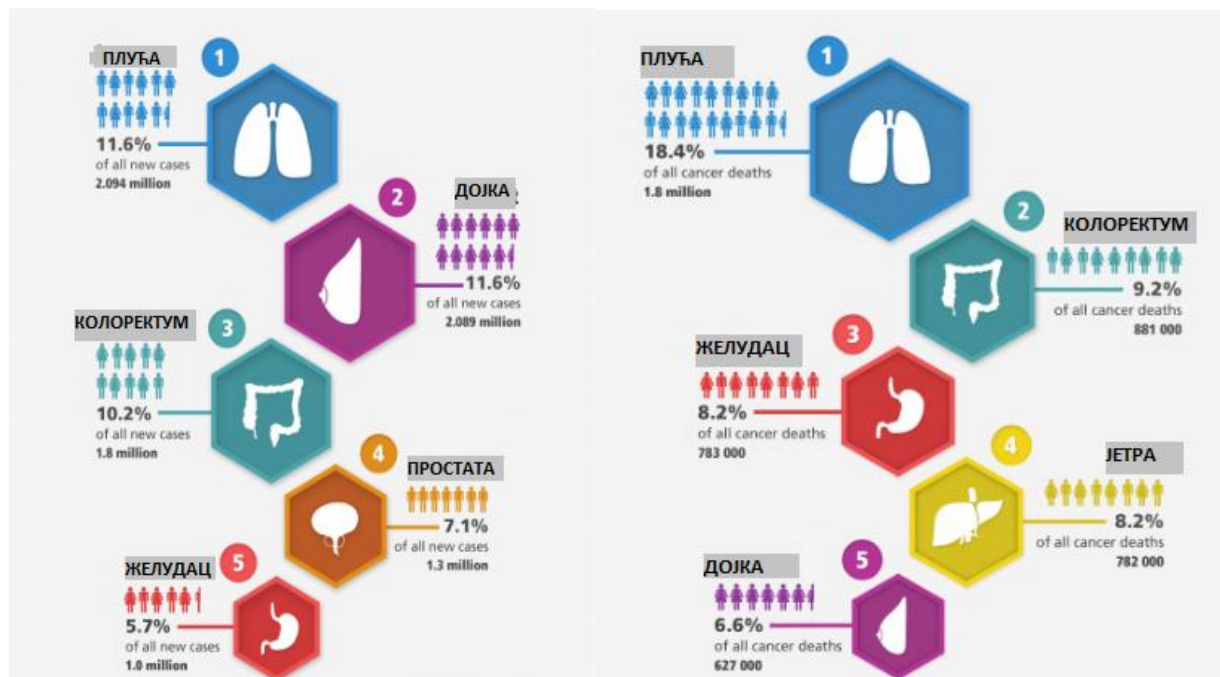
Малигне болести су на другом месту у свету по оболевању и умирању, одмах иза кардиоваскуларних болести. Малигне болести представљају велики социоекономски проблем у свету, како због велике смртности, квалитета живота оболелих и чланова њихових породица тако и због огромних трошкова за лечење ових болесника (23-25).

Према подацима GLOBOCAN-a (*Global Cancer Observatory*), Светске организације за истраживање рака (*World Cancer Research Fund*), SEER-a (*National Cancer Institute – Surveillance, epidemiology and End Results Program*) и Интернационалне агенције за истраживање рака (*IARC – International Agency for Research on Cancer*) из 2018. године број новооболелих од колоректалног карцинома износи 1,8 милиона (10,2% од укупног броја новооболелих од свих малигнитета) (23 – 25). Према подацима GLOBOCAN-a из 2018. године карцином колоректума представља четврти узрок смртности у свету са стопом инциденције од 19,7% и стопом морталитета од 8,9% за оба пола (24). Према подацима SEER-a за 2019. годину укупан број новооболелих само у Америци се процењује на 145.600 (8,3% оболелих од свих карцинома. Број процењених смртних случајева за 2019. годину износи 51.020 односно 8,4% од свих смрти узрокованих карциномима (21).



Слика 2. Процењени број новооткривених карцинома у свету за 2018. годину, свих узраста, оба пола (24)

Уколико посматрамо карцином колоректума у односу на пол, он је трећи узрок смртности код мушкараца, одмах након плућа и простате, са инциденцијом од 23,6% и стопом морталитета од 10,8% док се код жена налази на другом месту, након карцинома дојке, са инциденцијом од 16,3% и стопом смртности која износи 7,2% (25).



Слика 3. Инциденција и морталитет за 2018. годину, оба пола (25)

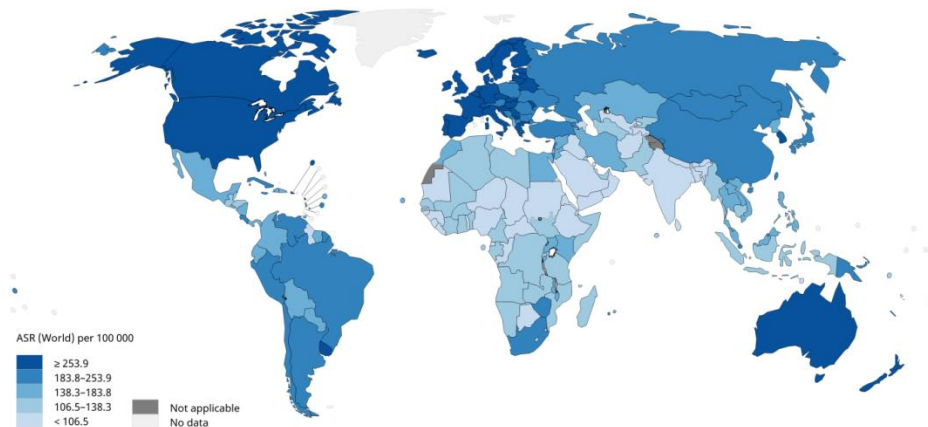
Србија спада у групу високоризичних 25 земаља које имају највећу стопу оболелих од КРК за оба пола. На првом месту, међу овим земљама, налази се Мађарска са 51,2 на 100.000 становника, док се Србија налази на тринаестом месту са 36,7 оболелих на 100.000



становника. Уколико селектујемо оболеле према полу, Србија се налази на осмом месту према броју оболелих мушкараца (49 на 100.000) док се у случају женске популације Србија не убраја у првих 20 земаља (23–27).

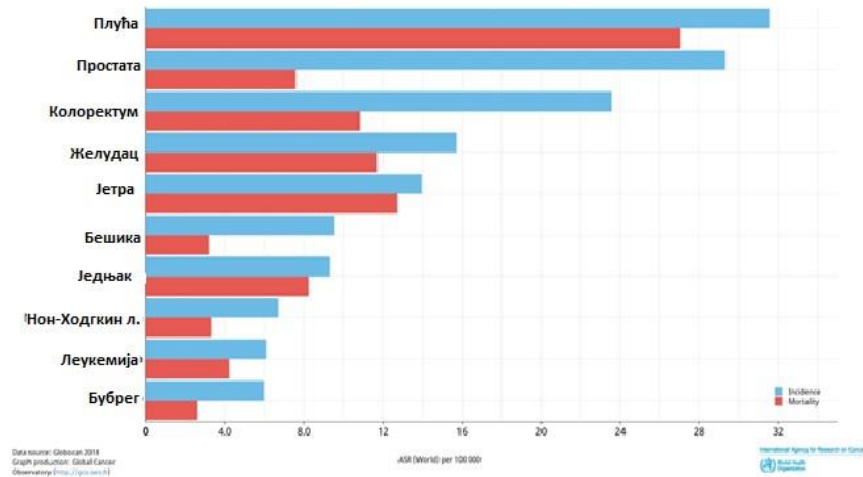
Према подацима из Регистра за рак Централне Србије и Регистра за рак Војводине, на простору Србије је у 2010. години регистровано скоро 5.000 новооболелих од малигног тумора дебелог црева. Однос броја новооболелих мушкараца према броју новооболелих жена износио је 1,45 : 1. Број умрлих од карцинома дебелог црева за дати период износио је око 2.700 или 55% од броја новооболелих те године. Стопе инциденције и морталитета у Војводини у просеку су за 10% више него на простору Централне Србије. Колоректални карцином се и у Војводини и у Централној Србији по стопама инциденције налазио на другом месту (код мушкараца после рака плућа а код жена после карцинома дојке), а по морталитеу код мушкараца на другом месту (прво место заузима рак плућа) док се код жена налазио на трећем месту (иза рака дојке и плућа) (26). Према подацима Института за јавно здравље Србије – Батут, стопа морталитета за Србију износи 16,6 на 100.000 становника. Међу мушком популацијом је други водећи узрок смртности (иза рака плућа) са 21,1 а трећи је у женској популацији (иза рака дојке и грлића материце), са 12,9 на 100.000 становника (27).

Глобално, стопа КРК варира током периода посматрања у декадама. Стопа карцинома укључујући и КРК је већа у развијеним земљама, тј. земљама индустријског типа. Број новооткривених случајева износи 1.849.518 (10,2% свих новооткривених малигнитета) док број умрлих износи 880.792 (9,2%). Упркос исказаним подацима карцином колоректума има највећи проценат излечења од свих карцинома гастроинтестиналног тракта (23–25).

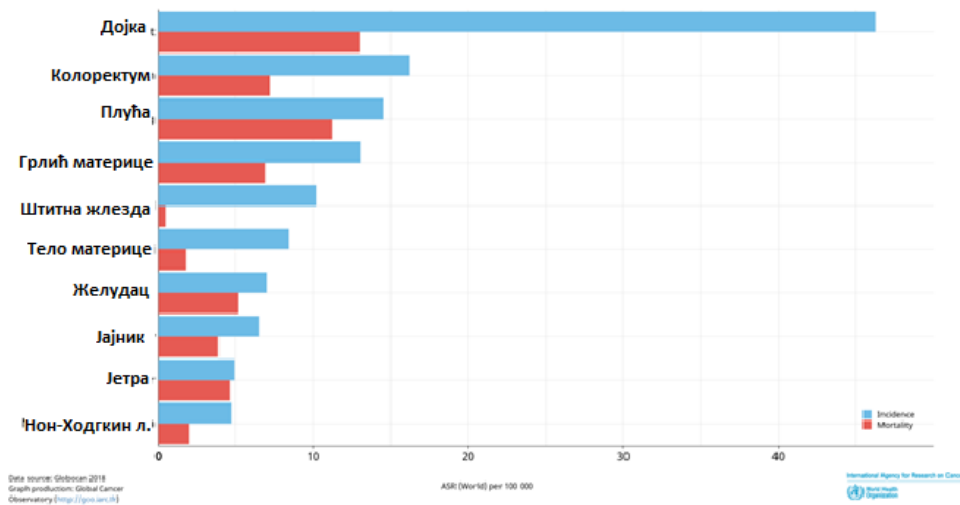


Слика 4. Заступљеност карцинома у свету (24)

Просечна старост оболелих је између шесте и седме деценије живота. Код мушкараца се јавља најчешће између 65. и 70. године живота, док је код жена чешћи након 75. године. (24, 25).



Слика 5. Инциденција и морталитет код мушкараца, стандардизовано према годинама живота (24)



Слика 6. Инциденција и морталитет код жена, стандардизовано према годинама живота (24)

### **1.2.3. Етиологија и фактори ризика за настанак карцинома колона**

Узрок и патогенеза колоректалног карцинома су повезани како са генетским тако и са факторима околине. Придаје се значај начину исхране, нарочито уносу масти и животињских протеина будући да се сматра да се тим путем мења интестинална микрофлора а напослетку и хемијски састав интралуминалног садржаја. Нарочито се потенцира повезаност између конзумирања говедине, уноса великих количина животињске масти и инциденције колоректалног карцинома, но ова повезаност још увек није довољно разјашњена (26, 28–30).

Генетски фактори се испољавају на различите начине. Најочигледнија генетска повезаност је свакако она између фамилијарне полипозе (ФАП) и колоректалног карцинома, потом других врста полипоза као и пацијената са Линчовим (*Lynch*) синдромом.

Фактори који имају утицаја на настанак карцинома колона су следећи (26–30):

1. Променљиви фактори ризика:

- а. исхрана
- б. прекомерна телесна тежина
- в. физичка активност
- г. алкохол и пушење
- д. медикаменти и хормони
- ђ. инфективни фактори

2. Непроменљиви фактори ризика:

а. стечени фактори

- животна доб
- лична анамнеза за полипозу
- лична анамнеза за карцином колона
- лична анамнеза за инфламаторне болести црева

б. наследни фактори

- породична анамнеза за рак колоректума
- породична аденоматозна полипоза
- наследни неполипозни колоректални карцином
- јувенилна полипоза
- Појц–Јегерсов синдром (*Peutz-Jeghers*)

### 1.2.3.1. Променљиви фактори ризика

Још је шездесетих година прошлог века постало јасно да спољашњи фактори значајно утичу на настанак карцинома ректума што је доказано истраживањима на случајевима миграната. Наиме код особа које су мигрирале из земаља са ниском стопом КРК у земље са високом стопом овог карцинома примећено је повећано оболевање. Оваква промена стопе оболевања се везује за промену средине (утицај штетних фактора) као и промену начина исхране (31). Испитивање разних етничких група (Срба, Мађара, Словака и Русина) у Војводини, које су спровели Гудурић и сар, указало је на значајне разлике у животним навикама, али не и у инциденцији јављања колоректалног карцинома (28).

- *Исхрана*

Од свих фактора ризика најинтересантнија и најбоље проучена веза је између уноса одређене врсте хране и степена оболевања од КРК. Генерално гледано, западњачки начин исхране богате мастима и калоријама погодује настанку колоректалног карцинома, док унос хране богате влакнима, чини се има, протективни значај (24, 30).

- *Воће и поврће*

У већини студија је доказано да конзумирање воћа и поврћа доводи до смањења ризика од настанка колоректалног карцинома. Ова улога се најчешће приписује витамину Б6, фолатима, калцијуму, антиоксидансима, селену и магнезијуму (24).

- *Месо и месне прерађевине*

Унос црвеног меса, месних прерађевина, роштиља и прженог меса се деценијама сматрају чиниоцима који повећавају ризик од оболевања. Сматра се да је ризик повећан од 14-40% уколико је дневни унос црвеног меса и месних прерађевина између 100 и 120 г (24).

- *Маси и млеко*

Нејасни су подаци у вези са конзумирања маси и појаве КРК. Познато је само да омега-3 масне киселине редукују пролиферацију ћелија слузокоже колона и тиме доприносе смањењу инциденције за настанак КРК. Конзумирањем млека и млечних производа смањује се ризик од настанка КРК. Претпоставља се да се овај утицај остварује захваљујући калцијуму из млека (24).

- *Прекомерна телесна тежина*

Епидемиолошки подаци указују да повећање телесне тежине доводи до пораста ризика од настанка КРК за 30–70% и то првенствено код мушкараца. Код жена ова релација је

мање конзистентна. Исто запажање је уочено и за настанак аденома колона. Такође је уочено да висцерална гојазност значајније утиче на настанак КРК него супкутана (24, 30, 32, 33).

- *Физичка активност*

У великом броју студија које су се бавиле утицајем физичке активности на настанак колоректалног карцинома је доказан је повољан утицај физичке активности на смањење инциденце КРК, невезано за пол, етничко или географско порекло. Препоручује се умерена физичка активност у трајању од 30 минута, 5 пута недељно (24, 30, 34).

- *Алкохол и пушење*

Након мета анализе објављене 2008. године, Међународна агенција за истраживање рака (IARC) званично је прогласила пушење фактором ризика за настанак КРК. Према наведеној мета анализи, пушење 40 цигарета дневно повећава ризик од КРК за 40% (24). Унос алкохола има синергистичко дејство што свакако не умањује самосталан утицај алкохола као фактора ризика. Сматра се да особе које конзумирају више од 30 г алкохолног пића дневно имају умерено повећан ризик од настанка КРК (24, 25, 30, 33).

- *Медикаменти и хормони*

Употреба нестероидних антиинфламаторних лекова као протективних фактора у настанку КРК актуелизована је у последње три деценије. Бројним студијама је доказано да аспирин и други нестероидни антиинфламаторни лекови смањују ризик од рака колона и ректума због свог антиинфламаторног и антиоксидативног ефекта. Ефекти аспирина на настанак КРК испитивани су на неколико проспективних рандомизираних трајала који су рађени због испитивања ризика од кардиоваскуларних болести. Утврђено је да свакодневна употреба аспирина смањује ризик од смрти од свих карцинома, укључујући и КРК, за 21% уколико се користе више од пет година (35).

Жене у постменопаузи које користе естрогене имају смањену инциденцију КРК за трећину. Повољно дејство се такође првенствено односи на карциноме колона а мање на карциноме ректума (24).

- *Инфективни агенси*

У последње време велику пажњу привлачи откриће повезаности између појединих инфективних агенаса и појаве КРК (24). Чињеница да је колон станиште за преко сто трилиона и 400 врста бактерија и да је вероватноћа настанка карцинома у колону 12 пута већа него другде у гастроинтестиналном тракту већ буди сумњу на везу између ове две појаве. Бактерије које се најчешће доводе у везу са настанком КРК су: Стрептококус бовис (*Streptococcus bovis*), Хеликобактер пилори (*Helicobacter pylori*), Ешерихија коли

(*Escherichia coli*), Клебсијела пнеумоније (*Klebsiella pneumoniae*), и најчешће у последње време Фузобактерија (*Fusobacterium*). Од вируса се најчешће помињу: вирус Џона Канингама (*John Cunningham virus*), БК вирус (*BK virus*), Хумани цитомегало вирус (*Human Cytomegalo virus*), Хумани папилома вирус (*Human papilloma virus*) (24, 33).

### 1.2.3.2. Непроменљиви фактори ризика

#### 1.2.3.2.1. Стечени фактори

Стечени фактори су они које је болесник стекао током свог живота и на које више нема утицаја. Уколико у ово убројимо и генске мутације стечене током живота, можемо рећи да су стечени фактори одговорни за настанак спорадичних КРК (23–26).

- *Животна доб*

Око 91% оболелих и 94% умрлих од КРК старији су од 50 година. Ризик оболевања је 14 пута већи за особе старије од 50 година а најчесталији је између шесте и седме деценије (23).

- *Полипоза колона*

Највећи број КРК настаје из аденоматозних полипа и сматрају се малигним када неопластичне ћелије пробију кроз ламину мускуларис мукозе и пробију у субмукозу. Из више од 90% аденома се неће развити карцином, а само постојање полипа указује на повећан ризик од КРК. Највећи број полипа са малигним потенцијалом су аденоматозним полипи који могу бити тубуларни, вилозни и тубовилозни. Ризик од настанка КРК из полипа зависи од величине, удела вилозне компоненте, степена дисплазије и женског пола (33, 68). Полипи са већим уделом вилозне компоненте имају већи ризик за настанак КРК. Полипи чија је величина испод 10 мм имају ризик за малигну алтерацију мањи од 1%, док се код полипа већих од 20 мм овај проценат пење на 50% (16, 17, 22, 26).

- *Карцином колона*

Лична анамнеза за претходни карцином колона представља четири пута већу могућност за настанак карцинома колона. Уколико се карцином јавио раније у животу, вероватноћа је и већа (22, 26, 29, 30).

- *Инфламаторне болести црева*

Улцерозни колитис представља 2,75 пута већи ризик за настанак КРК. Ризик је већи уколико болест дуже траје, тако да он износи 18% након 30 година болести. Уколико је присутна Кронова болест колона ризик је већи 4,5 пута (22, 35, 36).

#### 1.2.3.2.2. Наследни фактори

Као што је наведено КРК према чиниоцима који до њих доводе се могу поделити у спорадичне и херeditарне. Херeditарни КРК се могу груписати у три главне групе синдрома а то су ФАП (фамилијарна полопоза колона), херeditарни неполипозни колоректални карцином и хамартозни полипозни синдроми. Према различитим изворима, сви поменути синдроми су одговорни за око 5–10% свих малгних тумора дебелог црева. Готово сви ови синдроми се наслеђују аутозомно доминантно, изузев веома ретког поремећаја под називом мултипли аденоматозни полипи гастроинтестиналног тракта или МУН полипоза, који се наслеђује аутозомно рецесивно. Треба истаћи да је наведено аутозомно доминантно наслеђивање заправо аутозомно рецесивно, уколико се сагледава на молекуларном нивоу, будући да се герминативна мутација наслеђује а друга (соматска) мутација настаје током раста и развоја јединке (66, 68, 69).

- *Породична анамнеза за рак колоректума*

Око 20% болесника који болују од КРК имају сроднике који болују од КРК. Ризик од настанка КРК је 2 до 3 пута већи уколико су им првостепени рођаци имали КРК а тај ризик расте н 3 до 6 пута уколико су првостепени рођаци добили КРК у млађим годинама (22, 26, 37–40).

- *Фамилијарна аденоматозна полипоза – ФАП*

ФАП је аутозомно–доминантни поремећај аденоматозис–полипозис гена (АРС). АРС ген има мултифакторску улогу, пре свега у трансмисији сигнала, интрацелуларној адхезији, стабилизацији цитоскелета, регулацији ћелијског циклуса и апоптози. Болест се манифестује појавом 100–5.000 аденома на колону. Пенетрантност ФАП синдрома достиже 100%. Одговорни су за 1-2% свих КРК. Са 18 година половина носилаца мутираног ФАП има мултипле полипе на дебелом цреву док ће са 40 година готово сви носиоци измењеног гена развити карцином. Промена ФАП се може наћи у око две трећине спорадичних КРК. У превенцији овог синдрома препоручује се одређивање хетерозиготног стања гена и колоноскопија сваке године почевши између 10. и 12. године живота. Најсигурнија метода превенције је тотална колектомија (22, 26, 40).

- *Наследни неполипозни колоректални карцином – ХНПКК односно HNPCC (Hereditary nonpolyposis colorectal cancer)*

Овај синдром је најчешћи од сва три поменута синдрома. Настаје због мутације тзв. одговорног за репарацију грешака (*mismatch repair*) – ММР. Одговоран је за настанак око 3% КРК. Пенетрантност овог синдрома износи око 80%. Средња доб оболелих носилаца ММР гена износи 44 године. Од свих оболелих, 90% ће развити КРК до шездесете године

живота. Овај поремећај може изазвати и друге карциноме, нпр. ендометријални карцином. Дијагноза ХНПКК поставља се на основу Бетезда (основни и ревидирани) и Амстердам критеријума (Амстердам I и II критеријуми) (37–39).

Према ревидираним Бетезда критеријумима потребно је тестирање на присуство мутација MMR гена у случају:

- КРК код особа млађих од 50 година;
- Присутва синхроних/метахроних КРК или осталих ХНПКК повезаних тумора без обзира на старост;
- КРК са значајно присутном микросателитском нестабилношћу код пацијената млађих од 60 година;
- Дијагностиковани карцином дебелог црева код једног или више рођака прве линије сродства са ХНПКК повезаним карциномима а под условом да је дијагноза код бар једног болесника постављена пре педесете године живота;
- КРК код два или више рођака прве или друге линије сродства са ХНПКК повезаним карциномом, без обзира на године живота.

Прогресија од настанка аденома до развоја карцинома је код ХНПКК убрзана и износи свега неколико година док у осталим случајевима тај период обично износи између 5 и 10 година. Позитивно присуство једног од прва три Бетезда критеријума повлачи са собом неопходно генетско тестирање. Са скринингом се почиње између 20. и 25. године живота једном и или два пута годишње. Почетак скрининга се помера наниже за 10 година у односу на најмлађег оболелог сродника. Процењује се да 28–75% ових болесника може развити карцином колона најчешће у проксималним деловима колона у млађем животном добу (22, 26, 37–40).

- *Јувенилна полипоза*

Јувенилна полипоза је наследни аутозомно-доминантни полипозни синдром. Полипи су хамартоматозне природе. Симптоми се јављају између 7. и 15. године живота. Због удружености овог синдрома са аденоматозним лезијама расте ризик од малигне трансформације између треће и четврте деценије живота (41–43).

- *Појц–Јегерсов (Peutz-Jeghers) синдром*

Аутозомно-доминантна полипоза која се карактерише појавом хамартозних полипа на било ком делу дигестивног система. Болест је ретко изолована и обично је комбинована са мукокутанним лезијама. Клинички се манифестује још у детињству а доказан је повећан ризик од КРК. Заједно са јувенилном полипозом, МУН удруженом полипозом и осталим хамартозним полипозама чине укупно 5% свих колоректалних крацинома (41–43).



## **1.2.4. Дијагностика карцинома колона**

### **1.2.4.1. Симптоми карцинома колона**

За карцином дебелог црева карактеристична је читава лепеза неспецифичних симптома који могу бити општи, као слабост и малаксалост или у вези са дигестивним трактом. Управо ово одсуство специфичности доводи до касног откривања КРК код болесника који се нису подвргли скринингу. Велика већина КРК се, нажалост, открије тек када наступе компликације. Ипак, и поред неспецифичности постоје разлике у симптомима у односу на локализацију КРК. За промене на десном колону карактеристична је сидеропенијска анемија и појава палпабилне масе у десном квадранту трбуха. Тумори десног колона се ретко презентују променама у ритму пражњења црева, такође болесници са тумором десног колона ређе западају у илеус у односу на болеснике који имају тумор леве половине колона. Разлог за ово је постојање два „заштитна фактора“ (16, 17, 22, 28, 29, 44). Први је ширина дебелог црева (33, 50). Наиме познато је да је лумен дебелог црева шири у подручју цекума и десне половине колона у односу на леви колон и ректосигму. Други фактор је илеоцекална валвула која, уколико је инкомпетентна, дозвољава враћање гасова и фекалног садржаја у танка црева што поново одлаже настанак илеуса, бар на неко време (22). Са друге стране, зид десног колона је тањи у односу на леви колон, поготово у пределу цекума (9, 16, 17, 22). Потребно је осврнути се и на Лапласов закон који гласи да је интезитет интралуминалног притиска сразмеран полупречнику сфере (лумена колона), који је код цекума најшири, што објашњава чињеницу да је перфорација црева најчешће управо у подручју цекума (22). Тумор леве половине колона се најчешће презентују макроскопским крварењем и присуством слузи у столици као и променама у ритму пражњења црева. Због ширине лумена црева, тумори ове локализације се чешће презентују опструктивним илеусом (9, 16, 22). Тумори ректума се презентују појавом свеже крви и слузи у столици, променама у ритму пражњења црева у смислу периодичног смењивања опстипације и дијареје, осећајем непотпуног пражњења, лажним позивима на столицу, тенезмима, болом у карлици, столицом која је танка и оскудна. Појава оваквих симптома побуђује сумњу код болесника те се обраћају лекару. То је уједно и разлог зашто се тумори леве половине колона и ректума чеће и раније откривају у односу на туморе десне половине колона (16, 17, 22, 28, 29, 44).

- *Крварење*

Крварење може бити различитог интензитета, односно микроскопско-окултно и макроскопско тј. видљиво голим оком. Тип крварења је најчешће повезан са локализацијом тумора. Тумори десног колона се презентују окултним крварењем које се може открити само специфичним тестовима (*Fecal Occult Blood Test* – FOBT, FIT – *Fecal Immunohistochemical Test*) који се уједно користе и као неинвазивна скрининг метода за рано откривање карцинома дебелог црева. Тумори леве половине дебелог црева и ректума се

презентују крварењем које је видљиво голим оком. Столица је помешана или прекривена крвљу, најчешће са примесама слузи. Профузна, масивна крварења, која доводе до слике хеморагичног шока, ретка су код КРК (16, 17, 22, 28, 29, 44).

- *Пражњење слузи*

Често је присутно код вилозних аденома и инфламаторних болести црева. Ови воденасто-слузави проливи могу бити веома исцрпљујући и довести до хидро-електролитског дисбаланса (16, 22, 26).

- *Поремећаји у ритму пражњења црева*

Поремећаји цревних навика односе се на ритам пражњења, количину и форму столице као и на квалитет (осећај потпуног или непотпуног пражњења). Ови симптоми су неспецифични и могу се јавити код других, бенигну оболјења дебелог црева (22).

- *Бол у трбуху*

Најчешће је нејасне локализације, тупог карактера, повремено грчевити, у случају постојања опструкције лумена тумором. Уколико се јави јасно локализовани и/или интензивнији бол, постоји основана сумња да се тумор проширио и захватио паријетални перитонеум (22).

- *Надутост трбуха*

Надутост трбуха може настати као последица надутости црева у случају опструкције лумена туморском масом или као последица настанка асцитеса услед проширене малигне болести (22).

- *Општи симптоми*

Најчешћи општи симптоми губитак апетита, слабост, губитак на телесној маси, сидеропенијска анемија. Могуће су и језа, дрхтавица и повишена телесна температура, у случају појаве инфективних компликација које најчешће настају као последица перфорације тумора.

- *Физикални знаци*

Анемија, сува и дехидрирана кожа и губитак на теленој маси најчешћи су општи знаци КРК. Палпацијом абдомена се у око 50% случајева може напипати тумор, али само у 10% случајева ако је локализован у левом колону (17, 22, 44).

Дигито-ректални преглед је незаменљив и обавезни део прегледа. Њиме се без већих проблема могу открити тумори доњег ректума и аналног канала (17, 22, 44).

#### 1.2.4.2. Лабораторијска дијагностика

Промене у класичним лабораторијским налазима, који укључују крвну слику и стандардну биохемију, нису строго специфичне и показују девијације само приликом појаве компликација. Тако се може уочити анемија само када је дуго присутно крварење или поремећаји хидроелектролитског дисбаланса код дуготрајних пролива и слично.

Идеалан лабораторијски маркер морао би да има високу сензитивност и специфичност, да буде доступан у телесним течностима које су релативно лаке за узорковање, да се јавља у релативно раној фази болести (да би се могао користити и за скрининг) и да има прихватљиву цену (22, 26, 45–47).

Иако је у последњој декади откривен велики број генетских и биохемијских маркера који су у већој или мањој мери повезани са КРК, још увек није пронађен идеалан маркер КРК. Бројни маркери КРК данас се користе у клиничкој пракси или су у фази истраживања (47).

Најпознатији су протеински маркери прве генерације: **карциноембрионални антиген** (*Carcinoembryonic antigen – CEA*), **CA 19-9** и **CA125**. Најпознатији међу њима је гликопротеин *CEA*. Чешће је присутан код добро диферентованих тумора левог колона, вредности су му значајно повећане код присуства позитивних лимфних нодуса или код присуства удаљених метастаза. Погодан је за праћење ефекта лечења када његове вредности падају или за праћење релапса болести када његове вредности поново почињу да расту (44–47).

Ради откривања идеалног маркера за карцином колона укључени су и различити генски продукти – протеини (нпр. тимидилат синтетаза – ТИМС (*Thymidylate synthase – TYMS*), TP53 (*p53*),  $\beta$ -*catenin* (*CTNNB1*), *CCSA-2*), генски материјал (нпр. метилисани ДНК (*methylated DNK*)), микро РНК (*micro RNA*) па чак и циркулишуће колон-канцер стем-ћелије (*colon cancer stem cell*) (44–47)

#### 1.2.4.3. Радиолошка дијагностика карцинома колона

Радиолошка дијагностика се користи за прецизно утврђивање локализације промене, њене величине, морфологије, статуса регионалних лимфних чворова, као и присуства метастаза у удаљеним органима. Радиолошке методе које се користе за дијагностиковање КРК су: иригографија, ултразвук, трансректални ултразвук, компјутеризована томографија – СТ, магнетно-резонантни имиџинг – *MRI*, позитронска емисиона томографија – *PET*, комбинована са компјутерском томографијом *PET/CT*. Неке

од поменутих метода као што су колонографија са двојним контрастом, СТ колонографија (виртуелна колоноскопија), флексибилна сигмоидоскопија и колоноскопија се поред дијагностике користе и у скринингу КРК а предуслов је позитивност неинвазивних тестова (тестова за окултно крварење) (26, 44, 48–50).

#### 1.2.4.4. Ендоскопска дијагностика карцинома колоне

Колоноскопија представља златни стандард за дијагностику и терапију неких обољења колоне као и процену ефикасности свих осталих скрининг метода. Индикације за колоноскопију могу бити дијагностичке и терапијске. У дијагностичке индикације спада и скрининг (за детектовање промена у ризичној популацији или код болесника који су имали позитиван тест на окултно крварење у столици) или код симптоматских болесника (којима је већ урађена нека дијагностичка процедура). У терапијске сврхе колоноскопија је индикована ради: полипектомије, третмана крварећих лезија, екстракције страног тела, декомпресије колоне, балон дилатације стенотичних лезија или пласирања стента код стенозантних тумора (26, 44, 47–50).

Најчешће компликације приликом колоноскопије су: перфорација колоне и крварење. Перфорације се дешавају у 0,04–09% за дијагностичке и 0,06–07% за терапијске индикације. Крварење је најчешћа компликација колоноскопије са инциденцијом 0,02–0,04% за дијагностичке и 0,1–2,7% за терапијске индикације. Највећи број крварења након полипектомије спонтано престаје и не захтева никакву интервенцију (26, 51, 52).

#### 1.2.5. Карциногенеза карцинома колоне

Један од најважнијих концепата у вези са колоректалним карциномом јесте откриће аденома-карцином секвенце. Овај термин описује постепену прогресију од нормалног преко диспластичног епитела до карцинома удруженог са акумулацијом мултиплих генских алтерација. Овај концепт не пружа само сјајан модел настанка КРК, него даје и могућности за превенцију настанка колоректалног карцинома (26, 44).

Док аденома-карцином секвенца није директно доказана биле су уочене индиректне везе између аденома и карцинома. Познато је да се код 30–35% пацијената, којима се ендоскопски уклони аденоматозни полип, нови полипи враћају за 3-4 године. Преваљенције аденома и карцинома расту у односу на животну доб и то тако да се максимум јављања аденома догађа пет година пре пика КРК (26, 44, 53–55).

Највећи број КРК настаје из аденоматозних полипа и сматрају се малигним када неопластичне ћелије пробију кроз ламину мускуларис мукозе и инфилтрирају субмукозу преко тзв. полип-канцер секвенце. Колоректални полипи су чести, нађени су код више од 30% обдукованих преко 60 година живота, а из више од 90% дијагностикованих аденома

се никада неће развити карцином. Присуство аденома у дебелом цреву указује на повећан ризик за настанак метакроних аденома и КРК код самих пацијената као и њихових сродника у првом колону. Највећи број полипа са малигним потенцијалом су аденоматозни полипи који се деле на тубуларне, тубовилозне и вилозне аденоме (17, 26). Ризик од развоја карцинома зависи од величине полипа и удела вилозне компоненте. Највећи број аденома дебелог црева су мали (95% је мање од 20 мм) уз постојање корелације између величине аденома и вилозне компоненте. Само 4–14% тубуларних аденома је веће од 20 мм, док 30–50% вилозних и тубуларних аденома достиже величину преко 20 мм. Тубуларни аденоми су најчешће пендуларни, испод 10 мм у моменту постављања дијагнозе, док се вилозни аденоми ређе дијагностикују и обично су сесилне природе. Поред поменутих аденома у полипоидне лезије колоне се убрајају и хиперпластични полипи, сератни аденоми, равни аденоми, хамартозни и инфламаторни полипи (17, 26, 44, 53–55). Ризик за развој малигнитета зависи од више фактора: броја аденома, степена дисплазије, женског пола, локализације на левом колону и ректуму, вилозне компоненте и величине (17, 55). Полипи величине испод 1 цм имају 2% шансе за развој КРК, од 1–2 цм 10% док се за полипе преко 2 цм тај ризик пење на 50% (26, 44). Шпанска студија на 2.200 болесника указала је да се, око 50% полипа налази у десној половини дебелог црева, независно од полипа у левој половини дебелог црева, док су јапански аутори утврдили да је  $2/3$  *flat* полипа већих од 10 мм у десном колону имало инвазивну компоненту. Студија која је обухватила 44.065 контролних колоноскопија на 11.912 особа у средњем интервалу од 1,47 година, са праћењем од 5,47 година и просечним бројем од 4,71 прегледа по особи, указала је на сигнификантно повећање малигну полипа који су мањи од 20 мм код особа старијих од 60 година те стога извела закључак да су једино године живота статистички значајан фактор за малигни карактер полипа (26, 44).

У основи свих хистолошких промена налазе се генске мутације. Аденоми и карциноми колоне настају постепеним мутацијама које се акумулирају у епителним ћелијама колоне и које активирају онкогене, а инактивирају тумор супресорске и *MMR* гене. Овај процес представља основу за аденома-карцином секвенцу (53–57).

Онкогени у нормалним условима подстичу ћелијски раст и деобу ћелије, а мутација или прекомерна експресија ових гена и у одсуству сигнала за раст, подстиче неконтролисани раст ћелије. Гени супресори инхибирају ћелијски раст и подстичу програмирану ћелијску смрт, апоптозу (*apoptosis*). *MMR* гени утичу на процесе репарације оштећених гена (58–66).

Промена која се најраније региструје у процесу аденома-карцином модела је инактивација аденоматозног полипозног гена колоне (*adenomatosis-polyposis coli* – *APC*). Мутација овог гена доводи до патолошког ћелијског раста и овај ген се означава као „вратар“ (*gatekeeper*) за настанак аденома. Овај ген је инактивиран у 40–80% КРК и

аденома колона. *APC* је одговоран да спречавање накупљања молекула удружених са туморима као што су катенини. Као последица инактивције *APC* гена долази до хиперпролиферације епитела, поремећајем регулације крипталне хомеостазе која је почетни догађај у стварању аденома. Ова мутација је довољна за стварање малих бенигнух тумора, али је недовољна да проузрокује стварање напредних, инвазивних форми тумора (63). Промена *RAS* гена (*H-ras* и *K-ras*) други је кључни догађај у карциногенези. Ова промена доводи до трансформације хиперпролиферативног епитела у аденом. У 50% аденома је утврђено присуство *K-RAS* мутације (67, 68). Онкогени који углавном показују соматске мутације код колоректалног карцинома су *KRAS*, *BRAF*, *PIK3* и *CTNNB1* ( $\beta$ -катенин ген) (67-69). Идентификована су укупно три *RAS* гена: *KRAS* (хомологан онкогену Кирстен типа саркома вируса пацова), *HRAS* (хомологан онкогену Харвеј типа саркома вируса пацова и *NRAS* (првобитно изолован из хуманог неуробластома). *RAS* протеини су мале ГТП-азе које циркулишу између инактивних гуанозин дифосфатних беа и активних гуазин трифосфатних веза. *RAS* протеини су централни медијатори успоравања фактора раста и самим тим су круцијални за ћелијску пролиферацију, опстанак и диференцијацију (67-69). Мутације *KRAS* онкогена су присутне у око 40% колоректалних карцинома (69). Његово присуство повезано је са одсуством одговора на анти *EGFR* терапију (*EGFR –epidermal growth factor receptor*) (178, 179). *BRAF* је ген који кодира протеин који припада *RAF* породици серин/треонин протеин киназа. Игра улогу у регулисању путева који имају улогу у ћелијској деоби, диференцијацији и секрецији (69).

Како аденом поприма све више диспластичних промена, тако се јавља губитак алела супресорског *DCC* гена (*Deleted in Colon Cancer – DCC*) или других гена сличне локализације. Овај ген је одговоран за ћелијску адхезију. Његов губитак је одговоран за убрзање ћелијског раста и за метастатско ширење (67, 71).

За коначну прогресију до КРК одговорна је инактивација тумор супресорског гена *p53*. Ова делеција је откривена у 75% КРК, док је ретка у аденомима. Функција *p53* гена је заустављање репликације оштећене ДНК (22, 69–72).

Спорадични колоректални карциноми настају стеченим соматским мутацијама у неколико гена који су укључени и у хередитарне синдроме. Међутим, степен стечених мутација сам по себи није довољан да објасни бројне генетске поремећаје нађене у већини хуманих карцинома (67, 73, 74). Данас се зна да је за карциногенезу у овој групи пацијената потребно да дође до дестабилизације генома (67). Такозвани „мутаторни фенотип” у КРК настаје преко најмање три дестабилизујућа пута. То су: 1. хромозомска нестабилност (*Chromosomal instability–CIN*), 2. микросателитна нестабилност (*Microsatellite instability – MSI*) и 3. епигенетски механизми.

За *CIN* је карактеристична анеуплоидија и појава бројних хромозомских промена или мултиплих структурних аберација. Овај тип генетских збивања присутан је у 85%

случајева КРК, али тачан механизам који доводи до овог типа нестабилности, као ни улога анеуплоидије у прогресији КРК, нису разјашњени (22). У око 15–20% пацијената, КРК карактеришу мутације, односно генетски поремећаји на нивоу саме ДНК, при чему долази до инактивације гена који су одговорни за поправку грешака насталих у ДНК. Микросателитна нестабилност одвија се у микросателитима односно малим репетитивним некодирајућим секвенцама ДНК (73, 74). Код њих долази до нагомилавања генетских грешака, захваљујући томе што су механизми репарације оштећени те настале грешке не могу да се поправе, већ се нагомилавају са последичним преласком ћелије у стање микросателитне нестабилности. Код ових пацијената настају поремећаји у дужини микросателита, тако што долази до генетских мутација по типу инсерције или делеције. Зависно од броја мутираних микросателита, тумори могу бити високо или ниско микросателитно нестабилни *MSI-H* и *MSI-L* (*MSI-high* и *MSI-low*). У спорадичним случајевима *MSI*, гени репарације су инактивисани супресијом гена помоћу метилације промоторног региона гена *MLH1*. У херeditарном неполипозном КРК настају герминативне мутације у *MMP* генима на аутозомно доминантни начин, што доводи до *MSI*. Хромозомска нестабилност и микросателитна нестабилност међусобно се искључују. До сада није био препознат клинички значај молекуларног пута којим настаје КРК, већ су искључиво фенотипске карактеристике повезане са прогнозом. Међутим, утврђено је да је *MSI* статус добар предиктор одговора на хемиотерапију (17, 72–74).

### **1.2.6. Макроскопска презентација**

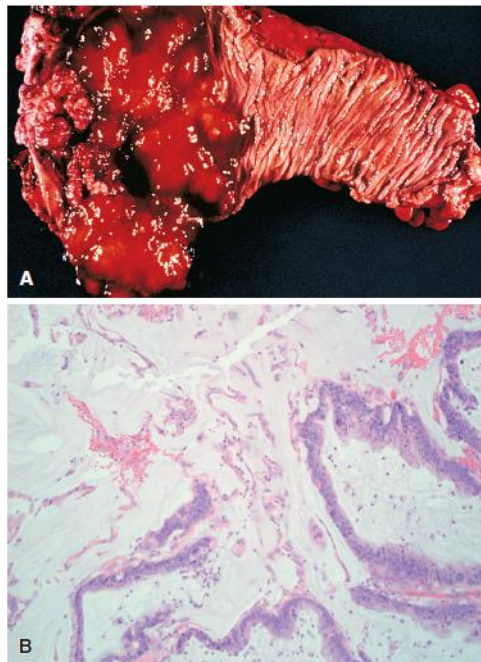
Макроскопски облици раста тумора су: вегетантни или полипоидни, улцеришући, инфилтративни и њихове комбинације. Прогностички су тумори са полипоидним типом раста повољнији од инфилтративних (17, 75–81).

### **1.2.7. Микроскопска презентација**

Према CAP (College of American Pathologist) протоколу разликујемо следеће хистолошке типове КРК (76):

1. аденокарцином
2. муцинозни аденокарцином
3. карцином ћелија прстена печатњака
4. медуларни карцином
5. микропапиларни карцином
6. *Serated* аденокарцином
7. неуроендокрини карцином (ситноћелијски и крупноћелијски)
8. сквамозни карцином
9. аденосквамозни карцином
10. недиферентовани карцином

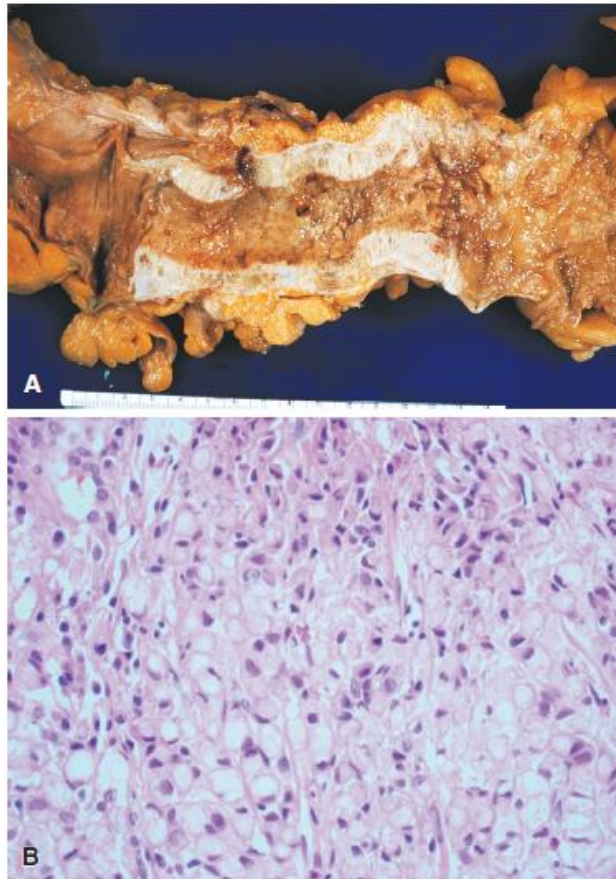
**Муцинозни карцином** је тип колоректалног карцинома за који је карактеристично формирање велике количине екстрацелуларног муцина који се меша са туморским ћелијама (185). Према дефиницији датој од стране WHO (*World Health Organisation*) код овог типа тумора, муцинозни фокуси морају заузимати барем половину туморске масе. Муцинозни карциноми чине 10% колоректалних карцинома (79). На молекуларном нивоу показују високу стопу *MSI*. Муцинозни са *MSI* имају бољу прогнозу. Једино муцинозни тумор који су саграђени од ћелија типа печатног прстена су лоши прогностички, као и слабо диферентовани неуроендокрини карциноми. Класични колоидни муцинозни карциноми који имају *H-MSI* су прогностички повољнији (17, 76, 79, 81). **Карцином типа прстена печатњака** је ретка форма колоректалног карцинома (чине свега 1% колоректалних карцинома) која најчешће погађа млађе болеснике. Према дефиницији ћелије прстена печатњака морају заузимати преко 50% тумора без обзира на количину екстрацелуларног муцина. Најчешће метастазира у лимфне нодусе, перитонеум и јајнике и то много чешће него у јетру. Пут ширења је углавном путем перитонеалног расапа те је самим тим прогноза веома лоша. Сви *MSI-H* тумори имају бољу прогнозу те је стога заблуда да муцинозни карциноми имају лошу прогнозу. Пошто су и карциноми типа прстена печатњака у суштини муцинозни (само што је слуз у ћелијама а не изван ћелија) онда је тај лош исход везан за компоненту прстена печатњака (17, 76).



Слика 7. Муцинозни аденокарцином (17)

А – макроскопски приказ; В – микроскопски приказ





Слика 8. Карцином типа прстена печатњака (17)  
А – макроскопски приказ; В – микроскопски приказ

**Медуларни карцином** је најчешће локализован у пределу слепог црева (цекума) и десног колона код жена (17, 76, 79). Чврсто је повезан са високом микросателитском нестабилношћу. Тумор је саграђен од солидних плаза полигоналних ћелија, изразито еозинofilне цитоплазме које понекад формирају трабекуле и острвца и праћен је обилном интратуморском инфилтрацијом лимфоцита. То је тумор који, иако спада хистолошки у слабо диферентоване карциноме, има бољу прогнозу због тога што је високо микросателитно нестабилан. (76)

**Назубљени (*serrated*) аденокарцином** представља засебну форму карцинома. У најважније критеријуме за дијагнозу назубљеног карцинома спадају присуство обилне еозинofilне цитоплазме, назубљени епителијум, кондензација хроматина и одсуство некрозе. Претежно су локализовани на цекуму (52%) и ректуму (33%). Претпоставка је да проксимално (микросателитно нестабилни-MSI-H) локализовани карциноми настају од сесилних *serrated* аденома док дистални (низак ниво микросателитске нестабилности-MSI-L и микросателитно стабилни –MSS) настају из традиционалних *serrated* аденома. Прогноза

назубљеног карцинома дефинисана је његовим молекуларним профилем при *BRAF* мутирани и *MSS* карциноми проксималног колона имају лошију прогнозу (19, 76).

### **1.2.8. Стејцинг, градус и прогностички фактори карцинома колона**

Третман колоректалног карцинома директно зависи од стадијума болести у тренутку постављања дијагнозе. Преоперативни стејцинг је битан не само у планирању лечења већ и као прогностички фактор будући да је петогодишње преживљавање уско повезано са стадијумом болести. Наиме, петогодишње преживљавање варира од 95% за први стадијум до 10% за пацијенте у четвртом стадијуму болести (44, 53, 54, 81).

Сваки карцином, укључујући и карцином колона, можемо класификовати на основу класификације малигних, солидних тумора, ткзв. *TNM* класификација (53, 81). Удружени амерички комитет за рак (*American Joint Committee on Cancer – AJCC staging system*) поделио је болеснике оболеле од карцинома колона на четири стадијума узимајући у обзир величину тумора, број тумором захваћених лимфних чворова и присуство удаљених метастаза (81).

#### **1.2.8.1. *TNM* класификација карцинома колона**

- *Примарни тумор*

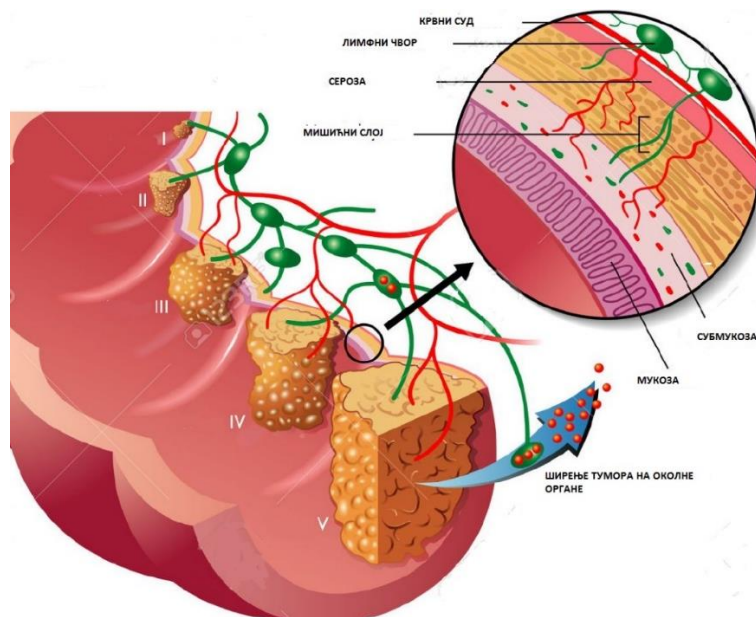
**T** (tumor) означава дубину инвазије тумора.

**Tis** је дисплазија високог градуса. Односи се на туморе који захватају ламину проприју, такође могу захватати али не и пенетрирати у л. мускуларис мукозе. Адекватнији назив за овај тип тумора био би интрамукозални карцином. Метастатски потенцијал ових тумора је занемарљив.

**Карцином у полипу.** Ове лезије су класификоване према истим *pT* дефиницијама као и колоректални карциноми. Примера ради, инвазивни карциноми који су ограничени на л. мускуларис и/или ламину проприју класификују се као *pTis*, док се тумори са дубљом инвазијом, односно хватањем л. мускуларис мукозе и пробојем у субмукозу главе или петелке полипа означавају као *pT1*. Ендоскопски ресециран *pTis* са чистим ресекционим маргинама (R0) представља нулти стадијум карцинома без обзира што нам није познат статус захваћености локорегионалних лимфатика и удаљених метастаза. Сматра се да овај тип тумора има веома низак метастатски потенцијал те би лимфаденектомија у оваквим случајевима била неоправдана. Неколико организација, међу којима је и NCCN дале су препоруку за хируршко одстрањење полипа који имају дисплазију високог степена са ресекционим маргином најмање 1 мм као и оних код којих постоји лимфоваскуларна инвазија (53, 54, 81).

**T1** и **T2** се односе на инвазију субмукозе и ламину мускуларис проприју. Тумори који продиру у субсерозно масно ткиво или неперитонизовано периколично/периректално меко ткиво спадају у **T3**. Предложена је и додатна класификација T3 стадијума у односу на дубину туморске инвазије испод ламине мускуларис проприје а која има прогностички значај. *pT3a* означава инвазију мању од 1 мм, *pT3b* инвазија 1–5 мм, *pT3c* 6–15мм, *pT3d* инвазија више од 15 мм (53, 54, 81).

**T4** представља инвазију висцералног перитонеума и околних структура. На основу клиничког исхода прихваћена је подела на *T4a* и *T4b*. Студије су показале да инвазија перитонеума органа предстаља лош прогностички фактор будући да тумори који се налазе на мање од 1 мм од висцералног перитонеума имају већу вероватноћу за перитонелну дисеминацију. Тумори са перфорацијом, где се туморске ћелије у континуитету налазе са инфламацијом висцералног перитонеума такође се сматрају *T4a* стадијумом (53, 54, 81).



Слика 9. Туморска инвазија кроз зид колона (83)

- *Лимфни чворови*

Број лимфних чворова који је одстрањен током операције а којег јепотом прегледао патолога корелира са преживљавањем и сматра се прогностичким фактором, највероватније због могућности прецизнијег одређивања стадијума тумора. Захваћеност регионалних лимфних чворова означава се са *N (nodus)*. Најмање 12 лимфних чворова је неопходно за адекватну анализу и прогнозу. *N0* означава да у прегледаном препарату нема метастатски измењених лимфних чворова (ЛЧ) а то се односи и на случајеве у којима је нађено и прегледано мање од 12 ЛЧ. Захваћеност од један до три ЛЧ се означава као *N1* а

захваћеност четири и више као *N2*. Обе групе лимфатика су подељене у две подгрупе ради прецизније прогнозе. Наиме група *N1* лимфатика се дели на *N1a* где је захваћен само један лимфни чвор у прегледаном препарату и *N1b* уколико су захваћена два или три ЛЧ. Такође *N2* групу делимо на *N2a* (захваћено 4–6 ЛЧ) и *N2b* (захваћено седам или више ЛЧ) субгрупу. Студије указују на значај повезаности односа захвачених ЛЧ (*lymph node ratio*) и укупног броја ЛЧ у прогнози КРК (53, 54, 81). Потешкоће у дијагностици могу представљати периколични туморски депозити који се понекада тешко разликују од ЛЧ а показатељи су далеко лошије прогнозе (84–89). Метастатски депозити у ЛЧ који се не сматрају регионалним као на пример лимфни чворови око заједничких илијачних или спољашњих илијалчних судова сматрају се удаљеним метастазама (*M1a*) и спадају у *M* категорију (81, 90–92).

Иоловане туморске ћелије се дефинишу као појединачне или мање групације туморских ћелија (10–20) у ЛЧ промера испод или до 0,2 мм. Микрометастазе се дефинишу као туморски депозити у ЛЧ коју су већи од 0,2 мм. Новија истраживања указују на лош прогностички значај ових промена (81). Недавно спроведена мета анализа указала је на значај микрометастаза као фактора лоше прогнозе. Показано је да су групе ћелија које су веће од 0,2 мм сигнификантно повезане са лошом прогнозом и стога ЛЧ са оваквим налазом треба сматрати позитивним (53, 81, 94).

#### *Туморски депозити – N1c*

Туморски депозити се дефинишу као постојање изолованих, дискретних туморских нодула уз поље лимфне дренаже примарног тумора али без позитивних регионалних ЛЧ и без васкуларне и неуралне инвазије и означавају се као *N1c*. Уколико су крвни суд или његов део, еластин или било која друга ћелија крвног суда могу идентификовати *H&E* методом, сматра се да постоји васкуларна инвазија (*vascular invasion*). Уколико се на препарату идентификује постојање туморских ћелија у неуралним структурама потребно је пријавити постојање перинеуралне инвазије (*PNI- perineural invasion*) (76, 79, 81).

Један до четири туморска депозита или пет и више туморских депозита без присуства позитивних ЛЧ и лимфоваскуларне и перинеуралне инвазије је потребно документовати како би се могао адекватно пратити одговор на хемио/радио терапију. Постојање туморских депозита је повезано са лошим укупним преживљавањем (53, 54, 81, 94). Недавно спроведена популациона студија показала је да 10% примарних колоректалних тумора има туморске депозите а да 2,5% тумора колоне и 3,3% тумора ректума има туморске депозите без обзира на одсутност метастаза у регионалним ЛЧ. Присуство туморских депозита не утиче на класификацију величине и дубине инвазије тумора (Т) али утиче на нодални статус (N). Наиме, иако у регионални ЛЧ нису туморски измењени, присуство туморских депозита мења нодални статус из *N0* у *N1c* (81).

- *Метастазе*

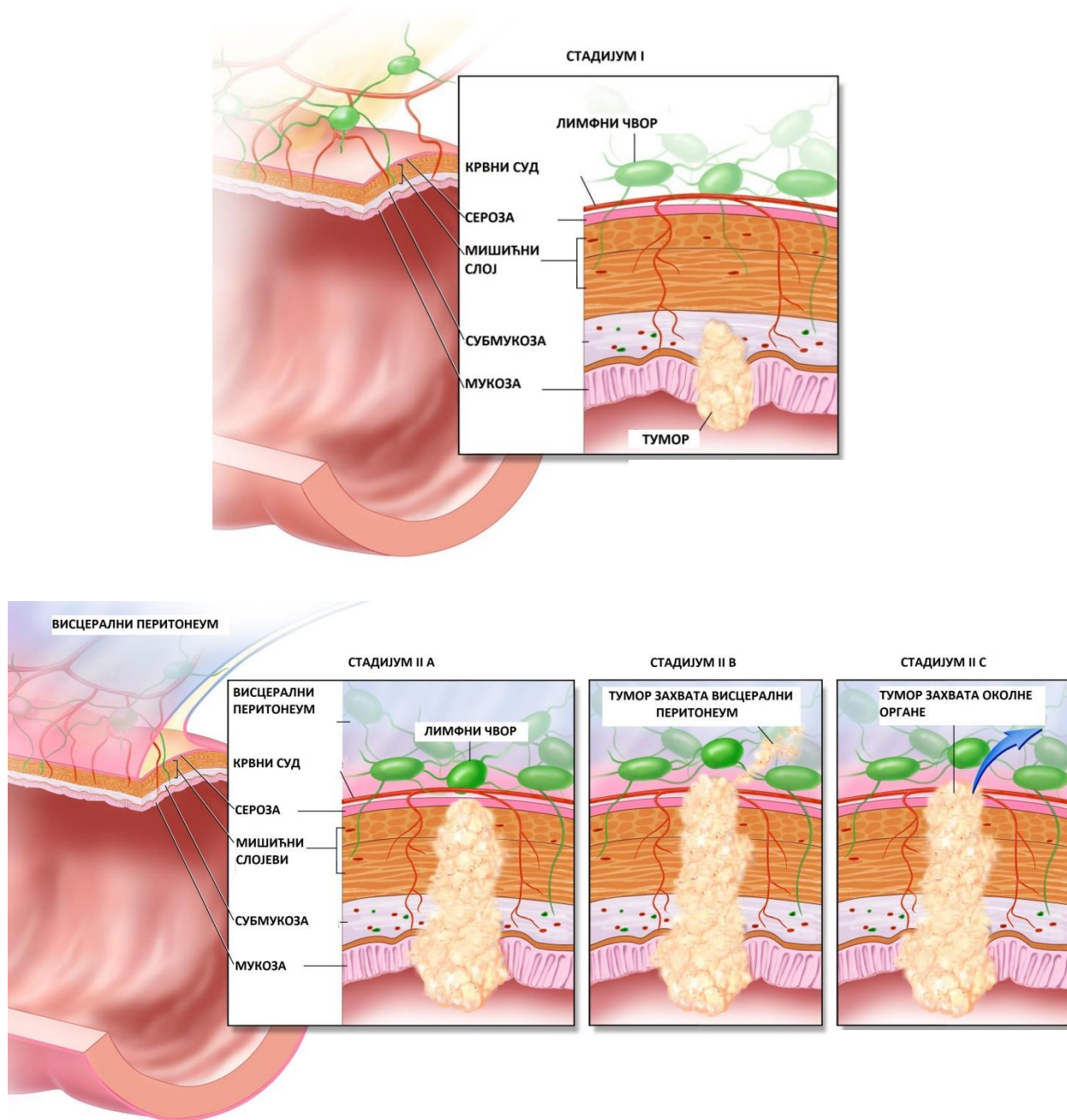
Постојање метастаза се у *TNM* класификацији означава са *M*. Присуство метастаза у само једном солидном органу/само једном месту се означава са *M1a*. Мултипле метастазе у само једном органу, без обзира да ли се ради о парном органу (јајник, плућа, итд.) такође се означавају са *M1a*. Метастазе које захватају више органа или места у телу (сем перитонелане карциноматозе) означавају се као *M1b*. Перитонеална карциноматоза, без обзира на постојање хематогених метастаза у солидним органима означава се *M1c*. Студије указују да 1 – 4% болесника има перитонеалну карциноматозу у тренутку постављања дијагнозе као и да такви болесници имају лошију прогнозу у односу на оне који имају хематогене метастазе (без обзира на број депозита и захваћених органа). Присуство удаљених метастаза не може се идентификовати на ресекату примарног тумора будући да се ова ознака односи на цело тело те стога не би требала да се описује као *pM0* на препарату већ *pMx* (податак није познат) (79, 81).

### 1.2.8.2. Одређивање стадијума тумора

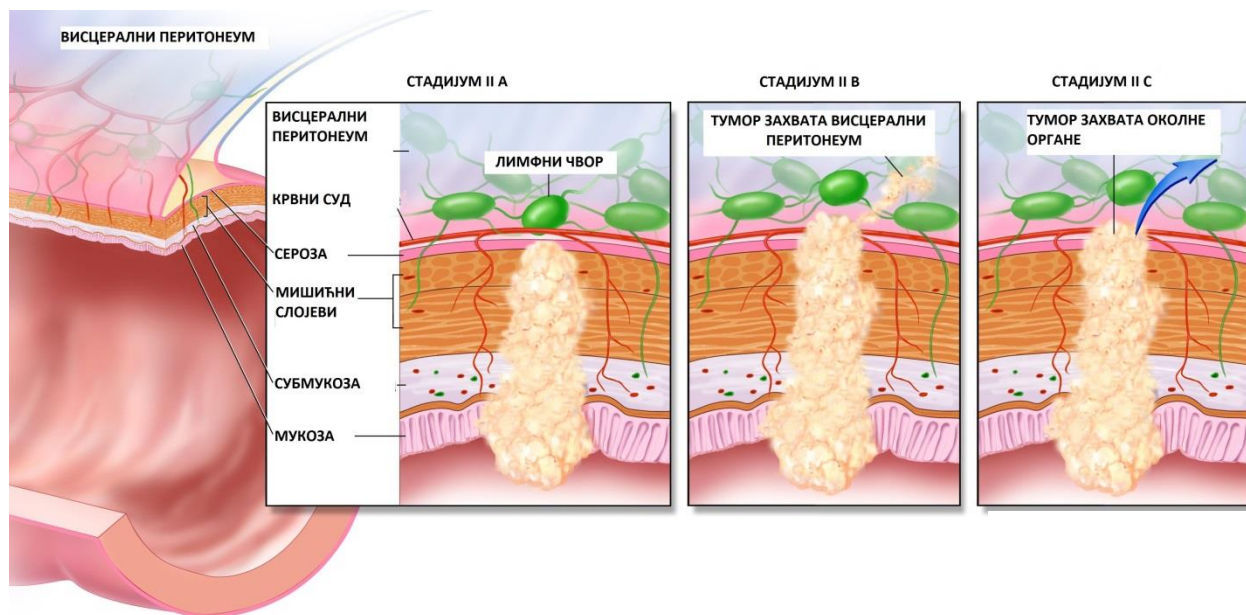
Дјукс (*Dukes*) је 1937. године предложио систем за класификацију карцинома ректума који се може применити и на карцином дебелог црева (82). Класификација се заснива на патохистолошком прегледу а болесници су подељени на I, II, III и IV стадијум у односу на дубину инвазије тумора, захваћеност регионалних ЛЧ и присуство удаљених метастаза. Тренутно је у употреби 8. ревизија *TNM* класификације која је заједничка за *WHO* и *AJCC/UICC* класификацију (53, 79, 81).

Табела 1. Стадијуми КРК на основу *TNM* класификације и 5-годишње преживљавање (53, 54, 81).

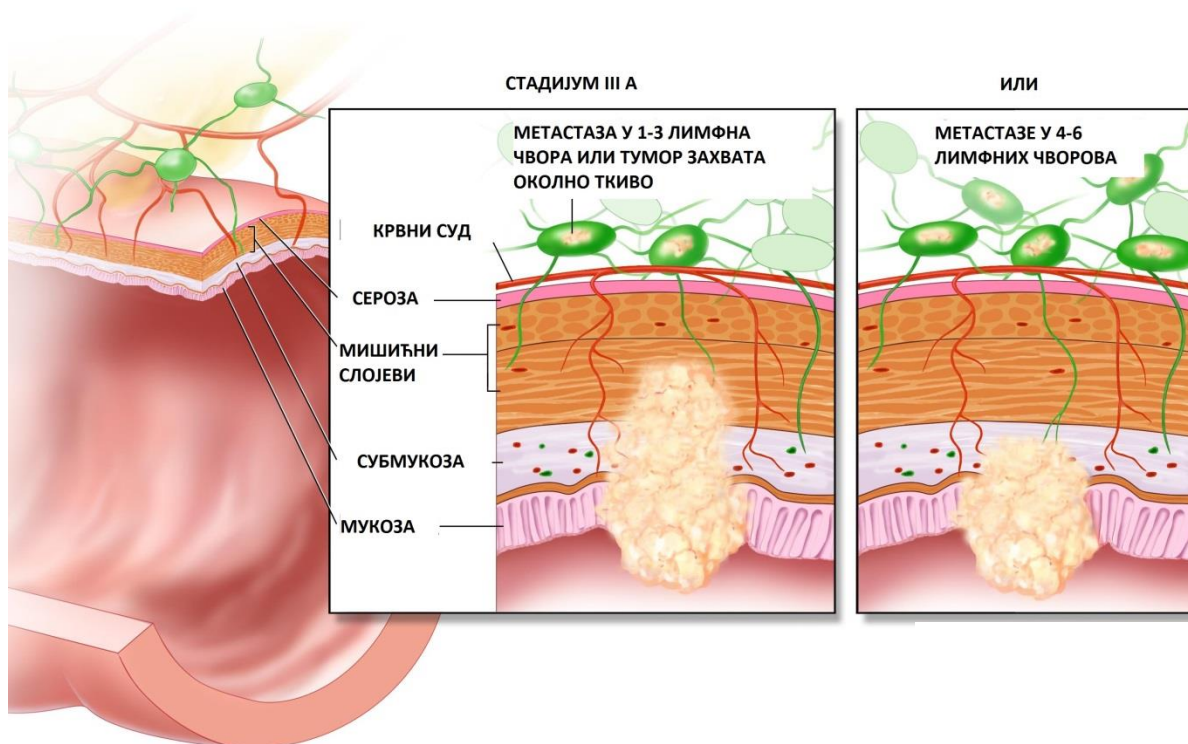
<b>T</b>	<b>N</b>	<b>M</b>	<b>СТАДИЈУМ</b>	<b>5-годишње преживљавање</b>
Tis	N0	M0	0	100%
T1, T2	N0	M0	I	Преко 80%
T3	N0	M0	IIA	67%
T4a	N0	M0	IIB	60%
T4b	N0	M0	IIC	45%
T1-T2	N1/N1c	M0	IIIA	67,7–73,7%
T1	N2a	M0	IIIA	
T3-T4a	N1/N1c	M0	IIIB	
T2-T3	N2a	M0	IIIB	42,1–58,2%
T1-T2	N2b	M0	IIIB	
T4a	N2a	M0	IIIC	
T3-T4a	N2b	M0	IIIC	12,9–32,5%
T4b	N1-N2	M0	IIIC	
Било који T	Било који N	M1a	IVA	Око 19%
Било који T	Било који N	M1b	IVB	
Било који T	Било који N	M1c	IVC	



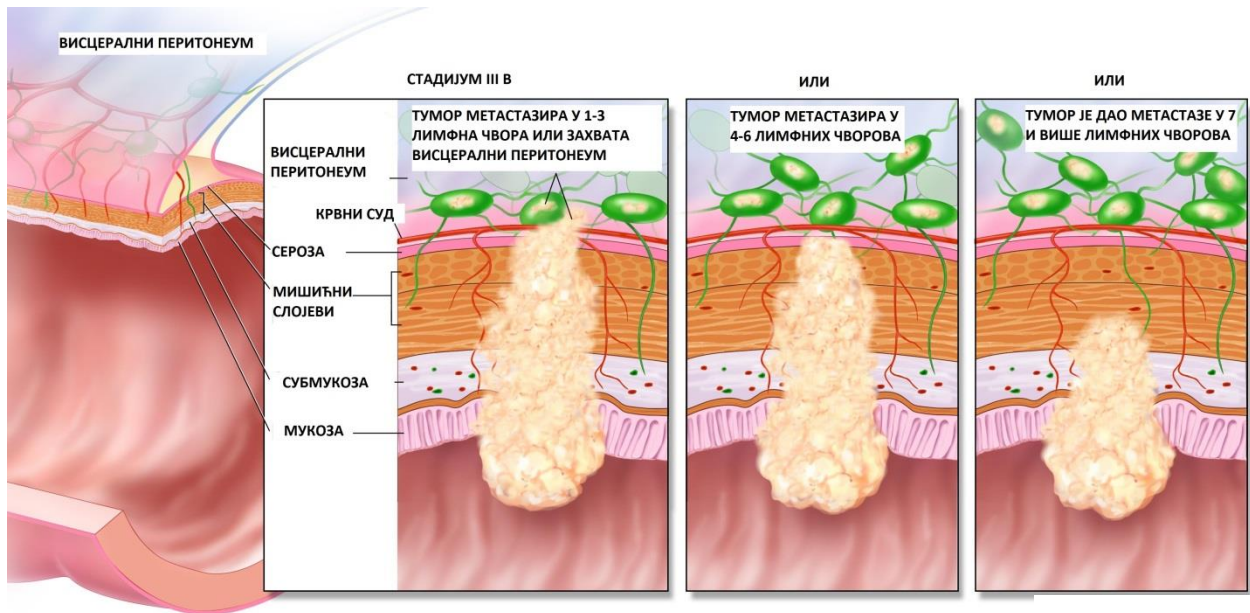
Слика 10. Први стадијум болести према АЈСС (83)



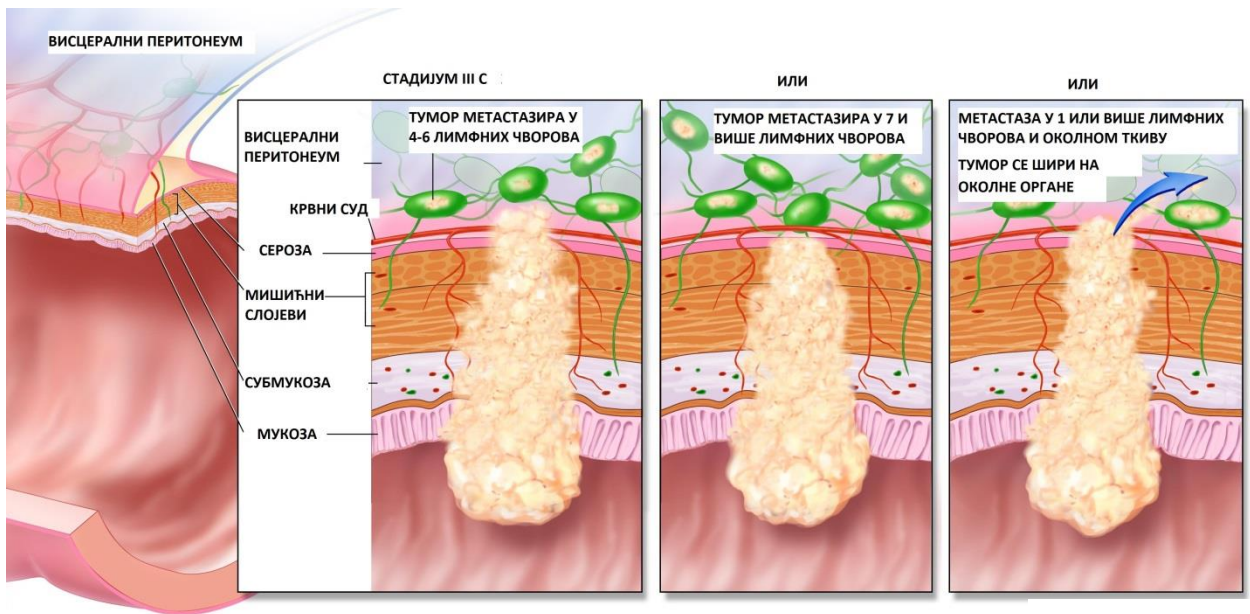
Слика 11. Други стадијум болести према AJCC (83)



Слика 12. Стадијум III А стадијума болести према AJCC (83)

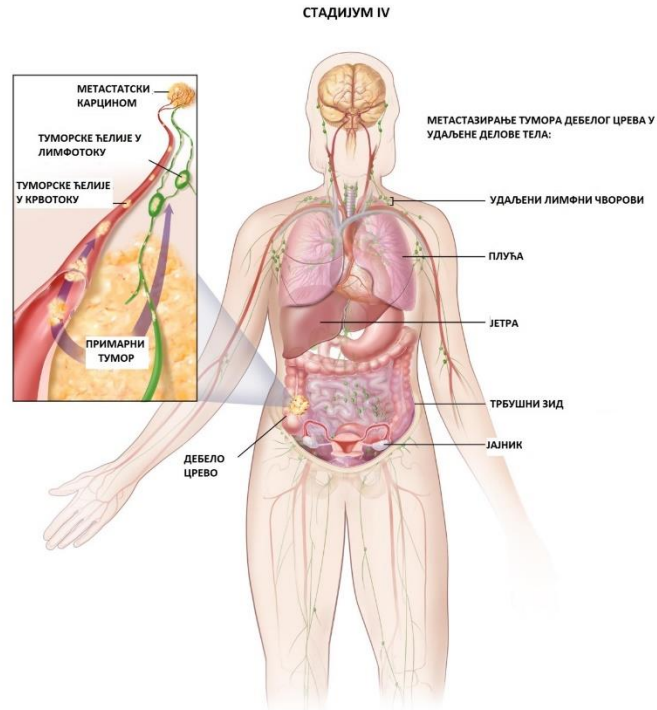


Слика 13. Стадијум III B болести према AJCC (83)



Слика 14. Стадијум III C болести према AJCC (83)



Слика 15. Стадијум *IV* болести према *AJCC* (83)

### 1.2.8.3. Прогностички фактори

Током година предложен је низ прогностичких фактора од којих су најбитнији: хистолошки тип тумора, градус тумора, лимфоваскуларна и перинеурална инвазија, захваћеност ЛЧ метастазама, постојање туморских депозита, туморске маргине укључујући циркуферентну ресекциону маргину (*CRM*), ниво серумског карциноембрионалног антигена (*CEA*), скор туморске регресије код кацинома ректума и молекуларни маркери (53, 81).

- *Хистолошки тип тумора*

Карциноми прстена печатњака и ситноћелијски слабо диферентовани неуроендокрини тумори клинички су најагресивнији и имају најлошију прогнозу (81).

- *Хистолошки градус тумора*

Односи се на степен диферентованости туморских ћелија. Раније класификације су делиле туморе на четири градуса (добро, средње, лоше и недиферентовани тумори) док нове класификације предлажу поделу на туморе ниског (*Low* – са више од 50% glandуларних формација) и високог (*High* – са мање од 50% glandуларних формација) (79).

- *Број прегледаних лимфних чворова*

Лигатура крвних судова на њиховом самом исходишту представља један од онколошких принципа радикалне хируршке ресекције и омогућава прикупљање довољног броја лимфних чворова (22). Одређивање броја и позитивности ЛЧ неопходно је за адекватан стејџинг болести. Према најновијим *NCCN* препорукама из 2019. године потребно је одстранити и ЛЧ изван примарног дренажног подручја тумора уколико се интраоперативно учине сумњивим. Макроскопски измењени ЛЧ који се не одстране приликом операције сматрају се R2 ресекцијом (54). Анализа болесника укључених у *INT-0089* трајал указала је на повезаност броја прегледаних ЛЧ на преживљавање болесника. Наиме болесници који имају већи број одстрањених и прегледаних ЛЧ имају боље преживљавање било да се ради о нодус-негативним или нодус-позитивним болесницима (95). Препоручено је одстрањивање и преглед минимум 12 ЛЧ што је подржано и од *NCCN*, *CAP* и осме едиције *AJCC* (76, 81, 96–101).

- *Лимфоваскуларна инвазија*

Посебно екстрамурална васкуларна инвазија представља изузетно битан прогностички фактор који такође утиче и на план лечења (53, 54, 81, 97). Процењује се да је васкуларна инвазија присутна у око 25% свих ресецираних колона (102). Иако нису спроведене мета анализе, подаци из литературе указују да инвазија како малих тако и великих крвних судова представља лош прогностички фактор. Инвазија малих крвних судова повезана је са метастазама у ЛЧ и неколико студија овај појам описује као засебан лош прогностички фактор (103, 104). Такође, мултиваријантне анализе су показале да екстрамурална венска инвазија представља независан прогностички параметар као и индикатор постојања јетрених метастаза. Значај интрамуралне инвазије мање је истражен (53, 54, 81, 102–105).

- *Перинеурална инвазија*

Инвазија нерава и склопу примарног тумора или у његовој непосредној близини представља лош прогностички фактор који је значајан колико и лимфоваскуларна инвазија (44, 54, 81). Нажалост, перинеурална инвазија често се превиди приликом патохистолошког прегледа и присутна је у око 20% примарних колоректалних карцинома. Туморска инвазија периферних нерава као и перинеуралних простора у дренажном подручју примарног тумора сматра се засебним фактором лоше прогнозе и указује на агресивнији тип тумора (97, 44, 54, 106).

- *Туморски депозити*

Представљају дискретне нодуле тумора у периколичној/периректалној масти, у подручју лимфне дренаже примарног тумора, али без идентификације лимфонодалног

ткива или васкуларних структура. Истраживања показују да присуство оваквих депозита има једнак значај као позитивни регионални ЛЧ и да стога овакви болесници морају бити третирани хемио/радио терапијом без обзира на клинички стадијум I или II. Исто се односи и на болеснике код којих је присутна перинеурална и/или лимфоваскуларна инвазија, без обзира на присуство метастаза у регионалним ЛЧ (81, 96, 99).

- *Обим ресекције колоне и ресекционе маргине*

Када је тумор на истој дистанци између две примарне артеријске гране потребно је лигирати обе артерије (53).

Сматра се да је макроскопска граница од 5 цм од макроскопске ивице тумора довољна. На примеру предње ниске ресекције ректума утврђено је да је ресекциона маргина мања од 1 цм довољна у погледу појаве локалних рецидива (53, 76). Дужина ресецираног илеума не утиче на локалне рецидиве. Онколошки принцип је R0 ресекција тумора. R1 ресекцијом се сматра микроскопско заостајање виталних туморских ћелија на ивици ресеката, макроскопска граница од минимум један центиметар удаљености од тумора представља превенцију R1 ресекције. R2 ресекцијом се сматрају маркоскопски видљиве резидуе туморског ткива и измењених ЛЧ било да су локорегионални или удаљени (76).

- *Циркумферентна ресекциона маргина (Circumferential resection margin – CRM) или радијална маргина*

Односи се на сегменте црева који или нису покривени перитонеумом или су некомплетно перитонеализовани, а пре свега на ректум. Ова маргина представља адвентицијалну мекоткивну маргину која је најближа најдубљој пенетрацији тумора. Што је већа удаљеност, то је боља прогноза. Тумори са експанзивном маргином која се једнако простире имају бољу прогнозу од тумора са инфилтративним растом (76). Интересантно је да су тумори са дифузним растом чешће повезани са MSI (107). CRM настаје као последица хируршке ресекције периколичног и периректалног масног ткива или карличних структура. Овај термин се не односи на анатомску серозу колоне и ректума. CRM се сматра најважнијим фактором локалне контроле болести. Удаљеност CRM је важан прогностички фактор. Тумори код којих је CRM удаљена 0-1 мм имају велику вероватноћу за локални рецидив као и они код којих је сама маргина захваћена тумором. Маргина код које је удаљеност од тумора мања од 1 мм сматра се позитивном. Сматра се да тумори са CRM удаљеном више од 1 цм имају смањену вероватноћу за локални рецидив а сам тим је побољшано преживљавање (76, 81).

- *Ниво серумског CEA (Carcinoembryonic Antigen)*

Локализован је на површини ћелијске мембране и нормално се налази у феталном ткиву црева. Утиче на ћелијску адхезивност, интеракцију између ћелија и

диференцијацију. Метаболише се првенствено у јетри, а његов полуживот у циркулацији износи од једног до осам дана (108, 109). Дијагностичка осетљивост *CEA* за колоректални карцином износи 70%, а специфичност 95% (44, 110). После адекватне терапије ниво у серуму се враћа у границе нормале, док поновни пораст концентрације указује на прогресију болести или присуство метастаза. Повишене концентрације *CEA* налазе се у серуму болесника са карциномима других органа: јетре, плућа, дојке, панкреаса, желуца, бубрега, јајника, простате као и у неким бенигним стањима: цироза, упалне болести црева, хроничне плућне болести, панкреатитис, бенигна хипертрофија простате. Код болесника са колоректалним карциномом као и карциномом дојке и плућа ниво *CEA* у серуму има прогностички значај. Једино се у карциному колоне користи као примарни маркер, док се као секундарни маркер користи *CA 19-9* (53, 54).

Референтне вредности *CEA* код непушача износе  $< 3,8$  и  $< 5,5$  код пушача. Ниво *CEA* се може одређивати из крви, плазме или серума путем *ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)* теста. Препоручује се одређивање нивоа *CEA* пре куративне хирургије за пацијенте у првом, другом и трећем стадијуму болести, потом на три до шест месеци унутар прве две године од операције а потом једном годишње унутар пет година од операције. Ниво *CEA* се такође користи као маркер одговора на терапију код болесника у четвртном стадијуму болести и мери се у месечним интервалима (54, 108–110).

- *Градус туморске регресије*

Патохистолошки одговор на преоперативну радиотерапију (карцином ректума), хемоирадијацију (карцином ректума) или хемиотерапију (карцином колоне) представља важан прогностички фактор. Процену одговора на терапију даје патолог постоперативно након прегледа хируршког ресеката. Постоје јаки докази који указују на значај патохистолошког одговора у прогнози болесника оболелих од колоректалног карцинома. Сматра се да што је степен патохистолошке регресије већи, то је боља прогноза. Комплетна патохистолошка регресија тумора на примењени неoadјувантни третман не мора нужно значити и патохистолошку регресију у ЛЧ који су били измењени пре терапије, стога је потребно брижљиво прегледати ресекат (76).

- *Микросателитска нестабилност (MSI)*

*MSI-H* је важан не само као добар прогностички фактор већ зато што указује на могућност лошег одговора на *5-FU* хемиотерапију. Додавање оксалиплатине негативизује овај ефекат. Недавна истраживања указују да тумори који имају комбиновану *BRAF* мутацију са *MSI-H* имају значајно лошију прогнозу у другом и трећем стадијуму болести (17, 54, 72–74).

- *KRAS* и *NRAS* мутације

*KRAS* и *NRAS* представљају важне медијаторе у сигналним путевима раста и утичу на ћелијски раст и пролиферацију. Ови гени се активирају када се *EGFR* веже за *EGF* или њему сличне факторе раста и том приликом се активирају *RAF* или *PIK3CA* протеини. И *KRAS* и *NRAS* могу бити констатно активирани путем мутација приликом карциногенезе и на тај начин трајно утицати на пролиферацију ћелија и инхибицију апоптозе. Активирајуће мутације најчешће се дешавају на кодону 12 и 13 али могу бити присутне мутације и на кодонима 61 и 146. На исти начин могу бити активирани мутације на кодонима за *NRAS*. *KRAS* може бити активан соматским мутацијама у 40% колоректалних карцинома док је *NRAS* активан у око 7% случајева (53, 67 – 69). Активирање било којег од ова два гена представља лош прогностички фактор за болеснике у трећем и четвртном стадијуму болести (44, 53, 54). Оно што је још важније, активација *RAS* гена спречава деловање инхибитора *EGFR* (111–114).

- *BRAF* мутација

*BRAF* онкопротеин је серин-треонин киназа трансмитер који преноси сигнале од *KRAS*-а или *NRAS*-а до других гена у њиховом нисходном путу и на тај начин доводи до ћелијског раста и пролиферације. *BRAF* мутација је присутна у 6 – 10% колоректалних карцинома и повезана је са сигнификантно лошијом прогнозом укључујући и преживљавање након враћања болести (53). Болесници који имају комбинацију *MSI* и *BRAF* мутације имају нешто бољу прогнозу будући да тумори са *MSI-H* молекуларним профилем имају бољу прогнозу. *BRAF* мутација блокира дејство анти-*EGFR* антитела у четвртном стадијуму колоректалног карцинома (115–117).

- *DCC* гени

Са делецијом алела на хромозому 18q долази до губитка хетерозиготности (*LOH* – *lost of heterozygosity*) на овом хромозому и то резултира инактивацијом појединих тумор супресорних гена међу којима је и *DCC* ген. Ова мутација је повезана са скраћењем преживљавања и лошијом диференцијацијом тумора, васкуларном инвазијом и унапредовалим стадијумом тумора (53, 54, 67–71).

- Ген *p53* је удружен са појавом рецидива и смањеним преживљавањем (69–72, 118–121).
- Васкуларни ендотелни фактор раста (*Vascular Endothelial Growth Factor* – *VEGF*) одговоран је за ангиогенезу и повезан је са метастазирањем КПК. Доказано је да два пута повећава ризик од смрти за КПК (54, 121).
- Грешке у репарацији ДНК могу бити идентификоване као *MSI-H*, могу бити присутне у више од 30% случајева. Иако је ова мутација одговорна за настајање муцинозних и лошије диферентованих КПК, присуство *MSI-H* повезано је са бољом прогнозом те се сматра маркером повољног исхода болести (54, 72, 74).

### **1.2.9. Лечење колоректалног карцинома**

Европско удружење за медикалну онкологију (*European Society for Medical Oncology – ESMO*) дало је предлог за лечење карцинома колоне у односу на *TNM* и *AJCC* класификације као и опште стање пацијента. Према овом водичу пацијенти у првом и другом стадијуму болести неће примати хемиотерапију (осим уколико није присутан неки од додатних фактора ризика тзв. високоризични болесници који се налазе у првом и другом стадијуму болести али чији тумори на дефинитивном патохистолошком прегледу показују знаке лимфоваскуларне инвазије), док ће пацијенти у трећем и четвртном стадијуму болести примити неки вид хемиотерапије (44, 53, 54).

#### **1.2.9.1. Хируршко лечење карцинома колоне**

Хируршка ресекција је основна терапија карцинома колоне. Око 90–92% свих карцинома колоне и 84% карцинома ректума оперишу се (22, 44, 53, 54, 122). Хируршко лечење КРК може бити куративно и палијативно. Основни циљ хируршке ресекције је уклањање оболелог дела дебелог црева заједно са припадајућим мезентеријумом без резидуалне туморске масе (22, 122).

Главни онколошки принципи хируршке ресекције колоне (22, 44, 122):

1. суфицијентна ресекција тумором захваћеног сегмента црева,
2. суфицијентна ресекција припадајућег мезентеријума са припадајућим дренажним лимфним чворовима и
3. минимална канцерска контаминација и/или емболизација (*no touch* техника).

Основни онколошки принцип подразумева ресекцију између два магистрална крвна суда док је сам ниво ресекције одређен васкуларизацијом црева. Уколико је тумор локализован у правцу магистралног крвног суда требало би чак уклонити и суседна два односно укупно три крвна суда.

Свака од поменутих техника може бити изведена класичним путем (кроз лапаротомију) или лапароскопски (22, 44, 122, 124):

1. Десна хемиколектомија – за туморе локализоване на цекуму, асцедентном колону, хепатичној флексури и првој трећини трансверзалног колоне;
2. Проширена десна хемиколектомија – за туморе локализоване на цекуму, асцедентном колону, хепатичној флексури и трансверзалном колону;
3. Ресекција трансверзума – за туморе локализоване на трансверзалном колону;
4. Лева хемиколектомија – за туморе локализоване на десцедентном колону;

5. Проширена лева хемиколектомија – за туморе локализоване на лијеналној флексури и десцедентном колону;
6. Сигмоидектомија – за туморе локализоване на сигмоидном колону;
7. Ресекција ректосигме – за туморе локализоване на дисталном делу сигмоидног колона и проксималној трећини ректума (изнад перитонеалне рефлексije);
8. Комбинације поменутих модалитета (суптотална, тотална колектомија).

#### 1.2.9.2. Хемиотерапија колоректалног карцинома

Значај хемиотерапије код карцинома колона познат је од краја осамдесетих година прошлог века, да би у наредној декади био широко прихваћен. Хемиотерапија је уведена у терапију карцинома колона као адјувантна терапија (након хируршке ресекције). У току су студије које испитују примену неoadјувантне хемиотерапије карцинома колона са, за сада, обећавајућим, резултатима али и даље без јасне препоруке (44, 54).

- *Неoadјувантна терапија карцинома колона*

Преоперативна (неoadјувантна) хемиотерапија може да буде много ефективнија у ерадикацији микрометастаза него када се исти третман примени три месеца касније, колико се обично чека до почетка примене терапије након операције (54). С друге стране, хирургија може значајано да повећа факторе раста тумора у раном постоперативном периоду и да услови прогресију тумора. Делимично скупљање тумора на преоперативну хемиотерапију може олакшати хируршки рад, смањити проценат локалних рецидива. Неoadјувантна терапија се боље подноси него иста терапија након велике хирургије. Најважније, ефекат овог приступа је тзв. тест хемосензитивности, односно констатовање да ли има одговора на примењену терапију или не (44, 53, 54).

Неoadјувантна хемиотерапија са пратећом хемио-радиотерапијом постала је стандардни третман аденокарцинома ректума. Неoadјувантна терапија карцинома ректума индикована је у свим случајевима са  $T3/4$  и  $N1/2$  тумора. Циљ ове терапије је смањење туморске масе које доводи до пораста комплетне ( $R0$ ) ресекције, смањење токсичности и смањење процента локалних рецидива. Ова терапија не доводи до побољшања преживљавања, тако да јој је основна намена локална контрола болести (44, 53, 54).

- *Адјувантна терапија карцинома колона*

Постоперативна хемиотерапија је уведена у клиничку праксу почетком деведесетих година прошлог века. У рандомизираним контролисаним студијама, које су упоређивале само хирургију са хирургијом и хемиотерапијом код болесника оболелих од карцинома колона са позитивним лимфонодусима, показало се да адјувантна хемиотерапија сигнификантно побољшава петогодишње и укупно преживљавање ових болесника.

Хемиотерапија редукује степен повратка болести до 40% и стопу смртности до 33%. Апсолутно побољшање у преживљавању од 11% било је уочено у овим трајалима за нодус-позитивне болеснике третиране хемиотерапијом након ресекције (44).

Стадијум болести је најбитнији предиктивни фактор исхода за оболеле од КРК. Болесници у I стадијуму болести (*T1-2N0M0*) имају одличну прогнозу и петогодишње преживљавање од скоро 95% након куративне хируршке ресекције. Адјувантна терапија у овом стадијуму није индикована (54). Болесници у II (*T3-4N0M0*) стадијуму болести имају петогодишње преживљавање између 70% и 80% али у оквиру овог стадијума постоји подгрупа болесника који имају нешто лошију прогнозу. Управо на основу тог сазнања дошло се до закључка да неки болесници у другом стадијуму болести могу имати бенефит и од адјувантне хемиотерапије но улога саме терапије код ових болесника је још увек горућа тема. За разлику од ових болесника, болесници у III стадијуму (било који *TN1-2M0*) имају јасно доказану корист од адјувантне хемиотерапије у смислу дужег преживљавања (44, 54).

### 1.2.9.3. Адјувантна терапија за II и III стадијум болести

Нодални статус је најзначајнији прогностички фактор КРК. Петогодишње преживљавање након куративне ресекције у III стадијуму болести износи 40 – 60%. Повратак болести код ових болесника је чест, одатле и потреба за адјувантном хемиотерапијом. Будући да је исход болесника у другом стадијуму болести нешто бољи, поставља се питање који су то болесници који ће имати бенефит од примењене терапије (53).

Ефикасност адјувантне терапије која је базирана на 5-флуороурацил (*5FU*)/леуковорину (*LV*) одавно је доказана и користи се као стандард за болеснике у трећем стадијуму болести (44, 53, 54, 125).

*NCCN* водич из 2019. године дао је одређене смернице и препоруке на основу досадашњих трајала и истраживања. Према принципима адјувантне терапије овог водича Фолфокс® (5-флуороурацил/леуковорин/оксалиплатин) супериорнији је од самог 5-флуороурацила за болеснике у трећем стадијуму болести. Такође комбинација капецитабина и оксалиплатина даје боље ефекте од 5-флуороурацила (*5-FU*) у комбинацији са леуковорином датим у болусу код болесника у трећем стадијуму КРК. Бенефит у преживљавању није уочен додавањем оксалиплатина комбинацији *5-FU/LV* код болесника у другом стадијуму болести. Давање Фолфокса у другом стадијуму болести индиковано је само код високоризичних болесника. Препорука је да се у стадијуму II даје адјувантна хемиотерапија само у случајевима високог ризика као што је: *T4* стадијум, мање од 12 прегледаних лимфних нодуса, опструкција или перфорација тумора, лоше диферентован тумор, присуство лимфо-васкуларне инвазије, а према новијим препорукама потребно је узети у обзир и генске мутације попут микросателитске



нестабилности и *RAS* мутација. Само присуство ових мутација није довољно за доношење одлуке о третману (54, 125).

#### 1.2.9.4. Биолошка таргет терапија

Током неколико последњих година уочен је бенефит од примене биолошке терапије за болеснике у четвртном стадијуму болести. Сматра се да ова терапија може побољшати ефикасност хемиотерапије. Антитела против епидермалног фактора раста/*Epidermal Growth Factor – EGFR* (Цетуксимаб) и васкуларног ендотелног фактора раста/*Vascular Endothelial Growth Factor – VEGF* (Бевацизумаб) су најзначајнији. У току је неколико студија чији би резултати могли утврдити евентуалну корист од примене ових агенаса код болесника у другом и трећем стадијуму болести. Студије су засноване на примени молекуларних маркера у сврставању болесника у погдрупе који би могли имати бенефит од примењене биолошке терапије (44, 53, 54, 126–129).

#### 1.2.9.5. Маркери одговора на хемиотерапију

Листа предиктивних маркера је ограничена. Један од првих таквих предиктора одговора на терапију је тимидилат синтаза (*Thymidylat synhtase – T<sub>y</sub>S*). Механизам којим *5FU* делује је инхибиција *T<sub>y</sub>S* која учествује у синтези и репарацији ДНК. Висок ниво *T<sub>y</sub>S* у туморском ткиву повезан је са бољим одговором на терапију, а низак ниво има боље ефекте ако се лечи само хирургијом. До данас нема дефинитивних доказа да је потребна имунохистохемијска идентификација повишеног нивоа *T<sub>y</sub>S* у ткиву за доношење одлуке о примени *5FU* терапије (72–74).

Статус *MSI* се такође користи за предикцију одговора на хемиотерапију. Више студија је показало да болесници чији су тумори *MSI-H* не реагују на *5FU* и да овај облик хемиотерапије има неповољан ефекат на ове болеснике. Механизам овог ефекта није јасан. С обзиром на то да је *5FU* у саставу многих протокола у лечењу болесника са колоректалним карциномом, *MSI* статус би требало разматрати у оним случајевима где није сасвим јасна потреба за адјувантном хемиотерапијом као и код болесника у стадијуму II и III који тешко толеришу хемиотерапију (44, 54, 72–74).

Табела 2. Предиктивни маркери у колоректалном карциному (72–74)

Таргет	Молекуларни генетски маркер
Хемиотерапија код високоризичних болесника у стадијуму II	<i>18q</i> делеција Микросателитно стабилни – <i>MSS</i>
Одговор на <i>5FU</i>	Висока експресија <i>Thymidylate synthase</i> Микросателитно стабилни – <i>MSS</i>
Одговор на иринотекан	<i>MSI-H</i>
Одговор на цетухимаб	Амплификација <i>EGFR</i> Немутирани <i>RAS</i>
Одговор на преоперативну Хемио и радиотерапију	Непознат
Одговор на оксалиплатин	Непознат
Одговор на бевацизумаб (авастин)	Непознат ( <i>VGEF</i> )

Статус *MSI-H* је и предиктор одговора на иринотекан у комбинацији са *5FU*. Претпоставка је да је ово повезано са сензитивношћу ћелија са дефицијенцијом *MMR* гена, што је заправо механизам ћелијске смрти индукован иринотеканом (54, 65, 66).

Данас се сматра да поремећаји у механизму апоптозе могу утицати на одговор тумора на хемиотерапију. Показано је да су *p53* мутације повезане са резистенцијом на хемиотерапију, мада ово запажање нису потврдили сви истраживачи (54, 118, 119).

Увођење биолошке таргет терапије отворило је могућност да се развију тестови који ће мерити ниво таргет молекула у ткиву. Откривено да је мутација *All-ras* (*K* и *N Ras*) гена повезана са резистенцијом, односно да пацијенти са метастатским колоректалним карциномом код којих постоји немутирани (*wild-type*) *All-ras* ген у тумору, третирани

ербитуксом у комбинацији са стандардном хемиотерапијом у првој линији терапије метастатске болести, имају знатно бољи одговор и значајно смањен ризик од прогресије болести у поређењу са онима код којих је *All-Ras* мутиран. Одређивање *All-ras* статуса је за сада једини молекуларни маркер који се стандардно одређује у дијагностичкој пракси (68, 69, 111–113, 125).

### 1.3. КАНЦЕРСКЕ МАТИЧНЕ ЋЕЛИЈЕ

Канцерске матичне ћелије (КМЋ) већ деценијама представљају предмет интезивне дискусије (130). Теорија настанка КМЋ се мењала током тог периода. Сама претпоставка да постоје матичне ћелије тумора које су независне од осталих ћелијских линија побуђује потребу за њиховом идентификацијом ради ефикаснијег лечења тумора. Оформљавање концепта КМЋ такође може да понуди објашњење за брзи релапс болести након успешног иницијалног одговора. Одговор лежи у претпоставци да су КМЋ мање осетљиве на примењену терапију у односу на зреле ћелије које сачињавају масу тумора (130–139). Сматра се да КМЋ путем генетских и епигенетских промена задржавају терапијску резистенцију, као и да ту способност могу пренети на своје ћелије ћерке. Интеракције КМЋ са њиховом микроколином такође могу допринети њиховој способности резистенције (140–143).

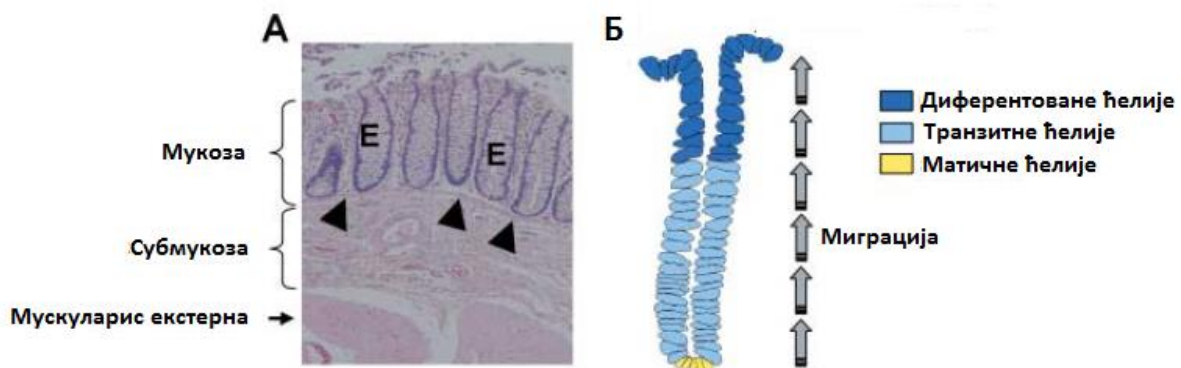
Адјувантна хемиотерапија је стандард лечења код болесника у трећем стадијуму болести код којих је показала значајан ефекат на спречавање враћања болести и укупно преживљавање болесника (44, 51). У првом и другом стадијуму болести карцинома колоне адјувантна хемиотерапија није показала клинички значајан ефекат (143). Имајући у виду висок проценат леталног исхода унутар првих пет година од операције код ових болесника, постоји потреба да се дефинише високоризична група подус-негативних болесника за које се претпоставља да би могли имати користи од адјувантне хемиотерапије. Постоје бројна истраживања која указују на могућност значаја КМЋ у ширењу, расту и метастазирању примарног тумора (130–143).

#### 1.3.1. Организација крипти колоне, интестиналне матичне ћелије и њихова идентификација

Унутрашњи, луминални слој дебелог црева се састоји од једног слоја епителних ћелија које су поређане у прстолике инвагинације које су уроњене у субмукозно везивно ткиво градећи Либеркинове крипте (134–136). Свака крипта садржи око две хиљаде ћелија. Дебело црево одраслог човека садржи приближно 14.000 крипти по квадрантом центиметру односно приближно 1,5 м у дужини и око 20 цм у ширини. То

значи да епител дебелог црева поседује око билион ћелија. Уколико узмемо у обзир стопу обнављања епитела колона процењује се да се током живота продукује око  $6 \times 10^{14}$  колоноцита (136). Крипте се састоје од три терминално диферентоване ћелијске линије: колоноцита (апсорптивни ентероцити), муцин-секретујућих пехарастих ћелија и ендокриних ћелија. Панетове ћелије, које су функционално најприближније неутрофилима су раштркане на дну крипти и не подлежу миграцији ка лумену. Ове три ћелијске лозе се константно обнављају и десквамирају у лумен дебелог црева. Обнављање интестиналног епитела се одвија на сваких пет дана и регулисан је матичним ћелијама које су под утицајем микрооколине (135–137).

Матичне ћелије се у нормалном ткиву дефинишу као недиферентоване ћелије које имају могућност продукције ћелија карактеристичних за дато ткиво као и недиферентованих потомака матичних ћелија који су задржали потенцијал самообнављања (144).



Слика 16. Организација епитела дебелог црева. А – приказ епитела (Е) здравог колона обојен хематоксилин-еозин методом; Б – топографија крипти колона (145)

Теорију да све терминално диферентоване ћелије епитела дебелог црева настају од једне, мултипотентне матичне ћелије први пут су представили Чен и Леблонд (*Chen, Leblond*) 1974. године на моделу црева миша. Кернс (*Cairns*) је 1975. године представио своју хипотезу „бесмртних ланаца“ која је заснована на претпоставци да ИМЋ могу селективно задржавати своје оригиналне ланце ДНК док друге, новосинтетисане ланце преносе својим ћелијама ћеркама. Недавно је доказано да је ова теорија погрешна. Током последње четири деценије оформљене су две нове теорије: теорија „модела на четвртој позицији“ (+4 *position model*) и теорија „зоне матичне ћелије“ (*stem cell zone*). Теорија модела на четвртој позицији заснована је на претпоставци да свака крипта садржи 4 – 6 независних интестиналних матичних ћелија (ИМЋ) које се налазе на четвртој позицији док се на прве три позиције налазе терминално диферентоване

Панетове ћелије. Теорија зоне матичних ћелија је базирана на идентификацији малих, недиферентованих, циркулишућих ћелија које су разбацане између Панетових ћелија, у близини дна крипте (136, 138).

Нормалне, одрасле матичне ћелије су специфичне за тип ткива и орган. Одрасле матичне ћелије имају неколико кључних одлика као што су могућност самообнављања, пластитет, потенцијал за диференцијацију у више типова ћелијских лоза и регенерација ткива. Тип деобе матичних ћелија је веома битан с обзиром да он одређује тип прогеније и број будуће ћелијске популације. Матичне ћелије се деле споро а њихова деоба може бити симетрична и асиметрична. Приликом симетричне деобе настају или две матичне ћелије или две диферентоване ћелије. Уколико дође до продукције две матичне ћелије доћи ће до проширења, тј. експанзије лозе док ће у случају настајања две диферентоване ћелије, доћи до изумирања ћелијске лозе. Симетрична деоба код колореталног карцинома је есенцијална на путу повећања броја туморских ћелија (139). Интестиналне матичне ћелије (ИМЋ) су недиферентоване, мултипотентне са могућношћу самообнављања. Углавном се деле асиметрично и том приликом дају две различите ћелије ћерке. Једна ћерка ћелија је идентична као ИМЋ од које је настала, док друга ћерка ћелија има могућност диференцијације (прогенитор). Ове ћелије, прогенитори, мигрирају ка врху крипте и репродукују потпуно диферентоване интестиналне ћелије. Симетричне деобе ИМЋ су могуће у случају повреде, болести или карцинома. Епителијално-мезенхималне интеракције омогућавају нормалну интестиналну архитектуру и диференцијацију (140, 141). Фактори као што су коштани морфогени протеин – *bone morphogenic protein (BMP)*, антагониста *gremlin 1 (GREM 1)* и *gremlin 2 (GREM 2)*, сигнални путеви нише, *Ephrin B1 (Eph-B1)* и његови рецептори *Eph-B2* и *Eph-B3b* утичу на понашање ћелије, њену миграцију и диференцијацију. Деоба ИМЋ је под контролом интестиналне микрооколине (тзв. нише). Нише се састоје од целуларних и екстрацелуларних компонената које осигуравају оптималне услове за деобу путем секреције различитих цитокина, фактора раста који су продукти мезенхималних ћелија миофибробластне лозе. Компоненте лумена крипти као и неке бактерије такође могу утицати на животни циклус ИМЋ (146–154).

Ниједна од поменутих теорија није могла бити у потпуности доказана до открића ћелијских специфичних маркера који се налазе на површини матичне ћелије а који су нам омогућили њихову идентификацију. Постоји неколико предложених молекула који би могли послужити као маркери матичних ћелија (табела 3). *Musashi-1 (Msi-1)* је градивни протеин РНК (рибонуклеинска киселина) који омогућава да матична ћелија остане у недиферентованом стању. Његова експресија је уочена на позицијама 1–10 у криптама и не уочава се код потпуно диферентованих ћелија (155, 156). Један од такође предложених молекула је и транскрипциони репресор *Hes-1*, који

је трансактивиран од стране *Msi-1*. Интегрин  $\beta 1$  (*CD29*) је адхезивни молекул  $\beta 1$  ћелија који је локализован на дну крипте и поседује могућност формирања ћелијских колонија. Рецептори ћелијске површине *EphB* су одговорни за регулацију миграције и пролиферације, њихов потенцијал опада од дна према врху крипте (155–160). Поликомб репресор протеин *Bmi-1* је члан поликомб-репресор комплекса који је одговоран за одржавање хроматина у ћелијама као и регулацију пролиферације. Таргет ген *Wnt* (*Wingless Intestinum*), *Leucine-rich repeat containing G protein-coupled receptor 5* (*Lgr5*) налази се искључиво у дну крипте и утиче на потенцијал самообнављања и мултипотенције. Алдехид дехидрогеназа (*Aldh-1*) је детоксикујући ензим чија се експресија може уочити на малом броју ћелија локализованих на дну крипте (153, 156). *Doublecortin* и *CAM kinase-like 1* (*DCAMLK-1*) је микротубул-повезана киназа која има експресију на подгрупи *Msi-1* ћелија. Проминин-1 (*CD133*) је петоугаони трансмембрански гликопротеин који је одговоран за организацију плазма мембране. Он је у коекспресији са *Lgr-5* и локализован је на дну крипте. *Tert*–реверзна теломераза транскриптазе и транскрипциони фактор *Ascl-2* су таргети путева нише и *Wnt* и локализовани у колумнарним ћелијама на дну крипте (134, 137, 139, 160–162).

Табела 3. Маркери нормалних интестиналних матичних ћелија (139)

Маркери нормалних интестиналних матичних ћелија (ИМЋ)
<i>Msi-1</i>
<i>Hes-1</i>
<i>Integrin-β1</i> ( <i>CD29</i> )
<i>Eph-B</i> рецептори
<i>Bmi-1</i>
<i>Lgr-5</i>
<i>ALDH-1</i>
<i>DCAMLK-1</i>
<i>Проминин-1</i> ( <i>CD133</i> )
<i>Tert</i>
<i>Ascl-2</i>

### 1.3.2. Теорија канцерских матичних ћелија и колоректална карциногенеза

Теорију КМЋ први пут је предложио Конхајм (*Cohnheim*) 1875. године. Његова теорија се заснивала на четири принципа: 1. број унутрашњих и спољашњих инзулта попут радијације, повреде или утицаја карциногена могу резултирати генетским оштећењима у матичним ћелијама; 2. свака оштећена ћелија продуковаће морфолошки карактеристичан тип тумора; 3. све ћелије из истог тумора имају исти профил у

различитим стадијумима прогресије и 4. различити тумори који су настали из различитих матичних ћелија имају различите генетске и биохемијске профиле (144). Водећи се овом теоријом, Новел (*Nowell*) је 1976. године представио своју теорију клоналне еволуције тумора која се такође заснивала на четири тачке: 1. број унутрашњих и спољашњих инзулта попут радијације, повреде или утицаја карциногена може имати утицај на појаву генетских оштећења у матичним ћелијама; 2. генетски оштећена ћелија даје карактеристичан морфолошки тип тумора; 3. нови ћелијски клонови се константно рађају из истог тумора и 4. само најагресивнији тумори, са израженим потенцијалом раста, напредују и продукују ћелијске клонове (144). У протеклих 200 година објављене су и две фундаменталне теорије карциногенезе – стохастичка теорија и теорија канцерских матичних ћелија. Према стохастичком моделу карциногенезе (теорија ембрионалних заостатака) карцином се изворно налази још у ембрионалним ћелијама, где се налази у различитим ткивима из ембрионалне фазе а потом се активира у току каснијег живота. Према овој теорији било која ћелија је способна да иницира и промовише настанак карцинома. Теорија генетских мутација (теорија канцерских матичних ћелија) сугерише да су карциноми хијерархијски организовани и да само КМЋ могу промовисати настанак карцинома. Ова хипотеза повлачи за собом даља питања у вези са тренутним дијагностичким и куративним методама указујући на то да би идентификација и циљана терапија ових ћелија могла унапредити досадашње резултате лечења (193, 134, 144). КМЋ су резултат генетских поремећаја на више нивоа које су окарактерисане специфичним мутацијама на путевима трансдукције сигнала. Прогресија од аденома до карцинома и метастатске болести захтева симултано заказивање протективних механизма који укључују *APC* ген, *p53* и фактор трансформације раста – *transforming growth factor (TNG-β)*. Индукција путева онкогенезе као што је *RAS* такође има велику улогу у настанку КРК (163–168).

Интестинална хомеостаза је под утицајем мреже путева као што су *Wingless Int* (*Wnt*), *Notch* и *Hedgehog* (141, 156). Ови путеви одржавају баланс и контролишу ћелијску пролиферацију, самообнављање и миграцију (144, 168). До туморигенезе долази када ћелија не успе да прати наведене путеве, односно када дође до инсуфицијентног примања сигнала за раст, несензитивности за сигнале који супримирају раст, избегавања апоптозе, безграничног потенцијала за репликацију, континуиране ангиогенезе и инвазије ткива (385). *Wnt* има круцијалну улогу у интестиналној пролиферацији и одржавању интестиналних матичних ћелија путем експресије транскрипционих фактора и адхезивних молекула. *Wnt* је абнормалан у случају КРК (142, 156). Браблец (*Brabletz*) и сарадници су у свом раду указали да болесници са фамилијарном аденоматозном полипозом колоне поседују дисфункционалан *APC* који дозвољава кумулацију β-катенина у цитоплазми ћелија. β-катенин је у нормалним околностима везан за мембранозни Е-кадхерин (71). Приликом уласка β-катенина у нуклеус ћелије долази не само до активације ћелијског циклуса већ и до губитка мембранозног Е-кадхерина и супресије његове експресије. Ово доводи до губитка

међућелијског контакта што омогућава миграцију ћелија из епителијума у мезенхим. Овај процес се назива „епителијално-мезенхимална транзиција“ (EMT). EMT је есенцијална у процесима попут ембриогенезе и зарастања рана будући да губитак E-кадхерина омогућава миграцију ћелија. У случају колоректалног карцинома, највећа концентрација нуклеарно смештеног  $\beta$ -катенина је идентификована у туморским ћелијама које инвадирају маргину будући да је код ових ћелија дошло до губитка експресије E-кадхерина. Присуство оваквих ћелија повезује се са метастазирањем и лошом прогнозом. (135, 139, 146). Инактивишуће мутације у APC гену или активишуће мутације у  $\beta$ -катенину доводе до интестиналне хиперплазије, преласка са асиметричне на симетричну деобу и повећаног преживљавања ћелија (154). Ноч потецира пролиферацију и инхибира диференцијацију што такође може индуковати туморигенезу ћелија (143). *BMP* и *TGF- $\beta$*  припадају фамилији лиганда чији су рецептори у интеракцији са интрацелуларном каскадом *SMAD* протеина. Истраживања на оболелима од јувенилне полипозе колона указују на то да *BMP* и *SMAD* протеини имају веома битну улогу у интестиналној архитектури. Вилозни мезенхим показује експресију фамилије *BMP* лиганда док се експресија фосфоризованих *SMAD* протеина налази у нуклеусу епителијалних ћелија што указује на то да су епителијалне ћелије терминални реципијенти у сигналним путевима. *Wnt* и *BMP* сигнални путеви су у међусобној интеракцији како би контролисали самообнављање интестиналних матичних ћелија (168). У највећем броју случајева експресија *BMP* је присутна у стромалним ћелијама и има супротан ефекат од *Wnt*. *TGF- $\beta$*  је инхибитор раста интестиналних епителијалних ћелија и индуктор апоптозе. Улога хецхога је још увек недовољно разјашњена. Препоставка је да делује као супресор *Wnt*, вероватно посредством *BMP*. Примећена је експресија хецхога на +4 позиционираним матичним ћелијама (136, 138, 140, 156, 168). На крају активација фосфоинозитид-3-киназе (*PI3K*) доводи до рапидне и издашне пролиферације ИМЋ у колоректалној карциногенези (372). И ИМЋ И КМЋ поседују микрооколину, с тим да је микрооколина КМЋ развила тумор-промовишуће особине (156). Реципрочне интеракције између ИМЋ и њихове нише се налазе у позадини малигне трансформације. Генетске или епигенетске аберације у ИМЋ компартменту могу довести до малигних алтерација у ниши и обрнуто. Туморска ниша је састављена од различитих ћелија које продукују факторе раста (фактор раста хепатоцита, епидермални фактор раста, инсулину слични фактори раста, фактори раста фибробласта, васкуларни ендотелни фактор раста) и цитокине (тумор некрозис фактор алфа и бета и интерлеукин 6) који врше промоцију дедиференцијације, карциногенезе и инвазивности (137, 155, 161, 166).

Као што је поменуто раније у тексту, само мала субпопулација ћелија поседује способност да генерише примарни тумор. КМЋ се карактеришу високом способношћу самообнављања, мултипотентношћу, неограниченим пролиферативним потенцијалом и могућношћу избегавања имуносистема. Термин самообнављања се односи на могућност стварања потпуно нове матичне ћелије са идентичним, интактним потенцијалом за пролиферацију, експанзију и диференцијацију, без обзира на ограничења која задаје



„базен матичних ћелија“. Самообнављање је под утицајем протоонкогених путева ((*Wnt/β-катенин*, *хеџог* и *нотч*) (168). Повећан број КМЋ може се јавити у лоше диферентованим туморима (кроз асиметричну ћелијску деобу оштећених матичних ћелија) као и у узнатредовалим туморима. Диференцијација и хомеостаза су поремећене у случају стварања КМЋ (168–171).

Нормалне матичне ћелије деобом стварају ћерке ћелије са једнаким бројем парова хромозома као мајка ћелија док КМЋ могу продуковати, ниједну, једну или две интестиналне ћерке ћелије са неједнаком дистрибуцијом хромозома (160). Оваква појава доводи до неопластичних промена интестиналних крипти код КРК уз формирање хаотичних структура које карактеришу: ирегуларан облик, дезмопластична строма и гранајуће крпте. КМЋ имају способност неконтролисане пролиферацију што доводи до формирања туморске масе путем повећања ћелија сличних КМЋ (159, 160).

### 1.3.3. Идентификација канцерских матичних ћелија

Особине КМЋ (самообнављање, диференцијација, тумор-иницирајућа способност, асиметрична деоба путем ненасумичне хромозомске деобе) заједно су са различитим мембранским и цитоплазматским маркерима искоришћене за идентификацију тумор-иницирајућих канцерских ћелија. Током година уложени су велики напори да би се открили специфични маркери КМЋ коју би омогућили идентификацију ових ћелија (134, 144, 162).

Постојање КМЋ дебелог црева први пут су документовале две независне групе истраживача на челу са Џоном Диком (*John Dick*) и Руђером де Маријом (*Ruggero De Mario*) који су у својим истраживањима описали постојање мале популације туморских ћелија које су способне да изазову раст тумора код имунодефицијентног миша (143). Имплантацијом дилуције ћелија хуманог карцинома колона у претходно озраченог, негојазног, имунодефицијентног миша са дијабетесом, Обрајен (*O'Brien*) и сарадници су доказали да само мала популација ћелија карцинома колона може изазвати раст тумора (164). Ричи-Винтијани (*Ricci-Vintiani*) и сар. су помоћу *flow* цитометрије идентификовали ретку популацију *CD133<sup>+</sup>/cytokeratin (CK) 20<sup>-</sup>* ћелија које показују висок туморигени потенцијал (134, 173–184).

Вајтхед (*Whitehead*) и сарадници су развили ин витро систем ћелијских култура у циљу умножавања прогениторних ћелија колона (185). Овај такозвани тест клонова употребљен је како би се посматрала потенцијална улога експресије интегрина као биомаркера ИМЋ. Суперфамилија интегрина трансмембранозних гликопротеина је веома битан медијатор ћелијског раста, пролиферације, диференцијације, миграције и апоптозе. Иницијално, флуоресцентна анализа препарата мукозе колона је установила да се и  $\alpha$  и  $\beta$ -интегрин налазе у доњим деловима крипте колона. Ефрин-рецептори представљају важне регулаторе ћелијског позиционирања и миграције интестиналног епителијума. Показују

особину градијентне експресије, при чему је највећа активност у дну крипте а најмања на споју крипте и вилуса односно на месту иницијације диференцијације ћелија (144, 145).

Најчешће коришћене методе су оне које се заснивају на антителима као што су имунохистохемијско бојење, *FACS (fluorescence-activated cell sorting)* анализе, ћелијско сортирање, имуномагнетна сепарација, итд. (168). Присутност великог броја метода указује на то да ниједна од њих није савршено ефикасна, те зато не постоји јасан консензус о њиховом избору приликом покушаја идентификације КМЋ.

Присуство ових површинских маркера је довело до експеримената који укључују раздвајање туморских ћелија на субгрупе а потом тестирање њиховог потенцијала туморигенезе (143). Убризгавање малих концентрација ћелијских популација „обогаћених“ канцерским матичним ћелијама у имунокомпромитованог миша довело је до стварања тумора који је хистолошки и фенотипски идентичан као оригинална неоплазма из које су КМЋ изоловане. Убризгавање туморских ћелија које не поседују особине матичних ћелија није довело до стварања тумора, чак ни приликом убризгавања великих концентрација поменутих ћелија (144, 158, 168).

#### 1.3.4. Маркери канцерских матичних ћелија

Тренутно постоји преко десет предложених маркера који се могу потенцијално искористити за идентификацију КМЋ: *CD133, CD24, CD29, CD44, CD166 (ALCAM), EpCam, Lgr5, OCT4, SOX2, NANOG, c-Myс, KLF4, STAT3, ABCG2, SALL4, ALDH1A1* и *ALDH1B1* (табела 4). Ћелије у којима су идентификовани ови маркери показале су се способним да стварају туморе путем клонирања ћелија примарног тумора и стварањем вишеструких лоза ћелија. Супсетови ових молекула такође су повезани са узнапредовалим туморима, диференцијацијом, инвазивношћу, метастазирањем и прогнозом (135, 140, 152, 162–168).

Као што је поменуто раније у тексту, постоји неколико метода за ин витро идентификацију матичних ћелија али без јасног консензуса о употреби једне јединствене методе која се показала најефикаснијом. Из техничких разлога најчешће се употребљава раздвајање ћелија на основу протеина ћелијске површине *FACS* методом за које се сматра да су повезани са фенотипом КМЋ. Потентност КМЋ је демонстрирана путем ксенографских модела. Популација КМЋ је филтрирана путем *FACS*, сортирањем туморских ћелија на основу експресије специфичних маркера смештених на површини ћелије, а који су присутни у субпопулацији ћелија које поседују способност иницијације тумора (144, 145). Молекуларни биомаркери пружају одређени бенефит будући да омогућавају идентификацију специфичног типа ћелија или ћелијских популација које су повезане са током болести и њеним исходом. Методе идентификације КМЋ су базиране на маркерима који су специфични за нормалне прогениторе или матичне ћелије истог органа (168, 183).

**CD133/Prominin-1** је 120 *kDa* холестерол-интерактујући, петоугаони, трансмембранозни гликопротеин који припада породици промина. Састоји се из екстрацелуларног N-терминалног домена и цитоплазматског C-терминала који садржи резидуе тирозина. Први пут је препознат као површински протеин субпопулација хематопоеетских матичних ћелија и прогенитора (170, 166). Изоловање канцерских матичних ћелија КПК путем експресије *CD133* први пут је поменуто у раду Обрајена и Ричи-Винтијанија. Туморигени потенцијал *CD133* посматран је на свеже издвојеним туморским ћелијама које су убризгане у имуносупримираног миша. Поред тога што су овим путем доказали туморигени потенцијал КМЋ које показују експресију *CD133+*, показано је и да су јетрене метастазе богате популацијом ћелија које показују експресију *CD133+* (134, 164). Проточна цитометрија (*Flow cytometry*) показала је преклапање ћелија које показују експресију *CD133+* са ћелијама које имају експресију *CD44*, *CD29*, *CD24* и *CD166* што је објавио у раду *Todaro* са сарадницима (143, 168). Први резултати истраживања били су обећавајући у проглашавању *CD133+* за маркер КМЋ, међутим даља истраживања су показала да се овај маркер може детектовати у великом броју туморских ћелија, без обзира на њихов потенцијал туморигенезе (170, 166, 183, 187–189).

**CD29/  $\beta$ 1-интегрин**, члан фамилије интегрина, састоји се од великог екстрацелуларног домена, трансмембранског дела и кратког цитоплазматског домена. Иницијално је описан као маркер епидермалних матичних ћелија, а додатним анализама као регулатор хематопоезе матичних ћелија. У нормалном колону *CD29* локализован је у доњим партијама крипти. Управо ова позиција је довела до формирања хипотезе према којој је *CD29* представљен као маркер мукозалних прогениторних ћелија (183). Будући да се понаша као рецептор протеина екстрацелуларног матрикса, *CD29* активира молекуларне сигнале и путеве који регулишу ћелијску миграцију, пролиферацију, диференцијацију и смрт. *CD29* такође регулише ћелијско преживљавање путем активације *Akt* пута (168). Бројни аутори, међу њима и Зоу (*Zou*) и сарадници су показали да ћелијска фракција *CD133+CD29+* додатно регулише самообнављање, пролиферацију и диференцијацију. Из овог разлога *CD29* је предложен као нови маркер КМЋ (168, 174, 183, 187–189).

**CD24** представља мали, гликолизирани, муцину сличан адхезивни молекул који се састоји од 27 аминокиселина са неколико протеинских O- или N-повезаних места гликозилације. Тежине је између 38 и 70 *kDa* (173-175). Чои (*Choi*) и сарадници су на узорку од 523 колоректална аденокарцинома различитих стадијума показали сигнификантну повезаност између експресије *CD24* и степена диференцијације (190). Вермелен (*Vermeulen*) и сар, Јенг (*Yeung*) са својим сарадницима (као и многи други истраживачи кроз своја истраживања показали су да коекспресија *CD24* заједно са другим маркерима може помоћи у идентификацију КМЋ (156, 174, 175, 183, 186–189).

**CD44** је члан породице трансмембранозних протеина која се састоји од минимум 20 варијабли које настају цепањем и посттранслацијом истог гена. *CD44* је адхезивни молекул који омогућава међусобно везивање ћелија као и интеракцију између ћелије и екстрацелуларне мембране путем везивања за хијалуронску киселину. Представља нискодну тачку у *Wnt/β*-катенин путу (121). *CD44* је такође укључен у активацију лимфоцита, мијелопоезу, лимфопоезу и ангиогенезу. Хумани *CD44* састоји се од 20 егзона. *CD44s* је богато изражен како код нормалних тако и код канцерских ћелија док је *CD44v* претежно присутан код канцерских ћелија (157, 176). Изгледа да је *CD44* неопходан у одржавању особина КМЋ путем активирања тирозин киназе рецептора *-c-Met* (176). Делерба (*Dalerba*) и сар. наводе да КМЋ које имају *CD44+* експресију показују већу пролиферацију, снажнију формацију колонија, мање спонтане апоптозе и већу резистенцију на хемиотерапију него *CD44-* ћелије (172, 176, 187, 191–199).

**EpCAM** је маркер чију експресију показују једино епителијалне ћелије и карциноми порекла ових ћелија (187). Први пут је откривен код карцинома колона да би касније било доказано његово присуство и код других карцинома. У његове основне функције спадају ћелијска адхезија која је независна од калцијума, преношење ћелијских сигнала, пролиферација, диференцијација, миграција и метастазирање, туморигенеза и стимулација гена *Wnt* као што су *c-Mus* и циклини А и Е. *EpCAM* има базални или базолатерални образац експресије у нормалним епителијалним ћелијама, искључиво базолатералну експресију у добро диферентованим карциномима док се код лоше диферентованих карцинома његова експресија може уочити у мембрани и цитоплазми. Представља потенцијални прогностички маркер у неким епителијалним туморима, где се његова висока експресија повезује са лошијим преживљавањем и унапредовалим стадијумом болести. Захваљујући његовој издашној експресији код аденокарцинома, метастаза и КМЋ овај маркер се може користити за идентификацију циркулишућих метастатских ћелија (168, 187, 189).

**OCT4** је транскрипциони фактор који утиче на ембриогенезу, одржавање ћелија у матичном облику, раст тумора и метастазирање. Његова експресија је уочена како код здравих, тако и код канцерских ћелија колона. Амине (*Amini*) и сар. (анализирали су четири узорка тумора дебелог црева и уочили експресију *OCT4* у сваком од њих, примарно у цитоплазми. Експресија овог маркера повезује се са бржом рекурентом тумора, што доводи до лошијег исхода, вероватно путем превенције апоптозе. Експресија *OCT4* уочена је у ћелијама које пролазе епително-мезенхималну транзицију (EMT) која представља кључни корак у прогресији карцинома и метастазирању (160, 189).

**SOX2**, такође транскрипциони фактор, локализован је у близини епителних ћелија крипти колона. Одговоран је за превенцију диференцијације неуралних прогениторних ћелија. Амине и сарадници су документовали експресију *SOX2* у туморима колона трећег стадијума. У студији која је поредила нормалан колон, диспластичне полипе и

аденокарциноме код 20 пацијената, Талеби (*Talebi*) и сарадници су доказали значајну корелацију између експресије *SOX2* и КПК. Ниво експресије *SOX2* је такође у позитивној корелацији са метастазирањем и инфилтрацијом ЛЧ. *SOX2* контролише експресију ОСТ4 те се стога плурипотентност ћелија не може посматрати ван комбинације ова два фактора транскрипције (160).

**NANOG** је такође један од фактора коју утичу на плурипотентност путем транскрипционе контроле. Иако је утврђено да је од кључног значаја за успостављање плурипотентности ембрионалних ћелија, постоје основане тврдње да није неопходан за одржавање матичних ћелија у недиферентованом стању (160). У својој студији, Амине и сарадници су доказали постојање **NANOG** у свих 5 узорака тумора колоне, док су Ибрахим и сарадници показали изразито нуклеарно бојење у субпопулацији епителних ћелија примарног КПК (162, 178). Висока нуклеарна експресија **NANOG** се повезује са лошијом прогнозом оболелих од КПК (177–179).

**c-Мус** протоонкоген има кључну улогу као транскрипциони фактор пролиферације, апоптозе, ћелијског раста и диференцијације нормалних ћелија као и улогу у обнављању матичних ћелија (177). Представља нисходну тачку регулације *Wnt* пута а његова прекомерна стимулације је уочена код КПК (189).

**KLF4** је транскрипциони фактор чија је висока експресија уочена у недиферентованим ћелијама. Има улогу у регулацији како ћелијског циклуса тако и плурипотенцији а неопходан је у одржавању капацитета самообнављања. Прекомерна експресија *KLF4* идентификована је у КМЋ колоректалног карцинома што омогућава формирање сферичне туморске формације. *KLF4* потпомаже ћелијску миграцију и инвазију *EMT* што даје основану сумњу да би *KLF4* могао имати и улогу у метастазирању. Супримирање експресије *KLF4* инхибише ћелијску миграцију и инвазивност, те самим тим смањује резистенцију на хемиотерапију и иницијацију тумора (179).

**SALL4** је транскрипциони фактор који контролише самообнављање и плурипотентност у нормалним ембрионалним ћелијама и одраслим хематопоетским матичним ћелијама. Повезан је са туморима високог градуса и метастазирањем у ЛЧ код многих тумора. Студија Хаоа (*Hao*) и сарадника која је укључивала 186 испитаника са бенигним и малигним туморима колоне указала је да *SALL4* дели своју локализацију са  $\beta$ -катенином у цитоплазми и нуклеусу епитела крипти, према томе има улогу у *Wnt* путу. Постоји могућност да управо ова интеракција има улогу у лимфогеном метастазирању и агресивности тумора. *Cal* и сарадници су мерили број копија митохондријалне РНК у периферној крви 72 болесника са КПК и 60 здравих испитаника. Приликом поређења *SALL4* са нивоом *CEA* утврђено је да је *SALL4* сензитивнији у детектовању КПК. Ниво *SALL4* митохондријалне РНК је био много виши код оболелих од КПК него у контролној

групи али нижи код болесника са инвазивним, узнапредовалим КРК него код оних са локално ограниченим КРК. У тренутку када КРК захвати адвентицију, вероватноћа за метастазирање и лошију прогнозу је већа. С обзиром да је ниво *SALL4* митохондријалне РНК виши код болесника чији је тумор ограничен на ламину мускуларис постоји претпоставка да би се овај маркер могао употребити за окривањ КРК у ресектабилном стадијуму (168, 189).

**ABCG2** је члан аденозин-три-фосфатаза везујуће каскаде транспортних протеина (ABC) који имају улогу у транслокацији супстрата из/у ћелију. ABC транспортери имају улогу у мултиплој резистенцији на хемиотерапију. *ABCG2* је повезан са пролиферацијом и одржавањем не само нормалних ћелија већ и КМЋ као и са формирањем тумора. Многе КМЋ имају експресију *ABCG2* што се повезује са већим стадијумом КРК. Више од половине КРК показује експресију *ABCG2* на ћелијској мембрани што је повезано са метастазирањем у локорегионалне ЛЧ и удаљеним метастазама (179).

**STAT3** је транскрипциони фактор који приликом транслокације из нуклеуса подлеже фосфорилацији (pSTAT3). Приликом његове непрекидне активације долази до пролиферације, ангиогенезе и инвазије туморских ћелија. У КРК *STAT3* се налази у цитоплазми крипти епителијалних ћелија док се експресија *pSTAT3* уочава како у цитоплазми тако и у нуклеусу (180).

**ALDH** је општеприхваћен маркер нормалних и канцерских матичних ћелија. Познато је да *ALDH* има улогу у протекцији хематопоезних матичних ћелија те се претпоставља да би сличну улогу могао имати и у КМЋ, које у том тренутку показују повећане нивое *ALDH*. Хуанг (*Huang*) и сарадници су поредећи нормалан колон са КРК показали да ћелије нормалног колона показују ниску експресију *ALDH*, док његову високу експресију показују ћелије на дну крипти које имају особине самообнављања. Управо из овог разлога се *ALDH* сматра једним од маркера за идентификацију КМЋ. Његова висока експресија се повезује и са лошијом прогнозом, резистенцијом на хемиотерапију и већим потенцијалом за раст тумора. Клиничка истраживања спроведена на болесницима у II и III стадијуму КРК је показала да адјувантна хемиотерапија значајно утиче на регулацију *CD44*, *LGR5* и *CD166* што указује да би се ови маркери могли окарактерисати као маркери хеморезистенције КМЋ у случају КРК (180). Болесници који показују ниске вредности *ALDH* након неоадјувантне хеморадијације код карцинома ректума не подлежу опасности од локалног рецидива, док болесници са високим вредностима *ALDH* имају стопу рецидива од 40% у оквиру 36 месеци од ресекције. Ово указује на могућу корелацију између *ALDH* и заступљености КМЋ (153, 163, 180, 187).

**LGR5** има експресију само на циркулишућим колумнарним ћелијама у бази крипте. Ћелије које су позитивне на *LGR5* (*LGR5<sup>+</sup>*) доказано су матичне ћелије у базама

крипте на основу њихове способности за диференцијацију у све врсте ћелија епитела колона унутар 60 дана у ин витро условима (150). *LGR5*<sup>+</sup> ћелије су такође идентификоване међу Панетовим ћелијама у бази крипте. Панетове ћелије продукују компоненте мукозалне одбране попут лизозома и криптидина као и факторе раста и друге регулаторне молекуле који су есенцијални за одржавање матичних ћелија (епидермални фактор раста, трансформишући фактор раста алфа, *Wnt3* и лиганд нише *D114*). Из ових разлога Панетове ћелије су хипотетички представљене као есенцијалне у одржавању ИМЋ ниша те је логично да се епителне матичне ћелије налазе међу њима. Додатни докази да су КМЋ *LGR5*<sup>+</sup> показано је директним деловањем на *LGR5* чиме долази до регресије тумора (150, 168, 181, 182, 184).

**CD166** је адхезивни молекул леукоцита који учествује у интрацелуларној интеракцији и ћелијској адхезији са екстрацелуларним матриксом. У КПК експресија CD166 је повезана са патогенезом болести будући да се приказује рано током карциногенезе. Међутим у мета анализама експресија CD166 се повезује са мањом величином тумора. Потребно је размотрити његову примену у откривању КМЋ заједно са осталим маркерима попут *CD44*, *CD24*, *CD29* и *CD26* (168, 187, 200–202).

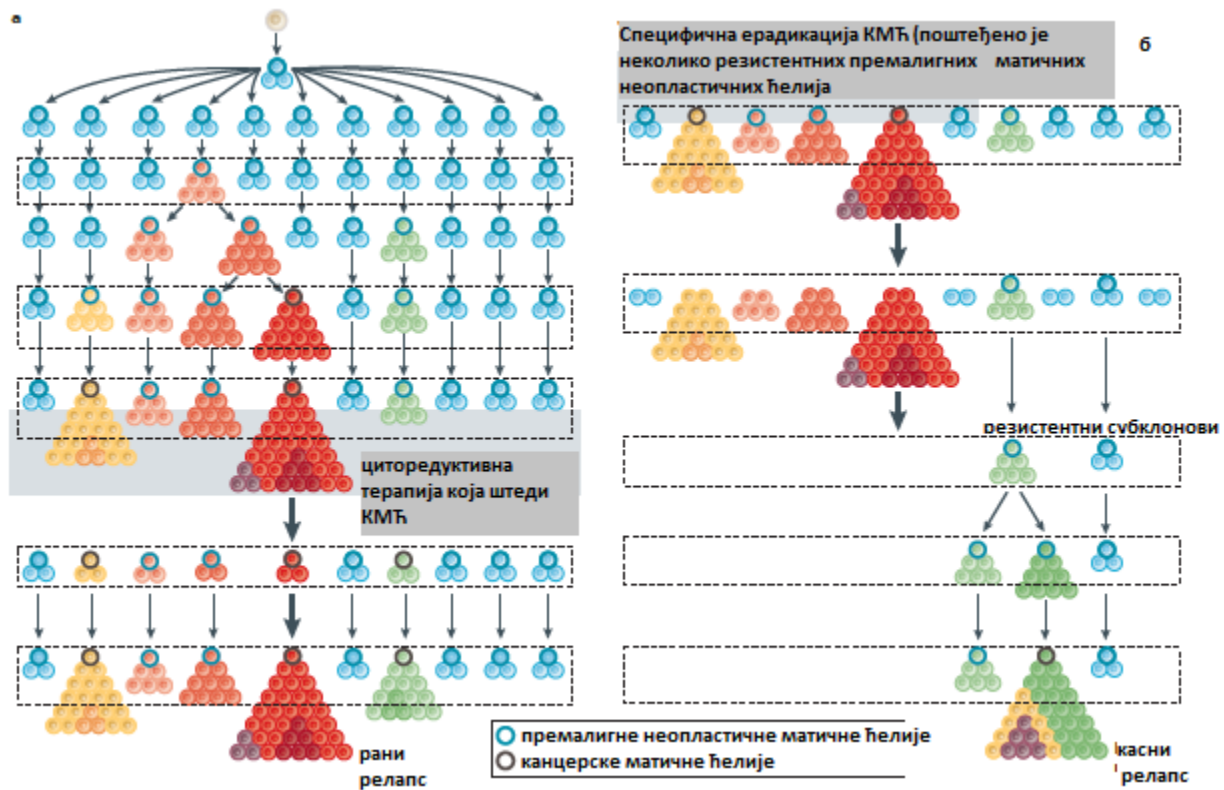
Табела 4. Најчешће употребљавани потенцијални маркери КМЋ (121,168,160,189)

Маркер	Функција
<b>CD133</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• трансмембрански гликопротеин</li> <li>• повезан за примитивним ћелијама</li> <li>• повезује се са лошијом прогнозом, краћим преживљавањем, ранијим рецидивом болести, метастазирањем и резистенцијом на терапију</li> </ul>
<b>CD24</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• адхезивни молекул</li> <li>• повећава способност клонирања, утиче на потенцијал за стварање више ћелијских лоза и њихов даљи раст</li> <li>• повезује се са ивазивношћу, диференцијацијом и преживљавањем</li> </ul>
<b>CD29</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• адхезивни молекул</li> <li>• учествује у формирању туморских колонија, повезује се са стадијумом тумора</li> <li>• КРК показују високу експресију овог молекула</li> </ul>
<b>CD44</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• адхезивни молекул</li> <li>• учествује у иницијацији тумора и формирању туморских колонија</li> <li>• повезује се са стадијумом тумора, инфилтрацијом ЛЧ, прогнозом и преживљавањем</li> </ul>
<b>CD166</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• адхезивни молекул</li> <li>• учествује у иницијацији тумора, формирању туморских колонија и њиховој пропагацији</li> <li>• повезује се са лошијом прогнозом и краћим преживљавањем</li> </ul>
<b>ЕрСАМ</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• адхезивни молекул</li> <li>• показује експресију у <i>CD133+</i> или <i>CD44+</i> ћелијама</li> <li>• повезује се са лошијом прогнозом</li> <li>• губитак експресије се повезује са агресивнијим туморима</li> </ul>
<b>ALDH1,2</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• детоксикујући ензим</li> <li>• учествује у иницијацији тумора и даљем расту, утиче на рану диференцијацију матичних ћелија</li> <li>• показује богату експресију у КРК</li> <li>• повезује се са хеморезистенцијом</li> </ul>
<b>Lgr5</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• таргет ген <i>Wnt</i> пута</li> <li>• фаворизује туморигенезу и метастазирање</li> <li>• повезује се са лошијом прогнозом</li> </ul>



### 1.3.5. Значај канцерских матичних ћелија у лечењу колоректалног карцинома

Претпоставка је да су КМЋ отпорне на хемио и радиотерапију и тиме директно одговорне за релапс и метастатирање. Стандардна терапија уништава само зрелу ћелијску популацију тумора али не и КМЋ које временом доводе до релапса. Према томе проналазак терапије која би деловала и на туморску масу и на КМЋ је есенцијална за потпуну ерадикацију тумора. Потенцијалне терапијске опције које су још у експерименталној фази циљано би деловале на КМЋ деловањем на специфичне маркере КМЋ (као што су моноклонална антитела) или путем пресецања специфичних сигналних путева КМЋ (186, 173–175).



Слика 17. Преживљавање КМЋ приликом примене стандарде терапије. Када већина КМЋ преживи терапију долази до раног релапса болести (а), међутим, чак и након успешне ерадикације доминантног супклона може доћи до релапса болести преко премалигне неопластичне матичне ћелије. У овом случају долази до касног релапса за непредвидивим периодом латенције (б) (144).

Конвенционални третман КРК је стриктно детерминисан стадијумом болести и обично почиње аблативном хирургијом после које следи хемотерапија (54). Према важећим водичима за терапију КРК, стандардни третман је базиран на *FOLFOX*-у (оксалиплатин, 5-флуороурацил и леуковорин), *FOLFIRI*-у (5-флуороурацил, леуковорин и иринотекан),

*СареОХ*-у (капецитабин и оксалиплатин) или само капецитабину (44, 53, 54). У метастатској болести се уводе и други терапијски модалитети који подразумевају употребу специфичних моноклоналних антитела као што су бевацизумаб (уперен против *VEGF*) и цетуксимаб или панитумумаб (уперени против *EGFR*) (54). Постоји претпоставка да би ерадикација КМЋ довела до дугорочне ремисије након иницијалног третмана КРК. Међутим, КМЋ су способне да преживе конвенционалну терапију путем више заштитних механизма као што су: фенотип матичних ћелија, прекомерна експресија транспортера лекова, могућност мировања ћелијског циклуса, механизам репарације ДНК и резистенција на апоптозу (189). Упркос свим напорима у развоју терапије, метастатски КРК у суштини и даље остаје инкурабилан са веома ниским десетогодишњим преживљавањем болесника (58,1%) (193). Ови обесхрабрујући подаци су делимично присутни захваљујући мултитерапијској резистенцији (191–194).

Подсетимо се да током ембриогенезе ћелије пролазе кроз епителијално-мезенхималну транзицију (*EMT*), реверзибилан процес у којем епителијалне ћелије губе своју ћелијску поларност и добијају миграторне и инвазивне способности. Обрнути процес, у којем ћелије враћају свој епителни статус назива се мезенхимално-епителна транзиција (*MET*). Подаци из радова указују на битну повезаност између *EMT* и карцинома. Канцерске ћелије пролазе *EMT* како би добиле способност инвазије околних ткива и удаљених места а потом *MET* како би прерасле у метастазе (194). Идентификована је јасна повезаност између *CD44*, *EMT* и инвазије код КРК. Наиме *CD44* је снажан индуктор *EMT*, врши нисходну регулацију експресије епителних маркера и усходну регулацију мезенхималних карактеристика како би омогућила инвазију и метастазирање КРК. *EMT* се такође, у бројним радовима, повезује са хемиорезистенцијом на стандардну терапију за КРК (194, 195). До сада су предложене три есенцијалне стратегије за циљану (таргет) терапију *EMT*: инхибиција индукције *EMT*, инхибиција туморских ћелија са мезенхималним фенотипом и инхибиција *MET*. Све три стратегије су још увек у фази истраживања (192).

Везивање *CD44* са хијалуронаном (НА) може довести до асоцијације са епидермалним фактором раста (*EGFR*). Ово повезивање активира *MAP* киназу и друге сигналне путеве и на тај начин индукује ћелијско преживљавање приликом примене стандардне антитуморске терапије као и таргет анти-*EGFR* терапије (142, 193).

Тодаро и сарадници су у свом раду показали да *CD133*<sup>+</sup> КМЋ користе интерлеукин 4 (*IL-4*) као аутокрини фактор раста како би избегле апоптозу узроковану применом 5-флуороурацила и оксалиплатине. На бази овог сазнања, уочено је да симултана примена антитела на *IL-4* у терапији КРК значајно повећава антитуморску цитотоксичну активност поменутих лекова (168, 143, 144). Циљана терапија уперена против *EpCAM*-а, *CD44*, *CD 29* као и *Wnt*, хецог-а и ноч-а је још увек у фази претклиничких истраживања са охрабрујућим првим резултатима (168).

## 2. ЦИЉЕВИ РАДА И РАДНА ХИПОТЕЗА

### 2.1. Циљеви рада

Циљ овог истраживања јесте да се утврди клинички значај присуства КМТ у односу на повратак болести као и временски период до повратка болести, односно да се утврди клинички значај канцерских матичних ћелија као фактора предикције повратка болести. Клинички значај ће бити процењен кроз статистичку значајност у односу на присуство матичних ћелија у примарном тумору карцинома колона и то тако што ћемо:

1. Утврдити процентуалну заступљеност канцерских матичних ћелија код болесника у првом и другом стадијуму карцинома колона у односу на појаву релапса болести;
2. Утврдити процентуалну заступљеност канцерских матичних ћелија код болесника у трећем стадијуму карцинома колона у односу на појаву релапса болести;
3. Утврдити временски период до појаве релапса у односу на процентуалну заступљеност канцерских матичних ћелија у првом и другом стадијуму карцинома колона;
4. Утврдити временски период до појаве релапса у односу на процентуалну заступљеност канцерских матичних ћелија у трећем стадијуму карцинома колона.

### 2.2. Радна хипотеза

1. Болесници у првом и другом стадијуму карцинома колона при релапсу болести имаће већу процентуалну заступљеност канцерских матичних ћелија.
2. Болесници у трећем стадијуму карцинома колона при релапсу болести имаће већу процентуалну заступљеност канцерских матичних ћелија.
3. Болесници у првом и другом стадијуму карцинома колона са већом процентуалном заступљеношћу канцерских матичних ћелија имаће краћи временски период до појаве релапса болести.
4. Болесници у трећем стадијуму карцинома колона са већом процентуалном заступљеношћу канцерских матичних ћелија имаће краћи временски период до појаве релапса болести.

### 3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДОЛОГИЈА

Истраживање је спроведено као проспективно-ретроспективна рандомизована аналитичка студија на Клиници за оперативну онкологију и Служби за патолошко-анатомску и лабораторијску дијагностику Института за онкологију Војводине у Сремској Каменици у периоду од 2016. до 2019. године.

#### 3.1. Карактеристике болесника укључених у студију

У студију су укључени болесници оперисани у Институту за онкологију Војводине у периоду од 2007. до 2012. године са патохистолошки потврђеном дијагнозом примарног, неметастатског (стадијуми I, II и III) КРК.

*Критеријуми за укључивање у студију*

1. Болесници оба пола, старији од 18 година
2. Хистолошки доказан аденокарцином колоне
3. Потписан пристанак за укључивање у студију
4. Успешно изведена радикална операција

*Критеријуми за искључивање из студије:*

1. Синхрони малигни тумор било које локализације
2. Преоперативно или интраоперативно дијагностикована метастатска болест без обзира да ли је изведена радикална операција карцинома колоне
3. Ранији малигнитет, изузев случајева где је пацијент пет и више година без знакова рецидива болести
4. Болесници код којих није урађена радикална операција из било којег разлога

#### 3.2. Добијање сагласности

Након пријема у болницу, пацијент са верификованим карциномом колоне, кроз разговор је био упознат са својом болешћу, врстом операције, очекиваним резултатима и могућим компликацијама. Пре започињања истраживања добијена је сагласност етичке комисије Медицинског факултета Универзитета у Новом Саду као и етичке комисије Института за онкологију Војводине. С обзиром да је студија дизајнирана као ретроспективна анализа проспективно сакупљених података од болесника је накнадно добијена сагласност за додатну анализу података. Након упознавања са нашим истраживањем и начином његовог извођења, болесници су пристанак да се њихови

медицински подаци користе у истраживању потврдили својим потписом.

### 3.3. Дизајн студије

Болесници су одабирани методом случајног избора, из базе информационог система Института за онкологију Војводине (*BIRPIS*), у односу на појаву рецидива болести и присуство метастаза у регионалним лимфним чворовима у односу 1 : 1. Рандомизација је била изведена стратификованом шемом како би се спречила неједнакост у надзору података.

Величина узорка је одређена при типу I грешке са вероватноћом од  $\alpha = 0,05$ , при снази студије од 80%. Да би се детектовала разлика у дистрибуцији налаза од 25%, потребно је укупно 110 болесника, односно 55 болесника по групи. Прву групу представљају нодус-негативни болесници, односно болесници који према *AJCC* класификацији спадају у I и II стадијум болести, док другу групу болесника чине нодус-позитивни болесници који према поменутој класификацији имају III стадијум болести.

### 3.4. Патохистолошка обрада препарата и идентификација канцерских матичних ћелија

Узорци туморског ткива добијени хируршком ресекцијом били су фиксирани у 10% неутралном пуферисаном формалину и укалупљени у парафин, а затим сечени на пресеке дебљине 4 микрона. Парафински пресеци су бојени стандарном хематоксилин-еозин методом и анализирао их је патолог светлосним микроскопом. Репрезентативни узорци туморског ткива, добијени на описани начин, накнадно су третирани у имуностеинеру, марке *Вентана*, применом моноклонских антитела на *CD44* (*anti-human CD44*, разблажење 1 : 1000, *rabbit anti-human*, *Sigma*, *St. Louis, USA*), *CD166* (*anti-human CD166*, разблажење 1 : 40, *rabbit anti-human*, *Abcam*, *Cambridge, UK*) и  $\alpha$ -*Lgr5* (*anti-human CD44*, разблажење 1:500, *rabbit anti-human*, *Sigma*, *St. Louis, USA*). Време инкубације за свако антитело зависило је од фабричких препорука или установљених тзв. *in-house* инкубационих времена. Интензитет и проценат обојених туморских ћелија анализирани су семиквантитативно на светлосном микроскопу марке *Олимпус*. Семиквантитативни подаци о интензитету обојености и проценту заступљености КМЋ у сваком препарату унети су у посебну табелу.

### 3.5. Формирање базе података

За сваког болесника су унети следећи подаци:

1. Пол – мушки, женски;
2. Старост – број година од рођења до тренутка операције карцинома колона;
3. Локализација тумора – према шифрарнику Десете међународне класификације болести (МКБ10);
4. Врсту операције – лева хемиколектомија, десна хемиколектомија, ресекција трансверзума, ресекција сигме, предња ниска ресекција ректосигме (операција по Диксону), суптотална колектомија и тотална колектомија;
5. Дубина инвазије тумора – унесене су категорије *T1*, *T2*, *T3* и *T4* према одредницама важеће *TNM* класификације при чему *T1* означава туморе ограничене на субмукозу, *T2* туморе који захватају мускуларис проприју, *T3* туморе који захватају супсерозу или перитонизовано периколично масно ткиво док су ознаком *T4* обележени тумори који захватају висцерални перитонеум и околне органе;
6. Укупан број одстрањених лимфних чворова;
7. Присуство метастатски позитивних лимфних чворова – обележено са „+“ у случају присуства метастазе аденокарцинома колона у бар једном лимфном чвору или „-“ у случају одсуства метастаза аденокарцинома колона у свим прегледаним лимфним жлездама;
8. Број прегледаних лимфних чворова код којих је утврђено присуство метастазе аденокарцинома колона – унесене су *N1* и *N2* категорије према важећој *TNM* класификацији и то *N1* уколико су метастазе присутне у 1–3 лимфна чвора и *N2* уколико су метастазе присутне у више од три лимфна чвора;
9. Присуство лимфоваскуларне инвазије – обележено са „ДА“ или „НЕ“;
10. Присуство перинеуралне инвазије – обележено са „ДА“ или „НЕ“;
11. Присуство некрозе – обележено са „ДА“ или „НЕ“;
12. Присуство муцина – обележено са „ДА“ или „НЕ“;
13. Присуство удаљених метастаза – обележено са „М“ према одредницама *TNM* класификације (присуство удаљених метастаза у тренутку операције представља ексклузивни критеријум те су сви болесници који су укључени у студију означени са *M 0*);
14. Градус тумора означава степен диферентованости туморских ћелија – обележен бројевима од 1 до 3, где број 1 представља добро диферентован тумор, број 2 средње диферентован тумор и број 3 лоше диферентован тумор;
15. Потребу за ургентним оперативним захватом услед постојања акутног хируршког обољења (опструктивни илеус, перфорација шупљег органа или профузно крварење узорковано тумором) – означено са „ДА“ или „НЕ“;
16. Администрација адјувантне хемиотерапије – означено са „ДА“ или „НЕ“;

17. Датум започињања давања хемиотерапије;
18. Појава релапса – релапс је дефинисан као поновна појава болести након периода ремисије, означен је са „ДА“ или „НЕ“;
19. Дијагностички метод којим је откривен релапс – радиолошке методе (рендген, ултразвук, компјутеризована томографија, позитрон-емисиона компјутеризована томографија, магнетна резонанца), ендоскопске методе (колоноскопија, езофагогастродуоденоскопија, бронхоскопија) или биопсија;
20. Датум откривања релапса болести;
21. Период без болести – број месеци од операције до датума откривања релапса болести;
22. Место појаве релапса – написана тачна локализација органа на којем прво уочена појава метастаза;
23. Датум последњег контакта са болесником;
24. Статус болесника у тренутку последњег контакта – *NED (no evidence of disease)* – без знакова болести, *AWD (alive with disease)* – жив са рецидивом, *DOD (died of disease)* – умро од болести и *DOC (died of other causes)* – умро од других болести;
25. Присуство КМЋ у примарном тумору (изражено у виду процента) – ознаком „0“ су обележени препарати у којима нема обојених ћелија, ознаком „1“ препарати у којима је до 10% ћелија обојено, ознаком „2“ где је обојено више од 10% али не више од 50% ћелија, ознаком „3“ где је преко 50% ћелија обојено;
26. Локализација КМЋ у ћелијама примарног тумора на основу места имунохистохемијског бојења – ознаком „*m*“ обележено је мембранско бојење, ознаком „*cp*“ цитоплазматско бојење и ознаком „*mcp*“ синхроно мембранско и цитоплазматско бојење;
27. Интезитет КМЋ у примарном тумору према маркерима за њихову идентификацију (*Lgr5*, *CD44* и *CD166*) – ознаком „0“ означени су препарати у којима нема бојења ћелија, ознаком „1“ препарати у којима је слабо или једва видљиво ћелијско бојење, ознаком „2“ препарати са бојењем ћелија умереног интензитета, ознаком „3“ препарати са ћелијским бојењем великог интензитета.

### 3.6. Статистичке методе

Прикупљени подаци унесени су у проспективно формирану базу података у софтверском пакету *MS Access 2007*. У раду су се користиле методе дескриптивне и аналитичке статистике. Од метода дескриптивне статистике користиле су се мере централне тенденције и мере варијабилитета и то: аритметичка средина са стандардном девијацијом, медијана, минималне и максималне вредности, релативни бројеви за категоријске варијабле. Од метода аналитичке статистике кориштене су методе за процену значајности разлике и то: Студентов (*Student*) *t*-тест за везане узорке, нумеричка

једнофакторска анализа варијансе (ANOVA). Од непараметријских тестова за процену разлике међу групама кориштен је хи квадрат, Фишеров (*Fisher*) и Крускал-Волисов (*Kruskal-Wallis*) тест. Анализа фактора ризика за настанак релапса и смрти као последица релапса након операције колоректалног карцинома рађена је мултиваријантном Кокс пропорционалном регресионом анализом. За статистичку обраду података кориштен је програмски пакет *SPSS* верзија 21.0 (*Statistical Package for Social Sciences SPSS 21.0 Inc, USA*). Статистички значајна разлика постоји уколико је  $p$  вредност мања од 0,05. Обрада и презентација података (табеле и графикони) су урађени у софтверском пакету Мајкрософт офис (*MS Word, Excel, Power Point 2010*).

### 3.7. Приватност болесника

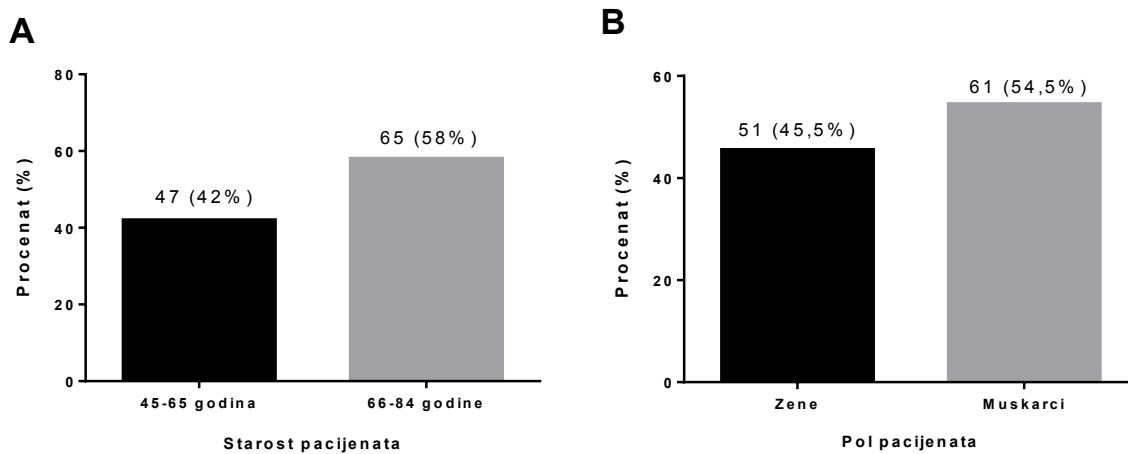
Идентитет болесника адекватно је заштићен. Болесници су били означени редним бројем додељеним од BIRPS-а. Болесников број није укључивао личне ознаке, као што су име, број здравствене књижице, јединствени матични број и сл.



## 4. РЕЗУЛТАТИ

### 4.1. Анализа старосне и полне структуре

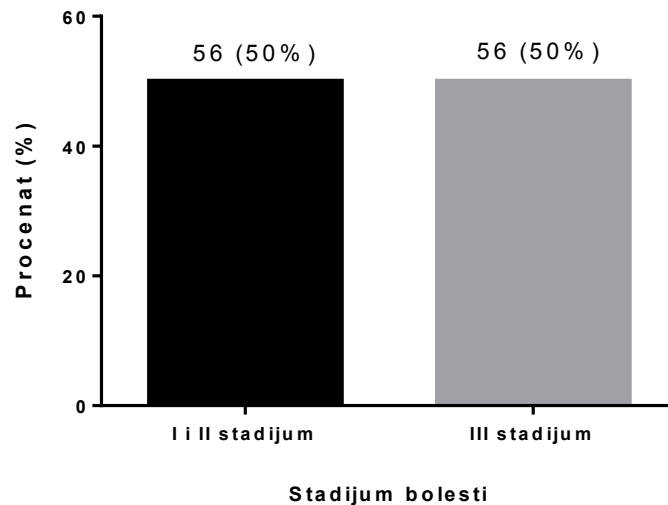
Студијом је обухваћено 112 болесника након операције колоректалног карцинома (КРК). Болесници су према старости подељени у две групе, групу 45–65 година чинило је 47 (42%) болесника, док је групу од 66 до 84 године чинило 65 (58%) болесника. Просечна старост болесника била је  $67,05 \pm 9,51$  годину. Од укупног броја болесника, 61 (54,5%) било је мушког, док је преосталих 51 (45,5%) било женског пола (Графикон 1 А и Б).



**Графикон 1.** Дистрибуција болесника са колоректалним карциномом по (А) старости и (Б) полу

#### **4.2. Дистрибуција болесника према *TNM* стадијуму**

Болесници су према *TNM* стадијуму болести подељени у две једнаке групе, прву групу (I и II стадијум), чији су лимфни чворови били негативни на присуство метастаза, чинило је њих 56 (50%), док је преосталих 56 (50%) болесника било у III стадијуму болести (нодус позитивни лимфни чворови) (Графикон 2).



**Графикон 2.** Дистрибуција болесника са колоректалним карциномом у односу на *TNM* стадијум болести

Табела 1 показује дистрибуцију болесника са колоректалним карциномом према полу и старости унутар група подељених према стадијуму болести. У групи болесника са I и II стадијумом било је 17 (30,4%) болесника који су припадали средовечној групи болесника, док је њих 39 (69,6%) припадало старијој групи; такође унутар ове групе болесника било је 22 (39,3%) жене и 34 (60,7%) мушкарца. Унутар групе болесника са III стадијумом болести било је 30 (53,6%) средовечних болесника и 26 (60,7%) старијих, 29 (51,8%) жена и 27 (48,2%) мушкараца (Табела 1).

**Табела 1.** Дистрибуција болесника према полу и старости у односу на стадијум болести

<b>TNM стадијум болести</b>	<b>Социодемографске карактеристике</b>	<b>Број (%)</b>
<b>I и II стадијум болести</b>	<b>Старост</b> 45–65 година 66–84 године	17 (30,4) 39 (69,6)
	<b>Пол</b> Жене Мушкарци	22 (39,3) 34 (60,7)
<b>III стадијум болести</b>	<b>Старост</b> 45–65 година 66–84 године	30 (53,6) 26 (46,4)
	<b>Пол</b> Жене Мушкарци	29 (51,8) 27 (48,2)

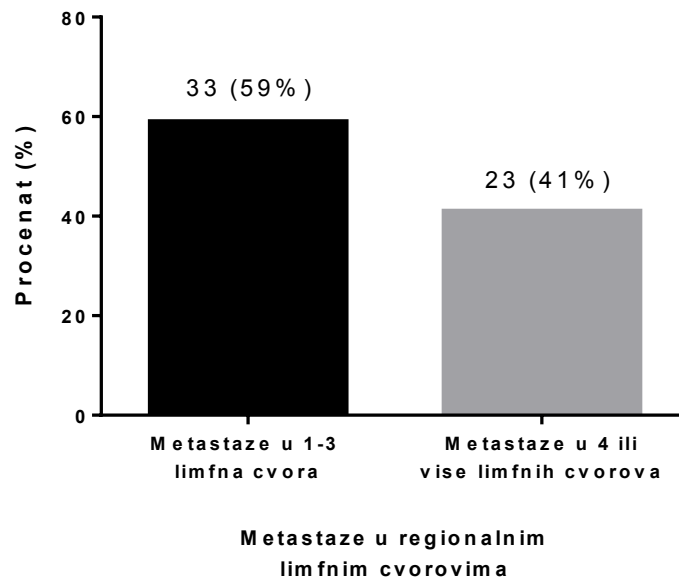
Табела 2 показује да између група болесника подељених према старости постоји статистички значајна разлика ( $\chi^2 = 6,196$ ;  $p = 0,013$ ), при чему је млађа група болесника (45–65 година) значајно чешће имала III стадијум болести, њих 30 (63,8%) у односу на старију групу болесника (66–84 године), њих 26 (40%). Статистички значајна разлика између група болесника подељених према полу у односу на стадијум болести није уочена (Табела 2).

**Табела 2.** TNM стадијум болести у односу на старост и пол болесника

Социодемографске карактеристике	TNM стадијум болести Број (%)		$\chi^2$	$p$
	I и II стадијум	III стадијум		
<b>Старост</b> 45–65 година 66–84 године	17 (36,2) 39 (60,0)	30 (63,8) 26 (40,0)	6,196	0,013
<b>Пол</b> Жене Мушкарци	22 (43,1) 34 (55,7)	29 (56,9) 27 (44,3)	1,176	0,184

#### **4.3. Дистрибуција болесника у односу на број метастатски измењених лимфних чворова**

Од укупног броја болесника, њих 56 који били су у III стадијуму болести, сви су имали метастазе у лимфним чворовима. Према АЈСС критеријумима ови болесници су подељени на две групе у односу на број метастаза у лимфним чворовима. Прву групу (N1) чинило је 33 (59%) болесника који су имали 1 до 3 метастазе, док је другу групу (N2) чинило 23 (41%) који су имали четири или више метастаза у лимфним чворовима (Графикон 3).



**Графикон 3.** Дистрибуција болесника у III фази колоректалног карцинома у односу на број метастатски позитивних лимфних чворова

У Табели 3 приказане су просечне вредности стандардне девијације, минималне и максималне вредности укупног броја извађених и метастатски позитивних лимфних чворова код свих болесника са колоректалним карциномом, посебно у групи са I и II, као и у групи са III стадијумом болести. Када су у питању сви болесници, просечна вредност укупног броја извађених лимфних чворова била је  $15,53 \pm 9,03$ , минимум 4, а максимум 66 лимфних чворова, болесницима са I и II стадијумом извађено је укупно  $15,08 \pm 7,63$  лимфних чворова, минимум је био 0, а максимум 19, док је код болесника са III стадијумом просек био највећи и износио је  $15,98 \pm 10,29$ , минимум је био 4, а максимум 66 лимфних чворова. Када су у питању метастатски позитивни лимфни чворови, просек извађених лимфних чворова код свих болесника био је  $1,93 \pm 3,04$ , минимум је био 0, а максимум 19. Код пацијената у I и II стадијуму није било метастатски позитивних лимфних чворова, док је код болесника у III стадијуму болести просек метастатски позитивних лимфних чворова износио  $3,87 \pm 3,31$ , минимум је био један лимфни чвор, а максимум њих 19 (Табела 3).

**Табела 3.** Просечне вредности, стандардне девијације, минималне и максималне вредности укупног броја извађених лимфних и метастатски позитивних лимфних чворова код свих болесника и посебно у групи са I и II стадијумом, као и у групи са III стадијумом колоректалног карцинома.

<b>TNM стадијум болести</b>	<b>Број извађених лимфних чворова</b>	<b>AS <math>\pm</math> SD</b>	<b>Минимум</b>	<b>Максимум</b>
<b>Сви болесници</b>	Укупан број извађених лимфних чворова	$15,53 \pm 9,03$	4,00	66,00
	Број метастатски позитивних лимфних чворова	$1,93 \pm 3,04$	0,00	19,00
<b>I и II стадијум болести</b>	Укупан број извађених лимфних чворова	$15,08 \pm 7,63$	4,00	35,00
	Број метастатски позитивних лимфних чворова	0,00	0,00	0,00
<b>III стадијум болести</b>	Укупан број извађених лимфних чворова	$15,98 \pm 10,29$	4,00	66,00
	Број метастатски позитивних лимфних чворова	$3,87 \pm 3,31$	1,00	19,00

**4.4. Дистрибуција болесника у односу на захваћеност тумором**

Дистрибуција болесника у односу на захваћеност тумором код свих болесника и посебно у групи са I и II стадијумом, као и у групи са III стадијумом колоректалног карцинома приказана је у Табели 4. Од укупног броја болесника ниједан није имао T1 стадијум, 3 (2,7%) болесника је био у T-стадијуму, највећи број, њих 103 (92%) било је у T3 стадијуму, док је преосталих 6 (5,3%) било у T4 стадијуму болести. Унутар гурпе са I и II стадијумом болести њих 52 (92,9%) било је у T3 стадијуму, док је њих четири (7,1%) било у T4 стадијуму. Када је у питању група болесника која је била у III стадијуму болести, њих три (5,4%) је било у T3 стадијуму захваћености тумором, највећи део, њих 51 (91,1%) у T3, док је два (3,6%) болесника било у T4 стадијуму захваћености тумором (Табела 4).

**Табела 4.** Дистрибуција болесника у односу на захваћеност тумором код свих болесника и посебно у групи са I и II стадијумом, као и у групи са III стадијумом колоректалног карцинома.

<b>TNM стадијум болести</b>	<b>Захваћеност тумором (T)</b>	<b>Број (%)</b>
<b>Сви болесници</b>	T1	0 (0,0)
	T2	3 (2,7)
	T3	103 (92,0)
	T4	6 (5,4)
<b>I и II стадијум болести</b>	T1	0 (0,0)
	T2	0 (0,0)
	T3	52 (92,9)
	T4	4 (7,1)
<b>III стадијум болести</b>	T1	0 (0)
	T2	3 (5,4)
	T3	51 (91,1)
	T4	2 (3,6)

Од укупног броја болесника њих 13 (11,6%) имало је добро диферентован тумор, 94 (83,9%) средње диферентован, док је 5 (4,5%) болесника имало слабо хистолошки диферентован тумор. Унутар групе са I и II стадијумом болести њих 10 (17,9%) имало је добро диферентован тумор и преосталих 46 (82,1%) имало је средње диферентован тумор. Болесници са III стадијумом болести су у највећем броју имали средње диферентован тумор, њих 48 (85,7%), троје (5,4%) их је имало добро диферентован тумор, док је преосталих пет (8,9%) имало слабо хистолошки диферентован тумор (Табела 5).

**Табела 5.** Дистрибуција болесника у односу на хистолошки градус код свих болесника и посебно у групи са I и II стадијумом, као и у групи са III стадијумом колоректалног карцинома

<b>TNM стадијум болести</b>	<b>Хистолошки градус</b>	<b>Број (%)</b>
<b>Сви болесници</b>	Добро диферентован Средње диферентован Слабо диферентован	13 (11,6) 94 (83,9) 5 (4,5)
<b>I и II стадијум болести</b>	Добро диферентован Средње диферентован Слабо диферентован	10 (17,9) 46 (82,1) 0 (0,0)
<b>III стадијум болести</b>	Добро диферентован Средње диферентован Слабо диферентован	3 (5,4) 48 (85,7) 5 (8,9)



**4.5. Дистрибуција болесника у односу на локализацију тумора**

Табела 6 показује дистрибуцију болесника у односу на локализацију тумора. Од укупног броја болесника тумор је био локализован код њих 68 (60,7%) на левом, а код преосталих 44 (39,3%) на десном колону. Унутар групе болесника који су били у I и II стадијуму болести тумор је био локализован на левом колону код њих 31 (55,4%) а на десном код њих 25 (44,6%). Код болесника из групе са III стадијумом болести тумор је био локализован на левом колону код њих 37 (66,1%) а на десном код њих 19 (33,9%) (Табела 6).

**Табела 6.** Дистрибуција болесника у односу на локализацију тумора код свих болесника и посебно у групи са I и II стадијумом, као и у групи са III стадијумом колоректалног карцинома

<b>TNM стадијум болести</b>	<b>Локализација тумора</b>	<b>Број (%)</b>
<b>Сви болесници</b>	Леви колон	68 (60,7)
	Десни колон	44 (39,3)
<b>I и II стадијум болести</b>	Леви колон	31 (55,4)
	Десни колон	25 (44,6)
<b>III стадијум болести</b>	Леви колон	37 (66,1)
	Десни колон	19 (33,9)

Од укупног броја болесника, њих 41 (36,6%) оперисано је сигмоидектомијом, 36 (32,1%) отвореном десном колектомијом, 13 (11,6%) ресекцијом ректума, 9 (8%) отвореном левом колектомијом, седам (6,3%) трансверзектомијом, пет (4,5%) супроталном колектомијом и 1 (0,9%) тоталном колектомијом. Унутар групе са I и II стадијумом болести 17 (30,4%) болесника је оперисано отвореном десном колектомијом, 14 (25%) сигмоидектомијом, 10 (17,9%) ресекцијом ректума, шест (10,7%) трансверзектомијом, пет (8,9%) отвореном левом колектомијом, три (5,4%) супроталном колектомијом и један (1,8%) тоталном колектомијом. Унутар групе са III стадијумом болести 27 (48,2%) пацијената је оперисано сигмоидектомијом, 19 (33,9%) отвореном десном колектомијом, четири (7,1%) отвореном левом колектомијом, три (5,4%) ресекцијом ректума, два (3,6%) супроталном колектомијом и 1 (1,8%) трансверзектомијом (Табела 7).

**Табела 7.** Дистрибуција болесника у односу на локализацију тумора код свих болесника и посебно у групи са I и II стадијумом, као и у групи са III стадијумом колоректалног карцинома.

<b>TNM стадијум болести</b>	<b>Врста операције</b>	<b>Број (%)</b>
<b>Сви болесници</b>	Отворена десна колектомија	36 (32,1)
	Отворена лева колектомија	9 (8,0)
	Суптотална колектомија	5 (4,5)
	Тотална колектомија	1 (0,9)
	Сигмоидектомија	41 (36,6)
	Трансверзектомија	7 (6,3)
	Ресекција ректума	13 (11,6)
<b>I и II стадијум болести</b>	Отворена десна колектомија	17 (30,4)
	Отворена лева колектомија	5 (8,9)
	Суптотална колектомија	3 (5,4)
	Тотална колектомија	1 (1,8)
	Сигмоидектомија	14 (25,0)
	Трансверзектомија	6 (10,7)
	Ресекција ректума	10 (17,9)
<b>III стадијум болести</b>	Отворена десна колектомија	19 (33,9)
	Отворена лева колектомија	4 (7,1)
	Субтотална колектомија	2 (3,6)
	Тотална колектомија	0 (0,0)
	Сигмоидектомија	27 (48,2)
	Трансверзектомија	1 (1,8)
	Ресекција ректума	3 (5,4)

**4.6. Дистрибуција болесника у односу на присуство лимфоваскуларне инвазије**

Табела 8 показује да је код 35 (31,3%) од укупног броја болесника утврђена лимфоваскуларна инвазија, док код преосталих 77 (68,8%) није. У групи са I и II стадијумом болести лимфоваскуларна инвазија је била присутна код седам (12,5%) болесника, док је у групи са III стадијумом била присутна код 28 (50%) болесника са колоректалним карциномом (Табела 7).

**Табела 8.** Дистрибуција болесника у односу на лимфоваскуларну инвазију код свих пацијената и посебно у групи са I и II стадијумом, као и у групи са III стадијумом колоректалног карцинома

<b>TNM стадијум болести</b>	<b>Лимфоваскуларна инвазија</b>	<b>Број (%)</b>
<b>Сви болесници</b>	Не	77 (68,8)
	Да	35 (31,3)
<b>I и II стадијум болести</b>	Не	49 (87,5)
	Да	7 (12,5)
<b>III стадијум болести</b>	Не	28 (50,0)
	Да	28 (50,0)

**4.7. Дистрибуција болесника у односу на присуство перинеуралне инвазије**

Од укупног броја болесника перинеурална инвазија је била присутна код њих 14 (12,5%), док је изостала код преосталих 98 (87,5%) болесника. Само је 1 (1,8%) пацијент из групе са I и II стадијумом болести имао перинеуралну инвазију, док је из групе са III стадијумом болести њих 13 (23,2%) имало перинеуралну инвазију (Табела 9).

**Табела 9.** Дистрибуција болесника у односу на перинеуралну инвазију код свих пацијената и посебно у групи са I и II стадијумом, као и у групи са III стадијумом колоректалног карцинома

<b>TNM стадијум болести</b>	<b>Перинеурална инвазија</b>	<b>Број (%)</b>
<b>Сви болесници</b>	Не	98 (87,5)
	Да	14 (12,5)
<b>I и II стадијум болести</b>	Не	55 (98,2)
	Да	1 (1,8)
<b>III стадијум болести</b>	Не	43 (76,8)
	Да	13 (23,2)

**4.8. Дистрибуција болесника у односу на присуство муцина у тумору**

Табела 10 показује да је од укупног броја испитаних болесника код њих 12 (10,7%) уочен муцин у тумору. Из групе са I и II стадијумом код њих три (5,4%), док је код девет (16,1%) болесника из групе са III стадијумом уочена перинеурална инвазија (Табела 10).

**Табела 10.** Дистрибуција болесника у односу на присуство муцина у тумору код свих болесника и посебно у групи са I и II стадијумом, као и у групи са III стадијумом колоректалног карцинома

<b>TNM стадијум болести</b>	<b>Присуство муцина у тумору</b>	<b>Број (%)</b>
<b>Сви болесници</b>	Не	100 (89,3)
	Да	12 (10,7)
<b>I и II стадијум болести</b>	Не	53 (94,6)
	Да	3 (5,4)
<b>III стадијум болести</b>	Не	47 (83,9)
	Да	9 (16,1)

**4.9. Дистрибуција болесника у односу на присуство некрозе у тумору**

Некроза у туморском ткиву уочена је код 50 (44,6%) болесника. У групи болесника са I и II стадијумом некроза је уочена код њих 18 (32,1%), док је у групи са III стадијумом некроза уочена код њих 32 (57,1%) (Табела 11).

**Табела 11.** Дистрибуција болесника у односу на присуство некрозе у тумору код свих болесника и посебно у групи са I и II стадијумом, као и у групи са III стадијумом колоректалног карцинома

<b>TNM стадијум болести</b>	<b>Присуство некрозе у тумору</b>	<b>Број (%)</b>
<b>Сви болесници</b>	Не	62 (55,4)
	Да	50 (44,6)
<b>I и II стадијум болести</b>	Не	38 (67,9)
	Да	18 (32,1)
<b>III стадијум болести</b>	Не	24 (42,9)
	Да	32 (57,1)

Између група болесника подељених према стадијуму болести на две групе уочена је висока статистички значајна разлика у односу на учесталост присуства лимфоваскуларне инвазије ( $\chi^2 = 18,372$ ;  $p = 0,001$ ), перинеуралне инвазије ( $\chi^2 = 6,196$ ;  $p = 0,013$ ) и присуства некрозе у тумору ( $\chi^2 = 11,755$ ;  $p = 0,001$ ), док статистички значајна разлика у односу на присуство муцина у тумору није уочена. Болесници са III стадијумом болести су статистички значајно чешће имали лимфоваскуларну инвазију, њих 28 (50%) у односу на пацијенте из групе са I и II стадијумом болести, њих седам (12,5%). Такође, перинеурална инвазија била је значајно чешћа код пацијената у III стадијуму болести, њих 13 (23,2%) у односу на пацијенте који су имали I и II стадијум – један (1,8%). Када је у питању присуство некрозе у тумору, некроза је била значајно чешћа код пацијената који су били у III стадијуму болести, код њих 32 (57,1%) у односу на 18 (32,1%) пацијентата који су били у II и II стадијуму болести (Табела 12).

**Табела 12.** TNM стадијум болести у односу на лимфоваскуларну инвазију, перинеуралну инвазију, присуство муцина и некрозе у тумору

Лимфоваскуларна инвазија, перинеурална инвазију, присуство муцина и некрозе у тумору	TNM стадијум болести Број (%)		$\chi^2$	p
	I и II стадијум	III стадијум		
<b>Лимфоваскуларна инвазија</b> Не Да	49 (87,5) 7 (12,5)	28 (50,0) 28 (50,0)	18,372	0,001
<b>Перинеурална инвазија</b> Не Да	55 (98,2) 1 (1,8)	43 (76,8) 13 (23,2)	11,755	0,001
<b>Присуство муцина у тумору</b> Не Да	53 (94,6) 3 (5,4)	47 (83,9) 9 (16,7)	3,360	0,067
<b>Присуство некрозе у тумору</b> Не Да	38 (67,9) 18 (32,1)	24 (42,9) 32 (57,1)	7,081	0,008

**4.10. Дистрибуција болесника у односу на хитност оперативног захвата**

Оперативни захват био је хитан код само два болесника (1,8%) и оба болесника су била у III стадијуму болести (Табела 13).

**Табела 13.** Дистрибуција пацијената у односу на хитност операције код свих пацијената и посебно у групи са I и II стадијумом, као и у групи са III стадијумом колоректалног карцинома

<b>TNM стадијум болести</b>	<b>Хитност операције</b>	<b>Број (%)</b>
<b>Сви болесници</b>	Не Да	110 (98,2) 2 (1,8)
<b>I и II стадијум болести</b>	Не Да	56 (100,0) 0 (0,0)
<b>III стадијум болести</b>	Не Да	54 (96,4) 2 (3,6)



**4.11. Дистрибуција болесника у односу на примену хемиотерапије**

Од укупног броја болесника, њих 54 (48,2%) лечено је хемиотерапијом. Само четири (7,1%) болесника из групе са I и II стадијумом лечено је хемиотерапијом, док је из групе са III стадијумом болести њих 50 (89,3%) лечено хемиотерапијом (Табела 14).

**Табела 14.** Дистрибуција болесника у односу на лечење хемиотерапијом код свих болесника и посебно у групи са I и II стадијумом, као и у групи са III стадијумом колоректалног карцинома

<b>TNM стадијум болести</b>	<b>Лечење хемиотерапијом</b>	<b>Број (%)</b>
<b>Сви болесници</b>	Не	58 (51,8)
	Да	54 (48,2)
<b>I и II стадијум болести</b>	Не	52 (92,7)
	Да	4 (7,1)
<b>III стадијум болести</b>	Не	6 (10,7)
	Да	50 (89,3)

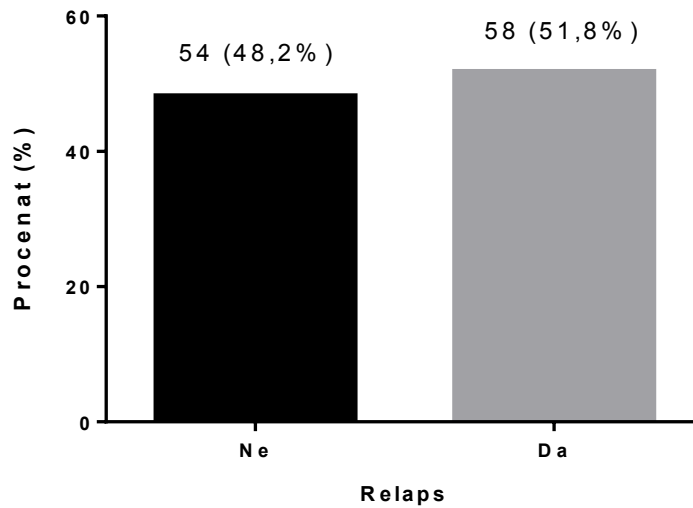
Табела 15 показује дистрибуцију болесника у односу на врсту примењене хемиотерапије. Од укупно 54 болесника лечених хемиотерапијом, њих 12 (10,7%) лечено је *Xelodom*® а 42 (37,6%) 5-флуороурацилом. Унутар групе са I и II стадијумом болести 1 (1,8%) болесник је лечен *Xelodom*® а 3 (5,4%) 5-флуороурацилом, док је у групи оболелих који су били у III стадијуму болести *Xelodom*® лечено њих 11 (19,6%), 5-флуороурацилом њих 39 (69,6%) (Табела 15).

**Табела 15.** Дистрибуција болесника у односу на врсту хемиотерапије код свих болесника и посебно у групи са I и II стадијумом, као и у групи са III стадијумом колоректалног карцинома

<b>TNM стадијум болести</b>	<b>Врста хемиотерапије</b>	<b>Број (%)</b>
<b>Сви болесници</b>	Без хемиотерапије	58 (51,8)
	<i>Xeloda</i>	12 (10,7)
	5-флуороурацил	42 (37,6)
<b>I и II стадијум болести</b>	Без хемиотерапије	51 (92,9)
	<i>Xeloda</i>	1 (1,8)
	5-флуороурацил	3 (5,4)
<b>III стадијум болести</b>	Без хемиотерапије	6 (10,7)
	<i>Xeloda</i>	11 (19,6)
	5-флуороурацил	39 (69,6)

#### **4.12. Дистрибуција болесника у односу на релапс болести**

Од укупног броја болесника укључених у студију, њих 58 (51,8%) доживело је релапс болести, док код преосталих 54 (48,2%) није дошло до релапса болести (Графикон 4).



**Графикон 4.** Учесталост релапса код болесника са колоректалним карциномом

4.12.1. Анализа појаве релапса у односу на стадијум болести

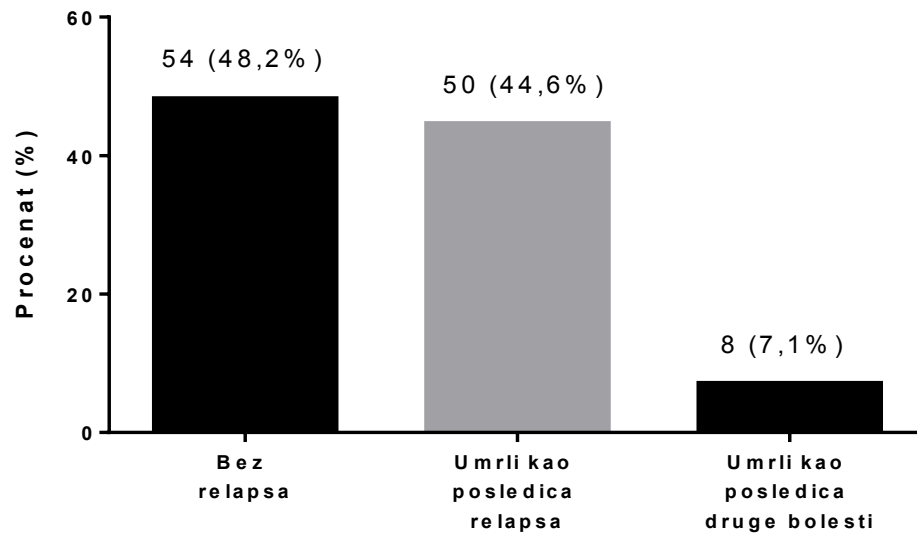
Табела 16 показује да је од укупног броја болесника из групе која је била у I и II стадијуму болести њих 30 (53,6%) имало релапс, док је у групи која је била у III стадијуму болести релапс имало њих 28 (50%) (Табела 16).

**Табела 16.** Дистрибуција болесника у односу на појаву релапса посебно у групи са I и II стадијумом, као и у групи са III стадијумом колоректалног карцинома.

<b>TNM стадијум болести</b>	<b>Релапс</b>	<b>Број (%)</b>
<b>I и II стадијум болести</b>	Не	26 (46,4)
	Да	30 (53,6)
<b>III стадијум болести</b>	Не	28 (50,0)
	Да	28 (50,0)

#### 4.12.2. Анализа болесника у односу на појаву релапса и исход болести

Графикон 5 показује да од 58 болесника који су имали релапс, њих 50 (44,6%) умрло је од последица релапса, док је преосталих осам (7,1%) умрло од последица друге болести (Графикон 5).



Графикон 5. Статус болесника у односу на релапс

#### 4.12.3. Анализа болесника у односу на појаву релапса и исход болести, дистрибуција према стадијуму болести

Унутар групе која је била у I и II стадијуму болести, њих 26 (46,4%) није имало релапс, 22 (39,3%) умрло је од последица релапса, док је осам (14,3%) умрло од последица неке друге болести. У групи болесника која је била у III стадијуму болести њих 28 (50%) није имало релапс, док је 28 (50%) умрло од последица релапса, а ниједан болесник није умро од последица неке друге болести (Табела 17).

**Табела 17.** Дистрибуција болесника према статусу пацијената у односу на релапс посебно у групи са I и II стадијумом, као и у групи са III стадијумом колоректалног карцинома

<b>TNM стадијум болести</b>	<b>Релапс</b>	<b>Број (%)</b>
<b>I и II стадијум болести</b>	Без релапса	24 (42,9)
	Умрли од последица релапса	24 (42,9)
	Умрли од последица друге болести	8 (14,3)
<b>III стадијум болести</b>	Без релапса	30 (53,6)
	Умрли од последица релапса	26 (46,4)
	Умрли од последица друге болести	0 (0)

## 4.12.4. Анализа преживљавања у односу на стадијум болести

Табела 18 приказује просечне вредности, стандардне девијације, минимум, максимум и медијану свеукупног преживљавања, преживљавања без појаве болести и времена преживљавања болесника умрлих услед релапса болести код свих болесника, у групи са I и II стадијумом, као и у групи са III стадијумом болести. Између група болесника подељених у односу на стадијум болести није уочена статистички значајна разлика у просечним вредностима свеукупног преживљавања, преживљавања без појаве болести и преживљавања болесника умрлих од последица релапса у месецима (Табела 18).

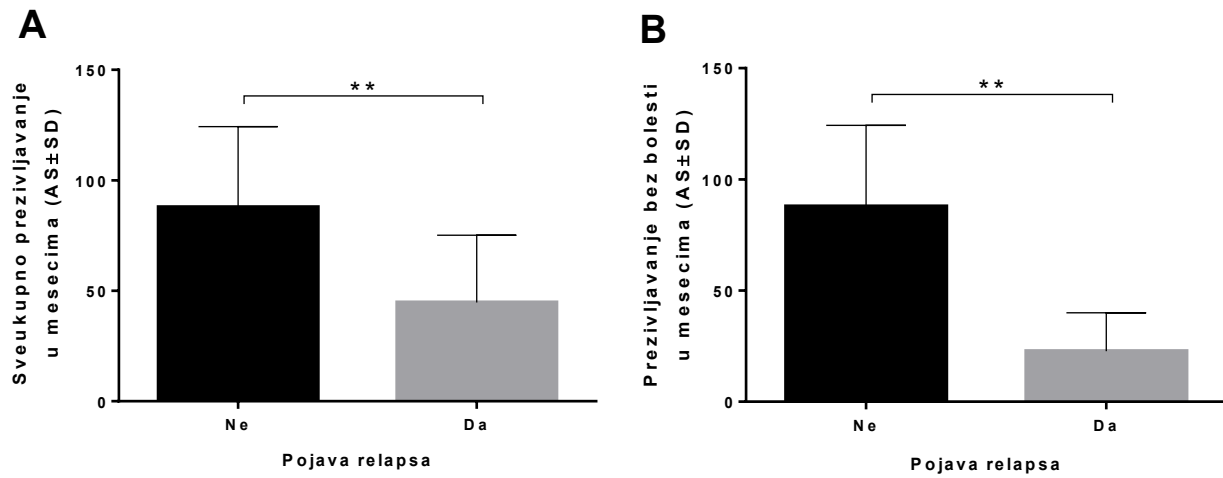
**Табела 18.** Просечне вредности, стандардне девијације, минималне и максималне вредности, и медијана карактеристика преживљавања код свих болесника и посебно у групи са I и II стадијумом, као и у групи са III стадијумом колоректалног карцинома

TNM стадијум болести	Преживљавање (месеци)	AS±SD	Минимум	Максимум	Медијана
Сви болесници	Свеукупно преживљавање	64,52±39,22	1,00	135,00	69
	Преживљавање без појаве болести	53,17±42,31	1,00	135,00	34
	Преживљавање умрлих од последица релапса	23,64±18,23	4,00	98,00	21
I и II стадијум болести	Свеукупно преживљавање	58,73±39,64	1,00	135,00	51
	Преживљавање без појаве болести	47,35±41,73	1,00	135,00	31
	Преживљавање умрлих од последица релапса	24,50±20,16	4,00	98,00	19
III стадијум болести	Свеукупно преживљавање	70,32±38,26	10,00	135,00	82
	Преживљавање без појаве болести	59,00±42,45	5,00	135,00	65
	Преживљавање умрлих од последица релапса	22,84±16,63	5,00	84,00	21

AS – аритметичка средина; SD – стандардна девијација

#### 4.12.5. Анализа преживљавања у односу на појаву релапса болести

Графикон 6 показује да је просечна вредност свеукупног преживљавања високо статистички значајнија, већа, ( $p < 0,010$ ) код болесника који нису имали релапс ( $88,85 \pm 36,42$  месеци) у односу на болеснике са појавом релапса ( $44,67 \pm 30,49$  месеци) (Графикон 6А). Такође, преживљавање без појаве болести у месецима је било високо статистички значајно веће ( $p < 0,010$ ) у групи болесника без појаве релапса ( $88,85 \pm 36,42$  месеци) у односу на групу у којој је дошло до појаве релапса ( $22,75 \pm 17,30$  месеци) (Графикон 6 Б).



**Графикон 6.** Просечне вредности (А) свеукупног преживљавања и (Б) преживљавања без болести у месецима у односу на појаву релапса код пацијената са колоректалним карциномом

$p < 0,010$ ;  $t$ -тест независних узорака



4.12.6. Анализа места релапса болести

Од укупног броја болесника са КРК, њих 20 (17,9%) имало је током релапса метастазе на јетри, 14 (12,5%) је имало локални рецидив, седам (6,2%) је имало метастазе на јетри и плућима, четири (3,6%) на плућима, и четири (3,6%) на перитонеуму, два (1,8%) на јетри и колону, док је по један болесник (0,9%) имао метастазе на ретроперитонеуму, у полипу, костима, плеури и панкреасу, лимфним чворовима врата, другом и трећем ребру и у лимфним чворовима целог организма (Табела 19).

**Табела 19.** Анализа болесника у односу на место релапса код пацијената са колоректалним карциномом

<b>TNM стадијум болести</b>	<b>Место релапса</b>	<b>Број (%)</b>
<b>Сви болесници</b>	Без релапса	54 (48,2)
	Јетра	20 (17,9)
	Плућа	4 (3,6)
	Јетра и плућа	7 (6,2)
	Јетра и колон	2 (1,8)
	Локални рецидив	14 (12,5)
	Перитонеум	4 (3,6)
	Ретроперитонеум	1 (0,9)
	Карцином у полипу	1 (0,9)
	Кости	1 (0,9)
	Плеура и панкреас	1 (0,9)
	Лимфни чворови врата	1 (0,9)
	Друго и треће ребро	1 (0,9)
	Метастазе у лимфним чворовима целог организма	1 (0,9)

Унутар групе болесника са I и II стадијумом болести њих 11 (19,6%) имали су релапс у виду локалног рецидива, осам (14,3%) на јетри, три (5,4%) на јетри и плућима, два (3,6%) на плућима, два (3,6%) на јетри и колону, и по један (1,8%) је имао метастазе на перитонеуму, костима, плеури и панкреасу и карциному у виду полипа. Унутар групе болесника са III стадијумом болести, њих 12 (21,4%) имали су релапс у виду метастаза на јетри, два (3,6%) на плућима, четири (7,1%) на јетри и на плућима, по три (5,4%) болесника су имали релапс у виду локалног рецидива и релапса на перитонеуму и по један (1,8%) је имао метастазе на ретроперитонеуму, лимфним чворовима врата, другом и трећем ребру и метастазе у свим лимфним чворовима организма (Табела 20).

4.12.7. Анализа места појаве релапса према стадијуму болести

**Табела 20.** Дистрибуција болесника у односу на место релапса код болесника са колоректалним карциномом посебно у групи са I и II стадијумом, као и у групи са III стадијумом болести

<b>TNM стадијум болести</b>	<b>Место релапса</b>	<b>Број (%)</b>
<b>I и II стадијум</b>	Без релапса	26 (46,4)
	Јетра	8 (14,3)
	Плућа	2 (3,6)
	Јетра и плућа	3 (5,4)
	Јетра и колон	2 (3,6)
	Локални рецидив	11 (19,6)
	Перитонеум	1 (1,8)
	Ретроперитонеум	0 (0,0)
	Карцином у полипу	1 (1,8)
	Кости	1 (1,8)
	Плеура и панкреас	1 (1,8)
	Лимфни чворови врата	0 (0,0)
	Друго и треће ребро	0 (0,0)
	Метастазе у лимфним чворовима целог организма	0 (0,0)
	<b>III стадијум</b>	Без релапса
Јетра		12 (21,4)
Плућа		2 (3,6)
Јетра и плућа		4 (7,1)
Јетра и колон		0 (0,0)
Локални рецидив		3 (5,4)
Перитонеум		3 (5,4)
Ретроперитонеум		1 (1,8)
Карцином у полипу		0 (0)
Кости		0 (0)
Плеура и панкреас		0 (0)
Лимфни чворови врата		1 (1,8)
Друго и треће ребро		1 (1,8)
Метастазе у лимфним чворовима целог организма		1 (1,8)

4.12.8. Анализа појаве релапса болести у односу на пол и старост приликом поделе оболелих према стадијуму болести

Између болесника подељених на групе према старости и полу није уочена статистички значајна разлика у односу на учесталост појаве релапса како код свих болесника, тако нити унутар групе болесника која је била у I и II стадијуму, или III стадијуму болести (Табела 21).

**Табела 21.** Појава релапса у односу на старост и пол пацијената

TNM стадијум болести	Социо-демографске карактеристике	Релапс Број (%)		$\chi^2$	<i>p</i>
		Не	Да		
<b>Сви болесници</b>	<b>Старост</b> 45–65 година	19 (40,4)	28 (59,6)	1,968	0,161
	66–84 године	35 (53,8)	30 (46,2)		
	<b>Пол</b> Жене	24 (47,1)	27 (52,9)	0,050	0,823
	Мушкарци	30 (49,2)	31 (50,8)		
<b>I и II стадијум болести</b>	<b>Старост</b> 45–65 година	7 (41,2)	10 (58,8)	0,271	0,603
	66–84 године	19 (48,7)	20 (51,3)		
	<b>Пол</b> Жене	9 (40,9)	13 (59,1)	0,444	0,505
	Мушкарци	17 (50,0)	17 (50,0)		
<b>III стадијум болести</b>	<b>Старост</b> 45–65 година	12 (40,0)	18 (60,0)	2,585	0,108
	66–84 године	16 (61,5)	10 (38,5)		
	<b>Пол</b> Жене	15 (51,7)	14 (48,3)	0,072	0,789
	Мушкарци	13 (48,1)	14 (51,9)		

$\chi^2$  – hi хвадрат тест; *p* – статистичка значајност

#### 4.12.9. Анализа појаве релапса у односу на присуство метастаза у прегледаним лимфним чворовима

Код 33 (29,5%) болесника одстрањено је најмање три позитивна лимфна чвора, док је код 23 (20,5%) одстрањено четири или више метастазама захваћена лимфна чвора. Између група болесника подељених у односу на појаву релапса није уочена статистички значајна разлика у односу на статус одстрањених лимфних чворова (Табела 22).

**Табела 22.** Појава релапса у односу на статус лимфних чворова (присуство метастаза)

TNM стадијум болести	Статус (позитивност) лимфних чворова	Релапс Број (%)		$\chi^2$	<i>p</i>
		Не	Да		
Сви болесници	Нодус негативни	26 (48,1)	30 (51,7)	1,990	0,370
	N1 (< 3 позитивна лимфна чвора)	19 (35,2)	14 (24,1)		
	N2 ( $\geq$ 4 позитивна лимфна чвора)	9 (16,7)	14 (24,1)		
I и II стадијум болести	Нодус негативни	26 (100)	30 (100)	/	/
	N1 (< 3 позитивна лимфна чвора)	0 (0,0)	0 (0,0)		
	N2 ( $\geq$ 4 позитивна лимфна чвора)	0 (0,0)	0 (0,0)		
III стадијум болести	Нодус негативни	0 (0,0)	0 (0,0)	1,845	0,174
	N1 (< 3 позитивна лимфна чвора)	19 (67,9)	14 (50,0)		
	N2 ( $\geq$ 4 позитивна лимфна чвора)	9 (32,1)	14 (50,0)		

$\chi^2$  – hi хвадрат тест; *p* – статистичка значајност

4.12.10. Анализа просечних вредности укупног броја и броја одстрањених позитивних (метастатских) лимфних чворова у односу на групе болесника подељене према појави релапса

Између група болесника подељених према појави релапса није уочена статистички значајна разлика у просечном броју извађених лимфних чворова (укупних и позитивних) када су у питању сви болесници у просечном укупном броју извађених лимфних чворова када су у питању пацијенти са I и II стадијумом болести. Међутим, статистички значајна разлика ( $p = 0,039$ ) уочена је у просечном броју извађених метастатски позитивних лимфних чворова у односу на појаву релапса. Болесници који су имали релапс имали су и значајно већи просечан број извађених метастатски позитивних лимфних чворова ( $4,78 \pm 3,98$  лимфних чворова) у односу на групу болесника која није имала релапс ( $2,96 \pm 2,20$  лимфних чворова) (Табела 23).

**Табела 23.** Просечне вредности укупног броја и броја позитивних (метастатских) извађених лимфних чворова у односу на групе болесника подељене према појави релапса

TNM стадијум болести	Број извађених лимфних чворова	Релапс AS±SD		t	p
		Не	Да		
Сви болесници	Укупан број извађених лимфних чворова	17,24 ± 10,57	13,94 ± 7,04	1,951	0,054
	Број метастатски позитивних лимфних чворова	1,53 ± 2,16	2,31 ± 3,65	-1,350	0,180
I и II стадијум болести	Укупан број извађених лимфних чворова	16,92 ± 8,27	13,50 ± 6,78	1,702	0,095
III стадијум болести	Укупан број извађених лимфних чворова	17,53 ± 12,48	14,42 ± 7,42	1,132	0,263
	Број метастатски позитивних лимфних чворова	2,96 ± 2,20	4,78 ± 3,98	-2,117	0,039

AS – аритметичка средина; SD – стандардна девијација; p – статистичка значајност; t – Студентов t-тест

4.12.11. Анализа појаве релапса у односу на захваћеност тумором у групи свих болесника и према стадијуму болести

Између група болесника подељених према појави релапса уочена је висока статистички значајна разлика ( $F = 8,798$ ;  $p = 0,003$ ) у односу на захваћеност тумором, при чему су сви пацијенти који су имали *T4* стадијум имали релапс, њих шест (10,3%), док болесници који су имали *T2* стадијум, њих три (5,6%) нису имали релапс. Статистички значајна разлика између група подељених према појави релапса није уочена унутар групе са I и II стадијумом, као нити унутар групе са III стадијумом колоректалног карцинома (Табела 24).

**Табела 24.** Појава релапса у односу на захваћеност тумором код свих болесника, болесника у I и II стадијуму, као и код болесника у III стадијуму болести

TNM стадијум болести	Захваћеност тумором	Релапс Број (%)		F	p
		Не	Да		
Сви болесници	T2	3 (5,6)	0 (0,0)	8,798	0,003
	T3	51 (94,4)	52 (89,7)		
	T4	0 (0,0)	6 (10,3)		
I и II стадијум болести	T2	0 (0,0)	0 (0,0)	3,373	0,053
	T3	26 (100,0)	26 (86,7)		
	T4	0 (0,0)	4 (13,3)		
III стадијум болести	T2	3 (10,7)	0 (0)	5,020	0,081
	T3	25 (89,3)	26 (92,9)		
	T4	0 (0)	2 (7,1)		

*F* – Фишеров тест; *p* – статистичка значајност

#### 4.12.12. Анализа појаве релапса у односу на хистолошки градус тумора у групи свих болесника и према стадијуму болести

Хистолошком анализом тумора утврђено је да је половина болесника, њих 56 (50%) имало добро диферентован тумор, њих 33 (29,5%) средње диферентован, док је најмањи број болесника, њих 23 (20,5%) имало слабо диферентован тумор. Између група болесника подељених према појави релапса није уочена статистички значајна разлика у односу на хистолошки градус тумора како код свих пацијенат, тако нити унутар група подељених према стадијуму болести (Табела 25).

**Табела 25.** Појава релапса у односу на хистолошки градус тумора код свих болесника, болесника у I и II стадијуму, као и код болесника у III стадијуму болести

TNM стадијум болести	Хистолошки градус тумора	Релапс Број (%)		$\chi^2$	<i>p</i>
		Не	Да		
Сви болесници	Добро диферентован	26 (48,1)	30 (51,7)	1,736	0,420
	Средње диферентован	19 (35,2)	14 (24,1)		
	Слабо диферентован	9 (16,7)	14 (24,1)		
I и II стадијум болести	Добро диферентован	4 (15,4)	6 (20,0)	0,202	0,653
	Средње диферентован	22 (84,6)	24 (80,0)		
	Слабо диферентован	0 (0,0)	0 (0,0)		
III стадијум болести	Добро диферентован	2 (7,1)	1 (3,6)	2,217	0,330
	Средње диферентован	25 (89,3)	23 (82,1)		
	Слабо диферентован	1 (3,6)	4 (14,3)		

$\chi^2$  – *hi* хвадрат тест; *p* – статистичка значајност



4.12.13. Анализа појаве релапса у односу на локализацију тумора у групи свих болесника и према стадијуму болести

Табела 26 показује да је између група болесника подељених на групе у односу на појаву релапса уочена статистички значајна разлика ( $\chi^2 = 5,019$ ;  $p = 0,025$ ) у односу на локализацију тумора. Болесници са релапсом су у значајно већем броју имали тумор локализован на левом колону, њих 41 (70,7%) у односу на 27 (50%) болесника без релапса. Такође, висока статистички значајна разлика уочена је и унутар групе болесника са I и II стадијумом болести ( $\chi^2 = 8,449$ ;  $p = 0,004$ ), при чему су болесници са релапсом у значајно већем броју, њих 22 (73,3%) имали тумор локализован на левом колону, у односу на болеснике без релапса, њих 27 (50%). Унутар групе болесника са III стадијумом болести статистички значајна разлика у односу на појаву релапса није уочена (Табела 26).

**Табела 26.** Појава релапса у односу на локализацију тумора код свих болесника, болесника у I и II стадијуму, као и код болесника у III стадијуму болести

TNM стадијум болести	Локализација тумора	Релапс Број (%)		$\chi^2$	$p$
		Не	Да		
Сви болесници	Леви колон	27 (50,0)	41 (70,7)	5,019	0,025
	Десни колон	27 (50,0)	17 (29,3)		
I и II стадијум болести	Леви колон	9 (34,6)	22 (73,3)	8,449	0,004
	Десни колон	17 (65,4)	8 (26,7)		
III стадијум болести	Леви колон	18 (64,3)	19 (67,9)	0,080	0,778
	Десни колон	10 (35,7)	9 (32,1)		

$\chi^2$  – хи квадрат тест;  $p$  – статистичка значајност

4.12.14. Анализа појаве релапса у односу на врсту операције у групи свих болесника и према стадијуму болести

Између група подељених у односу на појаву релапса није уочена статистички значајна разлика у односу на врсту операције КРК како код свих болесника, тако нити унутар група подељених у односу на стадијум болести (Табела 27).

**Табела 27.** Појава релапса у односу на врсту операције код свих болесника, болесника у I и II стадијуму, као и код болесника у III стадијуму болести.

TNM стадијум болести	Врста операције	Релапс Број (%)		$\chi^2$	<i>p</i>
		Не	Да		
Сви болесници	Отворена десна колектомија	22 (40,7)	14 (24,1)	8,121	0,229
	Отворена лева колектомија	3 (5,6)	6 (10,3)		
	Суптотална колектомија	4 (7,4)	1 (1,7)		
	Тотална колектомија	0 (0)	1 (1,7)		
	Сигмоидектомија	18 (33,3)	23 (39,7)		
	Трансверзектомија	3 (5,6)	4 (6,9)		
	Ресеција ректума	4 (7,4)	9 (15,5)		
I и II стадијум болести	Отворена десна колектомија	12 (46,2)	5 (16,7)	9,665	0,139
	Отворена лева колектомија	1 (3,8)	4 (13,3)		
	Суптотална колектомија	2 (7,7)	1 (3,3)		
	Тотална колектомија	0 (0,0)	1 (3,3)		
	Сигмоидектомија	6 (23,1)	8 (26,7)		
	Трансверзектомија	3 (11,5)	3 (10,0)		
	Ресеција ректума	2 (7,7)	8 (26,7)		
III стадијум болести	Отворена десна колектомија	10 (35,7)	9 (32,1)	3,719	0,590
	Отворена лева колектомија	2 (7,1)	2 (7,1)		
	Суптотална колектомија	2 (7,1)	0 (0)		
	Тотална колектомија	0 (0,0)	0 (0)		
	Сигмоидектомија	12 (42,9)	15 (53,6)		
	Трансверзектомија	0 (0,0)	1 (3,6)		
	Ресеција ректума	2 (7,1)	1 (3,6)		

*F* – Фишеров тест; *p* – статистичка значајност

4.12.15. Анализа појаве релапса у односу на присуство лимфоваскуларне инвазије у групи свих болесника и према стадијуму болести

Између група болесника подељених према појави релапса није уочена статистички значајна разлика у односу на присуство лимфоваскуларне инвазије како код свих болесника, тако ни унутар група болесника у I и II стадијуму болести. Статистичка значајност у односу на присуство лимфоваскуларне инвазије је уочена у групи болесника у III стадијуму болести ( $p = 0,008$ ) (Табела 28).

**Табела 28.** Појава релапса у односу на присуство лимфоваскуларне инвазије код свих болесника, болесника у I и II стадијуму, као и код болесника у III стадијуму болести

TNM стадијум болести	Лимфоваскуларна инвазија	Релапс Број (%)		$\chi^2$	$p$
		Не	Да		
Сви болесници	Не	41 (75,9)	36 (62,1)	2,499	0,114
	Да	13 (24,1)	22 (37,9)		
I и II стадијум болести	Не	22 (84,6)	27 (90,0)	0,369	0,543
	Да	4 (15,4)	3 (10,0)		
III стадијум болести	Не	19 (67,9)	9 (32,1)	7,143	0,008
	Да	9 (32,1)	19 (67,9)		

$\chi^2$  –  $hi$  хвадрат тест;  $p$  – статистичка значајност

4.12.16. Анализа појаве релапса у односу на присуство перинеуралне инвазије у групи свих болесника и према стадијуму болести

Између група болесника подељених према појави релапса није уочена статистички значајна разлика у односу на присуство перинеуралне инвазије како код свих болесника, тако нити унутар група болесника подељених према стадијуму болести (Табела 29).

**Табела 29.** Појава релапса у односу на присуство перинеуралне инвазије код свих болесника, болесника у I и II стадијуму, као и код болесника у III стадијуму болести

TNM стадијум болести	Перинеурална инвазија	Релапс Број (%)		$\chi^2$	<i>p</i>
		Не	Да		
Сви болесници	Не	49 (90,7)	49 (84,5)	1,001	0,317
	Да	5 (9,3)	9 (15,5)		
I и II стадијум болести	Не	26 (100,0)	29 (96,7)	0,882	0,348
	Да	0 (0,0)	1 (3,3)		
III стадијум болести	Не	23 (82,1)	20 (71,4)	0,902	0,342
	Да	5 (17,9)	8 (28,6)		

$\chi^2$  – *hi* хвадрат тест; *p* – статистичка значајност

4.12.17. Анализа појаве релапса у односу на присуство муцина у тумору у групи свих болесника и према стадијуму болести

Између група болесника подељених према појави релапса није уочена статистички значајна разлика у односу на присуство муцина у тумору како код свих болесника, тако нити унутар група пацијената подељених према стадијуму болести (Табела 30).

**Табела 30.** Појава релапса у односу на присуство муцина у тумору код свих болесника, болесника у I и II стадијуму, као и код болесника у III стадијуму болести

TNM стадијум болести	Присуство муцина у тумору	Релапс Број (%)		$\chi^2$	<i>p</i>
		Не	Да		
Сви болесници	Не	49 (90,7)	51 (87,9)	0,231	0,631
	Да	5 (9,3)	7 (12,1)		
I и II стадијум болести	Не	24 (92,3)	29 (96,7)	0,522	0,470
	Да	2 (7,7)	1 (3,3)		
III стадијум болести	Не	25 (89,3)	22 (78,6)	1,191	0,275
	Да	3 (10,7)	6 (21,4)		

$\chi^2$  – *hi* хвадрат тест; *p* – статистичка значајност

4.12.18. Анализа појаве релапса у односу на присуство некрозе у тумору у групи свих болесника и према стадијуму болести

Између група болесника подељених према појави релапса није уочена статистички значајна разлика у односу на присуство некрозе у тумору како код свих болесника, тако нити унутар група болесника подељених према стадијуму болести (Табела 31).

**Табела 31.** Појава релапса у односу на присуство некрозе у тумору код свих болесника, болесника у I и II стадијуму, као и код болесника у III стадијуму болести

TNM стадијум болести	Присуство некрозе у тумору	Релапс Број (%)		$\chi^2$	<i>p</i>
		Не	Да		
Сви болесници	Не	31 (57,4)	31 (53,4)	0,177	0,674
	Да	23 (42,6)	27 (46,6)		
I и II стадијум болести	Не	18 (69,2)	20 (66,7)	0,042	0,838
	Да	8 (30,8)	10 (33,3)		
III стадијум болести	Не	13 (46,4)	11 (39,3)	0,292	0,589
	Да	15 (53,6)	17 (60,7)		

$\chi^2$  – *hi* хвадрат тест; *p* – статистичка значајност

4.12.19. Анализа појаве релапса у односу на хитност операције у групи свих болесника и према стадијуму болести

Између група болесника подељених према појави релапса није уочена статистички значајна разлика у односу на хитност операције како код свих болесника, тако нити унутар група болесника подељених према стадијуму болести (Табела 32).

**Табела 32.** Појава релапса у односу на хитност операције код свих болесника, болесника у I и II стадијуму, као и код болесника у III стадијуму болести

TNM стадијум болести	Хитност операције	Релапс Број (%)		$\chi^2$	<i>p</i>
		Не	Да		
Сви болесници	Не	53 (98,1)	57 (98,3)	0,003	0,959
	Да	1 (1,9)	1 (1,7)		
I и II стадијум болести	Не	26 (100,0)	30 (100,0)	/	/
	Да	0 (0,0)	0 (0,0)		
III стадијум болести	Не	27 (96,4)	27 (96,4)	0,000	1,000
	Да	1 (3,6)	1 (3,6)		

$\chi^2$  – *hi* хвадрат тест; *p* – статистичка значајност

4.12.20. Анализа појаве релапса у односу на лечење хемиотерапијом у групи свих болесника и према стадијуму болести

Између група болесника подељених према појави релапса није уочена статистички значајна разлика у односу на лечење хемиотерапијом како код свих болесника, тако нити унутар група болесника подељених према стадијуму болести (Табела 33).

**Табела 33.** Појава релапса у односу на лечење хемиотерапијом код свих болесника, болесника у I и II стадијуму, као и код болесника у III стадијуму болести

TNM стадијум болести	Лечење хемиотерапијом	Релапс Број (%)		$\chi^2$	<i>p</i>
		Не	Да		
Сви болесници	Не	29 (53,7)	29 (50,0)	0,154	0,695
	Да	25 (46,3)	29 (50,0)		
I и II стадијум болести	Не	25 (96,2)	27 (90,0)	0,795	0,373
	Да	1 (3,8)	3 (10,0)		
III стадијум болести	Не	4 (14,3)	2 (7,1)	0,747	0,388
	Да	24 (85,7)	26 (92,9)		

$\chi^2$  – *hi* хвадрат тест; *p* – статистичка значајност



Између група болесника подељених према појави релапса није уочена статистички значајна разлика у односу лечење хемиотерапијом како код свих болесника, тако нити унутар група болесника подељених према стадијуму болести (Табела 34).

**Табела 34.** Појава релапса у односу на лечење хемиотерапијом код свих болесника, болесника у I и II стадијуму, као и код болесника у III стадијуму болести

TNM стадијум болести	Лечење хемиотерапијом	Релапс Број (%)		$\chi^2$	p
		Не	Да		
Сви болесници	Без хемиотерапије	29 (53,7)	29 (50,0)	0,334	0,954
	<i>Xeloda</i>	6 (11,1)	6 (10,3)		
	5-флуороурацил	19 (35,2)	23 (39,7)		
I и II стадијум болести	Без хемиотерапије	25 (96,2)	27 (90,0)	1,130	0,568
	<i>Xeloda</i>	0 (0,0)	1 (3,3)		
	5-флуороурацил	1 (3,8)	2 (6,7)		
III стадијум болести	Без хемиотерапије	4 (14,3)	2 (7,1)	1,027	0,795
	<i>Xeloda</i>	6 (21,4)	5 (17,9)		
	5-флуороурацил	18 (64,3)	21 (75)		

$\chi^2$  – hi хвадрат тест; p – статистичка значајност

4.12.21. Анализа појаве релапса у односу на проценат, интензитет и локализацију обојености канцерских матичних ћелија (КМЋ) са CD44 антителима у групи свих болесника са колоректалним карциномом (КРК)

Од укупног броја болесника код 90 (80,4%) детектоване су CD44 позитивне КМЋ, док код преосталих 22 (19,6%) КМЋ нису биле обојене. Код 49 (43,8%) болесника било је до 10% обојених ћелија, код 20 (17,9%) било их је од 10 до 50%, док је код 21 (18,8%) уочено више од 50% CD44 позитивних ћелија. Иако резултати показују да је већи број болесника из групе која је имала релапс са више од 50% обојених ћелија, њих 14 (24,1%) у односу на групу у којој није дошло до релапса, њих седам (13%), као и да је већи број болесника у групи са релапсом са до 10% обојених ћелија, њих 28 (48,3%) у односу на групу без релапса, где их је 21 (38,9%), добијена је гранична статистички значајна разлика између група болесника ( $p = 0,052$ ).

Међутим, када је у питању интензитет обојености, уочена је статистички значајна разлика ( $\chi^2 = 10,024$ ;  $p = 0,018$ ) између група болесника подељених према појави релапса. Болесници са релапсом су у значајно већем броју, њих 26 (44,8%) имали умерен интензитет обојености у односу на болеснике без релапса, њих 15 (27,8%). Такође, болесници са релапсом су имали у значајно већем броју и слабији интензитет обојености, њих 22 (37,9%) у односу на болеснике без релапса, њих 15 (27,8%). Од укупног броја болесника код њих 37 (33%) био је присутан слаб интензитет обојености; умерен интензитет је уочен код 41 (36,6%) болесника, док је велики интензитет обојености уочен код њих 12 (10,7%).

Када је у питању локализација обојености са CD44 антителима, најчешће је било присутно мембранско бојење, код 62 (55,4%) болесника, затим мембранско и цитоплазматско код њих 15 (13,4%), док је само цитоплазматско бојење било присутно код њих 13 (11,6%). Уочена је статистички значајна разлика између група подељених према појави релапса ( $\chi^2 = 10,398$ ;  $p = 0,015$ ), при чему је код болесника са релапсом значајно чешће било присутно мембранско бојење, код њих 36 (62,1%) у односу на 26 (48,1%) болесника из групе без релапса (Табела 35).

**Табела 35.** Појава релапса у односу на проценат, интензитет и локализацију обојености КМТ са *CD44* антителима код свих болесника са колоректалним карциномом

Процент <i>CD44</i> позитивних ћелија, интензитет и локализација обојености	Релапс Број (%)		Укупно Број (%)	$\chi^2$	<i>p</i>
	Не	Да			
<b>Процент позитивних ћелија</b>					
Нема обојених ћелија	16 (29,6)	6 (10,3)	22 (19,6)	7,746	0,052
До 10% обојених ћелија	21 (38,9)	28 (48,3)	49 (43,8)		
10–50% обојених ћелија	10 (18,5)	10 (17,2)	20 (17,9)		
Више од 50% обојених ћелија	7 (13,0)	14 (24,1)	21 (18,8)		
<b>Интензитет обојености</b>					
Нема обојених ћелија	16 (29,6)	6 (10,3)	22 (19,6)	10,024	0,018
Слаб интензитет обојености	15 (27,8)	22 (37,9)	37 (33,0)		
Умерен интензитет обојености	15 (27,8)	26 (44,8)	41 (36,6)		
Велики интензитет обојености	8 (14,8)	4 (6,9)	12 (10,7)		
<b>Локализација обојености</b>					
Нема обојених ћелија	16 (19,6)	6 (10,3)	22 (19,6)	10,398	0,015
Мембранско бојење	26 (48,1)	36 (62,1)	62 (55,4)		
Цитоплазматско бојење	3 (5,6)	10 (17,2)	13 (11,6)		
Мембранско и цитоплазматско бојење	9 (16,7)	6 (10,3)	15 (13,4)		

$\chi^2$  – *hi* хвадрат тест; *p* – статистичка значајност

4.12.22. Анализа појаве релапса у односу на проценат, интензитет и локализацију обојености КМЋ са CD44 антителима код оболелих од КРК према стадијуму болести

Између група болесника подељених према присуству релапса уочена је висока статистички значајна разлика ( $\chi^2 = 12,730$ ;  $p = 0,005$ ) у односу на заступљеност CD44 позитивних ћелија унутар групе болесника са I и II стадијумом болести. Болесници са релапсом су у значајно већем броју имали заступљеност CD44 позитивних ћелија већу од 50%, њих 12 (40%) у односу на 1 (3,8%) болесника без релапса. Такође, статистички значајно ( $\chi^2 = 7,827$ ;  $p = 0,050$ ) било је присутно цитоплазматско бојење са CD44 антителима код болесника са релапсом, и то код 10 (33,3%) болесника са релапсом, у односу на три (11,5%) болесника без релапса. Значајна разлика у односу на интензитет обојености са CD44 антителима унутар групе болесника са I и II стадијумом болести није уочена. Када је у питању група болесника са III стадијумом болести, статистички значајна разлика ( $\chi^2 = 6,425$ ;  $p = 0,040$ ) уочена је само у односу на локализацију обојености, при чему су болесници са релапсом у значајно већем броју, њих 22 (78,6%) имали мембранско бојење у односу на 13 (46,4%) болесника без релапса. Унутар групе болесника са III стадијумом болести, а између група болесника подељених у односу на релапс, није уочена значајна разлика у односу на проценат CD44 позитивних ћелија и интензитет обојености (Табела 36).

**Табела 36.** Појава релапса у односу на проценат, интензитет и локализацију обојености КМТ са *CD44* антителима код болесника у I и II стадијуму, као и код болесника у III стадијуму колоректалног карцинома. (\* $\chi^2$  – *hi* хвадрат тест; *p* – статистичка значајност)

TNM стадијум болести	Процент <i>CD44</i> позитивних ћелија, интензитет и локализација обојености	Релапс Број (%)		$\chi^2$	<i>p</i>
		Не	Да		
I и II стадијум болести	<b>Процент позитивних ћелија</b> Нема обојених ћелија До 10% обојених ћелија 10–50% обојених ћелија Више од 50% обојених ћелија	8 (30,8) 12 (46,2) 5 (19,9) 1 (3,8)	2 (6,7) 11 (36,7) 5 (16,7) 12 (40,0)	12,730	0,005
	<b>Интензитет обојености</b> Нема обојених ћелија Слаб интензитет обојености Умерен интензитет обојености Велики интензитет обојености	8 (30,8) 7 (26,9) 9 (34,6) 2 (7,7)	2 (6,7) 13 (43,3) 13 (43,3) 2 (6,7)	5,872	0,118
	<b>Локализација обојености</b> Нема обојених ћелија Мембранско бојење Цитоплазматско бојење Мембранско и цитоплазматско бојење	8 (30,8) 13 (50,0) 3 (11,5) 2 (7,7)	2 (6,7) 14 (46,7) 10 (33,3) 4 (13,3)	7,827	0,050
III стадијум болести	<b>Процент позитивних ћелија</b> Нема обојених ћелија До 10% обојених ћелија 10–50% обојених ћелија Више од 50% обојених ћелија	8 (28,6) 9 (32,1) 5 (17,9) 6 (21,4)	4 (14,3) 17 (60,7) 5 (17,9) 2 (7,1)	5,795	0,122
	<b>Интензитет обојености</b> Нема обојених ћелија Слаб интензитет обојености Умерен интензитет обојености Велики интензитет обојености	8 (28,6) 8 (28,6) 6 (21,4) 6 (21,4)	4 (14,3) 9 (32,1) 13 (46,4) 2 (7,1)	5,971	0,113
	<b>Локализација обојености</b> Нема обојених ћелија Мембранско бојење Цитоплазматско бојење Мембранско и цитоплазматско бојење	8 (28,6) 13 (46,4) 0 (0,0) 7 (25,0)	4 (14,3) 22 (78,6) 0 (0,0) 2 (7,1)	6,425	0,040

4.12.23. Анализа појаве релапса у односу на проценат, интензитет и локализацију обојености КМТ са *Lgr5* антителима у групи свих болесника са колоректалним карциномом

Имунохистохемијско бојење са *Lgr5* антителима је рађено код 95 болесника. Од укупног броја код њих 87 (91,6%) уочене су *Lgr5* позитивне ћелије, док код преосталих 8 (8,4%) болесника ћелије нису биле *Lgr5* позитивне. Шездесет три болесника (66,3%) је имало више од 50% обојених ћелија, њих 16 (16,8%) имало је од 10 до 50%, док је њих осам (8,4%) имало до 10% ћелија позитивних на *Lgr5*. Код педесет болесника (52,6%) интензитет обојености је био слаб, код 30 (31,6%) је био умерен, док је код њих седам (7,4%) интензитет обојености био велики. Цитоплазматско бојење је било најчешће и било је присутно код 81 (85,3%) болесника, мембранско бојење код четири (4,2%), док је комбинација мембранског и цитоплазматског бојења била присутна код два (2,1%) болесника. Између група болесника подељених у групе у односу на појаву релапса није уочен статистички значајно чешћи проценат, интензитет обојености и локализација обојености са *Lgr5* антителима у некој од група болесника (Табела 37). (\* $\chi^2$  – *hi* хвадрат тест; *p* – статистичка значајност)

**Табела 37.** Појава релапса у односу на проценат, интензитет и локализацију обојености КМТ са *Lgr5* антителимом код свих болесника са колоректалним карциномом

Процент LgR5 позитивних ћелија, интензитет и локализација обојености	Релапс Број (%)		Укупно Број (%)	$\chi^2$	<i>p</i>
	Не	Да			
<b>Процент позитивних ћелија</b> Нема обојених ћелија До 10% обојених ћелија 10–50% обојених ћелија Више од 50% обојених ћелија	3 (6,7) 1 (2,2) 8 (17,8) 33 (73,3)	5 (10,0) 7 (14,0) 8 (16,0) 30 (60,0)	8 (8,4) 8 (8,4) 16 (16,8) 63 (66,3)	4,893	0,180
<b>Интензитет обојености</b> Нема обојених ћелија Слаб интензитет обојености Умерен интензитет обојености Велики интензитет обојености	3 (6,7) 25 (55,6) 16 (35,6) 1 (2,2)	5 (10,0) 25 (50,0) 14 (28,0) 6 (12,0)	8 (8,4) 50 (52,6) 30 (31,6) 7 (7,4)	3,953	0,267
<b>Локализација обојености</b> Нема обојених ћелија Мембранско бојење Цитоплазматско бојење Мембранско и цитоплазматско бојење	3 (6,7) 0 (0) 42 (93,3) 0 (0)	5 (10,0) 4 (8,0) 39 (78,0) 2 (4,0)	8 (8,4) 4 (4,2) 81 (85,3) 2 (2,1)	6,366	0,095

4.12.24. Анализа појаве релапса у односу на проценат, интензитет и локализацију обојености КМЋ са Lgr5 антителом код оболелих од КРК према стадијуму болести

Унутар група пацијената са I и II, као нити унутар групе са III стадијумом болести, а између група пацијената подељених у односу на релапс, није уочена значајна разлика у односу на процентуалну заступљеност *Lgr5* позитивних ћелија, интензитет и локализацију обојености (Табела 38).



**Табела 38.** Појава релапса у односу на проценат, интензитет и локализацију обојености КМЋ са Lgr5 антителима код пацијената у I и II стадијуму, као и код пацијената у III стадијуму колоректалног карцинома

TNM стадијум болести	Процент Lgr5 позитивних ћелија, интензитет и локализација обојености	Релапс Број (%)		$\chi^2$	p
		Не	Да		
I и II стадијум болести	<b>Процент позитивних ћелија</b> Нема обојених ћелија До 10% обојених ћелија 10–50% обојених ћелија Више од 50% обојених ћелија	2 (7,7) 1 (3,8) 6 (23,1) 17 (65,4)	5 (16,7) 6 (20,0) 6 (20,0) 13 (43,3)	5,131	0,162
	<b>Интензитет обојености</b> Нема обојених ћелија Слаб интензитет обојености Умерен интензитет обојености Велики интензитет обојености	2 (7,7) 14 (53,8) 10 (38,5) 0 (0,0)	5 (16,7) 17 (56,7) 8 (26,7) 0 (0,0)	1,520	0,468
	<b>Локализација обојености</b> Нема обојених ћелија Мембранско бојење Цитоплазматско бојење Мембранско и цитоплазматско бојење	2 (7,7) 0 (0,0) 24 (92,3) 0 (0,0)	5 (16,7) 4 (13,3) 19 (63,3) 2 (6,7)	7,620	0,055
III стадијум болести	<b>Процент позитивних ћелија</b> Нема обојених ћелија До 10% обојених ћелија 10–50% обојених ћелија Више од 50% обојених ћелија	1 (5,3) 0 (0,0) 2 (10,5) 16 (84,2)	0 (0,0) 1 (5,0) 2 (10,0) 17 (85,0)	2,006	0,571
	<b>Интензитет обојености</b> Нема обојених ћелија Слаб интензитет обојености Умерен интензитет обојености Велики интензитет обојености	1 (5,3) 11 (57,9) 6 (31,6) 1 (5,3)	0 (0,0) 8 (40,0) 6 (30,0) 6 (30,0)	5,023	0,170
	<b>Локализација обојености</b> Нема обојених ћелија Мембранско бојење Цитоплазматско бојење Мембранско и цитоплазматско бојење	1 (5,3) 0 (0,0) 18 (94,7) 0 (0,0)	0 (0,0) 0 (0,0) 20 (100,0) 0 (0,0)	1,080	0,299

4.12.25. Анализа појаве релапса у односу на проценат, интензитет и локализацију обојености КМЋ са *CD166* антителиом

Имунохистохемијско бојење са *CD166* антителиом је рађено код 80 болесника. Од укупног броја код њих 69 (86,2%) уочене су *CD166* позитивне ћелије, док код преосталих 11 (13,8%) болесника ћелије нису биле *CD166* позитивне. Шеснаест болесника (20%) је имало више од 50% обојених ћелија, њих 28 (35%) имало је од 10 до 50%, док је њих 25 (31,2%) имало до 10% ћелија позитивних на *CD166*. Код четрдесет болесника (50%) интензитет обојености је био слаб, код 28 (35%) био је умерен, док је код једног (1,2%) болесника интензитет обојености био велики. Мембранско и цитоплазматско бојење је било најчешће и било је присутно код 32 (40%) болесника, мембранско бојење код 16 (20%), док је цитоплазматско бојење било присутно код 21 (26,2%) болесника. Између група болесника подељених у групе у односу на појаву релапса није уочен статистички значајно чешћи проценат, интензитет обојености и локализација обојености са *CD166* антителиом у некој од група болесника (Табела 39).

**Табела 39.** Појава релапса у односу на проценат, интензитет и локализацију обојености КМТ са *CD166* антителиом

Процент <i>CD166</i> позитивних ћелија, интензитет и локализација обојености	Релапс Број (%)		Укупно Број (%)	$\chi^2$	<i>p</i>
	Не	Да			
<b>Процент позитивних ћелија</b>					
Нема обојених ћелија	5 (12,8)	6 (14,6)	11 (13,8)	5,187	0,159
До 10% обојених ћелија	15 (38,5)	10 (24,4)	25 (31,2)		
10–50% обојених ћелија	15 (38,5)	13 (31,7)	28 (35,0)		
Више од 50% обојених ћелија	4 (10,3)	12 (29,3)	16 (20,0)		
<b>Интензитет обојености</b>					
Нема обојених ћелија	5 (12,8)	6 (14,6)	11 (13,8)	1,285	0,733
Слаб интензитет обојености	21 (53,8)	19 (46,3)	40 (50,0)		
Умерен интензитет обојености	13 (33,3)	15 (36,6)	28 (35,0)		
Велики интензитет обојености	0 (0)	1 (2,4)	1 (1,2)		
<b>Локализација обојености</b>					
Нема обојених ћелија	5 (12,8)	6 (14,6)	11 (13,8)	3,501	0,321
Мембранско бојење	10 (25,6)	6 (14,6)	16 (20,0)		
Цитоплазматско бојење	7 (17,9)	14 (34,1)	21 (26,2)		
Мембранско и цитоплазматско бојење	17 (43,6)	15 (36,6)	32 (40,0)		

$\chi^2$  – *hi* хвадрат тест; *p* – статистичка значајност

4.12.26. Анализа појаве релапса у односу на проценат, интензитет и локализацију обојености КМЋ са *CD166* антителима код оболелих од КРК према стадијуму болести

Унутар група болесника са I и II, као нити унутар групе са III стадијумом болести, а између група болесника подељених у односу на релапс, није уочена значајна разлика у односу на процентуалну заступљеност *CD166* позитивних ћелија, интензитет и локализацију обојености (Табела 40).

**Табела 40.** Појава релапса у односу на проценат, интензитет и локализацију обојености КМТ са *CD166* антителима код болесника у I и II стадијуму, као и код болесника у III стадијуму колоректалног карцинома

TNM стадијум болести	Процент <i>CD166</i> позитивних ћелија, интензитет и локализација обојености	Релапс Број (%)		$\chi^2$	<i>p</i>
		Не	Да		
I и II стадијум болести	<b>Процент позитивних ћелија</b> Нема обојених ћелија До 10% обојених ћелија 10–50% обојених ћелија Више од 50% обојених ћелија	3 (11,5) 10 (38,5) 11 (42,3) 2 (7,7)	3 (10,0) 7 (23,3) 11 (36,7) 9 (30,0)	4,772	0,193
	<b>Интензитет обојености</b> Нема обојених ћелија Слаб интензитет обојености Умерен интензитет обојености Велики интензитет обојености	3 (11,5) 12 (46,2) 11 (42,3) 0 (0,0)	3 (10,0) 15 (50,0) 11 (36,7) 1 (3,3)	1,053	0,788
	<b>Локализација обојености</b> Нема обојених ћелија Мембранско бојење Цитоплазматско бојење Мембранско и цитоплазматско бојење	3 (11,5) 10 (38,5) 5 (19,2) 8 (30,8)	3 (10,0) 6 (20,0) 9 (30,0) 12 (40,0)	2,671	0,445
III стадијум болести	<b>Процент позитивних ћелија</b> Нема обојених ћелија До 10% обојених ћелија 10–50% обојених ћелија Више од 50% обојених ћелија	2 (15,4) 5 (38,5) 4 (30,8) 2 (15,4)	3 (27,3) 3 (27,3) 2 (18,2) 3 (27,3)	1,410	0,703
	<b>Интензитет обојености</b> Нема обојених ћелија Слаб интензитет обојености Умерен интензитет обојености Велики интензитет обојености	2 (15,4) 9 (69,2) 2 (15,4) 0 (0,0)	3 (27,3) 4 (36,4) 4 (36,4) 0 (0,0)	2,641	0,267
	<b>Локализација обојености</b> Нема обојених ћелија Мембранско бојење Цитоплазматско бојење Мембранско и цитоплазматско бојење	2 (15,4) 0 (0,0) 2 (15,4) 9 (69,2)	3 (27,3) 0 (0,0) 5 (45,5) 3 (27,3)	4,349	0,114

$\chi^2$  – hi хвадрат тест; *p* – статистичка значајност

4.12.27. Анализа појаве релапса у односу на процентуалну заступљеност са CD44/CD166 антителима код свих болесника са колоректалним карциномом

Комбиновано имунохистохемијско бојење ћелија са CD44 и CD166 антителом рађено је код 80 болесника. Од тога ћелије су биле CD44/CD166 позитивне код 77 (96,2%) болесника, а негативне код само три (3,8%) болесника. Тридесет четири болесника (42,5%) имало је до 10% обојених ћелија, 29 (36,2%) имало је од 10 до 50% обојених ћелија, док је 14 (17,5%) болесника имало преко 50% обојених ћелија. Између група болесника подељених према присуству релапса уочена је висока статистички значајна разлика у односу на процентуалну заступљеност CD44/CD166 позитивних КМЋ, при чему је значајно већи број болесника са релапсом, њих 13 (31,7%) имало више од 50% обојених ћелија у односу на болесника без релапса, само 1 (2,6%) болесник (Табела 41).

**Табела 41.** Појава релапса у односу на процентуалну заступљеност са CD44/CD166 антителима код свих болесника са колоректалним карциномом

Процент CD44/CD166 позитивних ћелија	Релапс Број (%)		Укупно Број (%)	$\chi^2$	<i>p</i>
	Не	Да			
<b>Процент позитивних ћелија</b>					
Нема обојених ћелија	3 (7,7)	0 (0)	3 (3,8)	14,338	0,002
До 10% обојених ћелија	20 (51,3)	14 (34,1)	34 (42,5)		
10–50% обојених ћелија	15 (38,5)	14 (34,1)	29 (36,2)		
Више од 50% обојених ћелија	1 (2,6)	13 (31,7)	14 (17,5)		

$\chi^2$  – *hi* хвадрат тест; *p* – статистичка значајност

4.12.28. Анализа појаве релапса у односу на проценат обојености КМЋ са CD44/CD166 антителима код оболелих од КРК према стадијуму болести

Између група болесника подељених према присуству релапса, а унутар групе са I и II стадијумом болести уочена је висока статистички значајна разлика ( $\chi^2 = 12,275$ ;  $p = 0,006$ ) у односу на процентуалну заступљеност CD44/CD166 позитивних ћелија. Болесници са релапсом су у значајно већем броју имали заступљеност CD44/CD166 позитивних ћелија већу од 50%, њих 12 (40%) у односу на једног (3,8%) болесника без релапса. Унутар групе болесника са III стадијумом болести, а између група болесника подељених у односу на релапс, није уочена значајна разлика у односу на процентуалну заступљеност CD44/CD166 позитивних ћелија (Табела 42).

**Табела 42.** Појава релапса у односу на проценат обојености КМЋ са CD44/CD166 антителима код болесника у I и II стадијуму, као и код пацијената у III стадијуму колоректалног карцинома

TNM стадијум болести	Процент CD44/CD166 позитивних ћелија	Релапс Број (%)		$\chi^2$	p
		Не	Да		
I и II стадијум болести	<b>Процент позитивних ћелија</b>			12,275	0,006
	Нема обојених ћелија	2 (7,7)	0 (0,0)		
	До 10% обојених ћелија	13 (50,0)	8 (26,7)		
	10–50% обојених ћелија	10 (38,5)	10 (33,3)		
	Више од 50% обојених ћелија	1 (3,8)	12 (40,0)		
III стадијум болести	<b>Процент позитивних ћелија</b>			2,036	0,565
	Нема обојених ћелија	1 (7,7)	0 (0,0)		
	До 10% обојених ћелија	7 (53,8)	6 (54,5)		
	10–50% обојених ћелија	5 (38,5)	4 (36,4)		
	Више од 50% обојених ћелија	0 (0,0)	1 (9,1)		

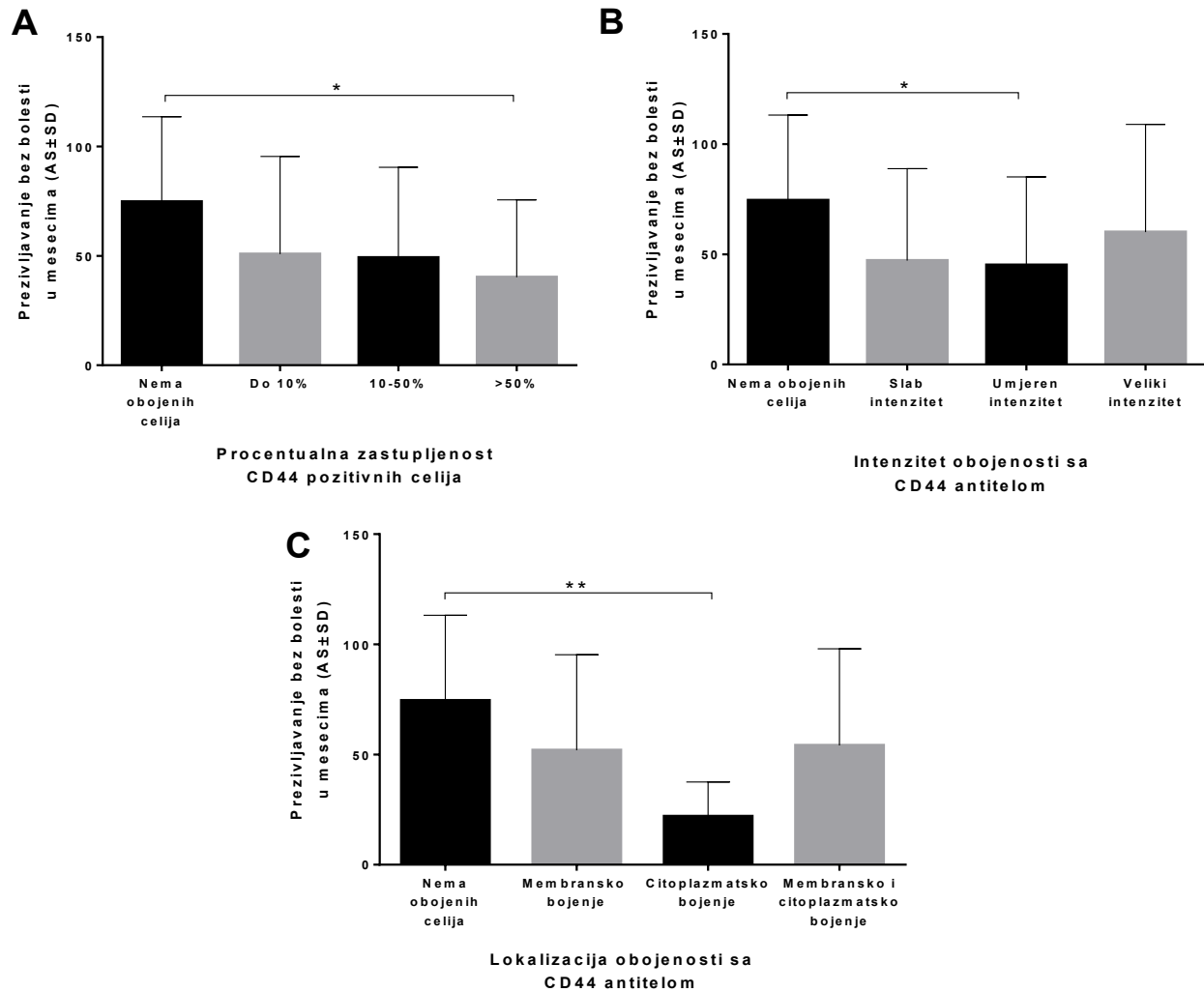
$\chi^2$  – hi хвадрат тест; p – статистичка значајност

#### **4.13 Анализа болесника у односу на период преживљавања без болести**

##### **4.13.1. Анализа просечних вредности преживљавања без болести свих болесника са колоректалним карциномом у односу на процентуалну заступљеност CD44 позитивних ћелија, интензитет и локализацију обојености**

Поређењем просечних вредности преживљавања без болести (*DFS*) између група болесника подељених у категорије према процентуалној заступљености *CD44* позитивних ћелија уочена је статистички значајна разлика ( $p = 0,022$ ). Болесници који нису имали *CD44* позитивне ћелије имали су значајно дужи период преживљавања без болести ( $74,50 \pm 38,67$  месеци) у односу на болеснике који су имали више од 50% *CD44* позитивних ћелија ( $40,19 \pm 35,38$  месеци) (Графикон 7А). Поређењем просечних вредности преживљавања без болести између група болесника подељених у категорије према интензитету обојености ћелија са *CD44* антителим уочена је статистички значајна разлика ( $p = 0,033$ ). Болесници који нису имали *CD44* позитивне ћелије имали су значајно дужи период преживљавања без болести ( $74,50 \pm 38,67$  месеци) у односу на болеснике који су имали *CD44* позитивне ћелије обојене умереним интензитетом ( $45,12 \pm 40,00$  месеци) (Графикон 7Б). Поређењем просечних вредности преживљавања без болести између група болесника подељених у категорије према локализацији обојености ћелија са *CD44* антителим уочена је висока статистички значајна разлика ( $p = 0,002$ ). Болесници који нису имали *CD44* позитивне ћелије имали су значајно дужи период преживљавања без болести ( $74,50 \pm 38,67$  месеци) у односу на болеснике који су имали цитоплазматски обојене *CD44* позитивне ћелије ( $21,92 \pm 15,63$  месеци) (Графикон 7С).



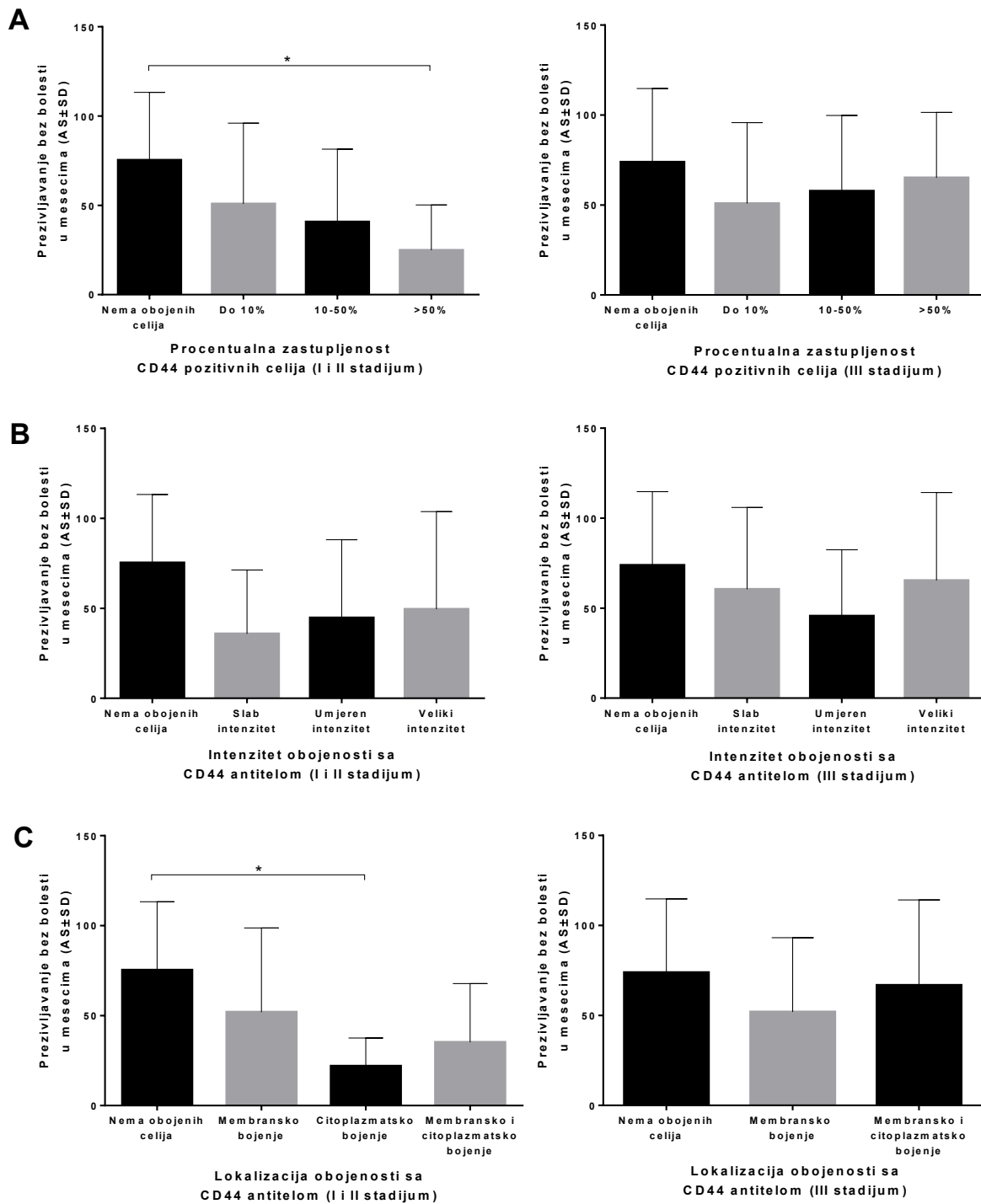


**Графикон 7.** Просечне вредности преживљавања без болести у месецима свих болесника са колоректалним карциномом у односу на (A) процентуалну заступљеност *CD44* позитивних ћелија, (B) интензитет и (C) локализацију обојености

$p < 0,050$ ,  $p < 0,010$ ; Крускал-Волисов тест са *post-hoc* тестирањем

4.13.2. Анализа просечних вредности преживљавања без болести оболелих од КРК према стадијуму болести у односу на процентуалну заступљеност CD44 позитивних ћелија, интензитет и локализацију обојености

Поређењем просечних вредности преживљавања без болести у месецима, унутар групе болесника који су били у I и II стадијуму болести, а између група подељених у категорије према процентуалној заступљености CD44 позитивних ћелија уочена је статистички значајна разлика ( $p = 0,019$ ). Болесници који нису имали CD44 позитивне ћелије имали су значајно дужи период преживљавања без болести ( $75,30 \pm 37,95$  месеци) у односу на болеснике који су имали више од 50% CD44 позитивних ћелија ( $24,84 \pm 25,37$  месеци), док унутар групе болесника са III стадијумом болести значајна разлика у времену преживљавања без болести није уочена (Графикон 8А). Унутар групе са I и II стадијумом, као нити унутар групе са III стадијумом болести, није уочена разлика у просечним вредностима преживљавања без болести у односу на интензитет обојености (Графикон 8В). Такође, унутар групе болесника са I и II стадијумом болести, а између група подељених према локализацији обојености, уочена је значајна разлика ( $p = 0,010$ ). Болесници који нису имали обојене ћелије ( $75,30 \pm 37,95$  месеци) имали су значајно дужи период преживљавања у односу на болеснике чије су ћелије обојене цитоплазматски ( $21,92 \pm 15,63$  месеци), док разлике унутар групе са III стадијумом болести нису уочене (Графикон 8С).



**Графикон 8.** Просечне вредности преживљавања без болести у месецима пацијената у I и II стадијуму, као и у III стадијуму колоректалног карцинома у односу на (A) процентуалну заступљеност CD44 позитивних ћелија, (B) интензитет и (C) локализацију обојености

$p < 0,050$ ,  $p < 0,010$ ; Крускал-Волисов тест са *post-hoc* тестирањем

4.13.3. Анализа просечних вредности преживљавања без болести болесника након операције колоректалног карцинома у односу на категорије подељене према проценту, локализацији и интензитету обојености ћелија са *Lgr5* антителиом

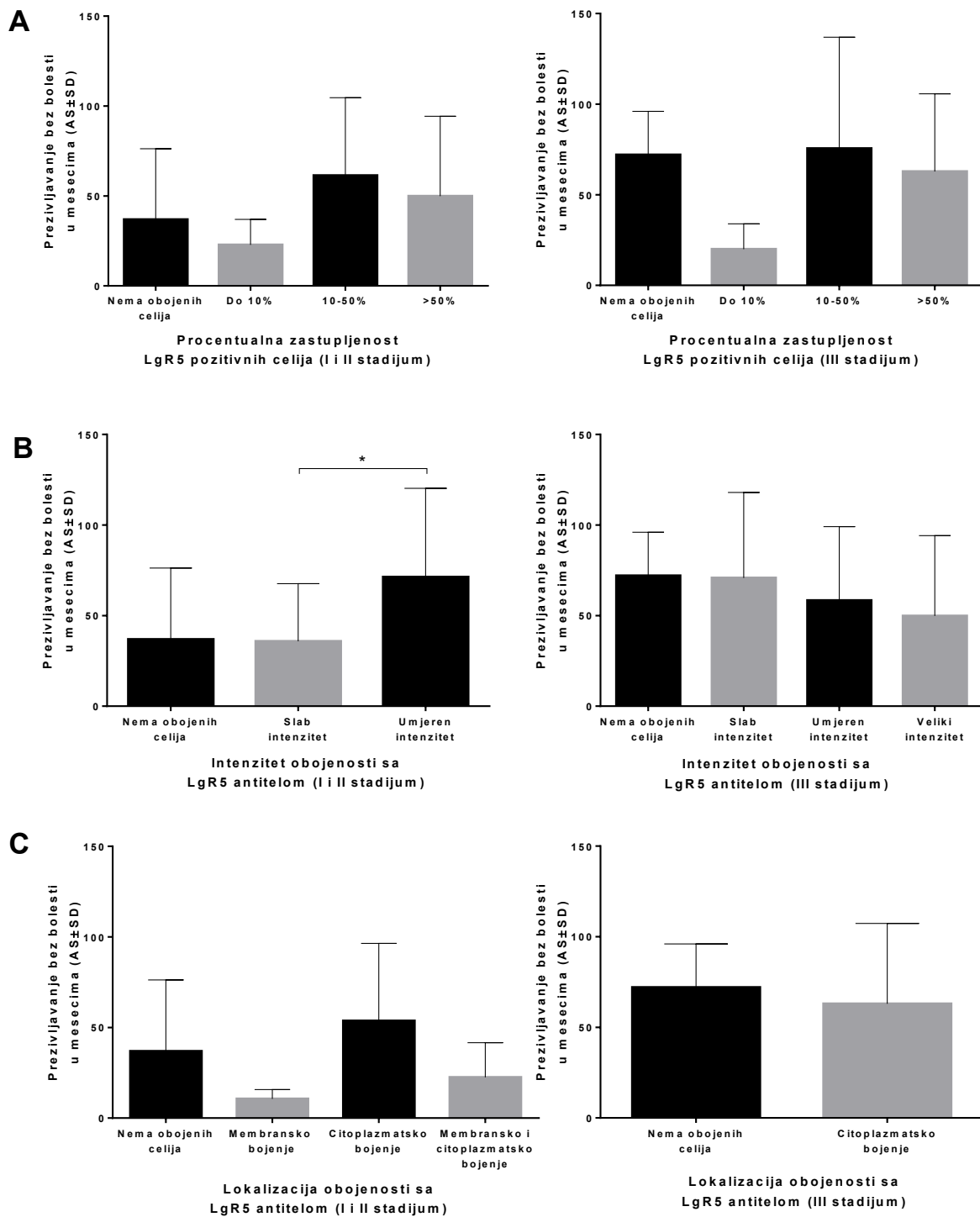
Табела 43 показује просечне вредности преживљавања без болести у месецима болесника након операције колоректалног карцинома у односу на категорије подељене према процентуалној заступљености КМЋ обојених са *Lgr5*, интензитету и локализацији обојености. Једнофакторска анализа варијансе је показала да између поменутих категорија болесника није уочена статистички значајна разлика у просечним вредностима преживљавања без болести у месецима након примене Турки пост-хок (*Turkey post-hoc*) тестирања (Табела 43).

**Табела 43.** Просечне вредности преживљавања без болести у месецима болесника након операције колоректалног карцинома у односу на категорије подељене према проценту, локализацији и интензитету обојености ћелија са *Lgr5* антителиом. (\**AS* – аритметичка средина; *SD* – стандардна девијација; *p* – статистичка значајност; *F* – једнофакторска анализа варијансе (*ANOVA*) са *Tukey post-hoc* тестирањем)

Процент <i>LgR5</i> позитивних ћелија, интензитет и локализација обојености	Преживљавање без болести у месецима <i>AS</i> ± <i>SD</i>	<i>F</i>	<i>p</i>
<b>Процент позитивних ћелија</b> Нема обојених ћелија До 10% обојених ћелија 10–50% обојених ћелија Више од 50% обојених ћелија	41,25 ± 38,52 22,50 ± 13,13 64,93 ± 46,55 56,66 ± 43,74	2,161	0,098
<b>Интензитет обојености</b> Нема обојених ћелија Слаб интензитет обојености Умерен интензитет обојености Велики интензитет обојености	41,25 ± 38,52 49,12 ± 41,62 66,13 ± 45,59 49,85 ± 44,31	1,274	0,288
<b>Локализација обојености</b> Нема обојених ћелија Мембранско бојење Цитоплазматско бојење Мембранско и цитоплазматско бојење	41,25 ± 38,52 10,75 ± 5,12 58,03 ± 43,51 22,50 ± 19,09	2,259	0,087

4.13.4. Анализа просечних вредности преживљавања без болести оболелих од КРК према стадијуму болести у односу на процентуалну заступљеност *Lgr5* позитивних ћелија, интензитет и локализацију обојености

Унутар групе болесника са I и II стадијумом, као нити унутар групе са III стадијумом болести није уочена разлика у просечним вредностима преживљавања без болести у односу на процентуалну заступљеност *Lgr5* позитивних ћелија и локализацију обојености (Графикон 9А, С), међутим уочено је да унутар групе болесника са I и II стадијумом болести они болесници код којих је интензитет обојености био умерен имали су статистички значајно ( $p = 0,011$ ) дуже преживљавање без болести ( $71,33 \pm 48,97$  месеци) у односу на групу болесника чије су ћелије биле благо обојене ( $35,80 \pm 31,86$  месеци), док унутар групе болесника са III стадијумом ова разлика није уочена (Графикон 9В).



**Графикон 9.** Просечне вредности преживљавања без болести у месецима болесника у I и II стадијуму, као и у III стадијуму колоректалног карцинома у односу на (A) процентуалну заступљеност *Lgr5* позитивних ћелија, (B) интензитет и (C) локализацију обојености

$p < 0,050$ ; Крускал-Волисов тест са *post-hoc* тестирањем

4.13.5. Анализа просечних вредности преживљавања болесника без болести након операције колоректалног карцинома у односу на категорије подељене према проценту, локализацији и интензитету обојености ћелија са CD166 антителима

Табела 44 показује просечне вредности преживљавања болесника без болести у месецима након операције колоректалног карцинома у односу на категорије подељене према процентуалној заступљености КМћ обојених са CD166, интензитету и локализацији обојености. Између поменутих категорија болесника није уочена статистички значајна разлика у просечним вредностима преживљавања без болести у месецима након примене Крускал-Волис тестирања са додатном *post-hoc* анализом.

**Табела 44.** Просечне вредности преживљавања болесника без болести у месецима након операције колоректалног карцинома у односу на категорије подељене према проценту, локализацији и интензитету обојености ћелија са CD166 антителима

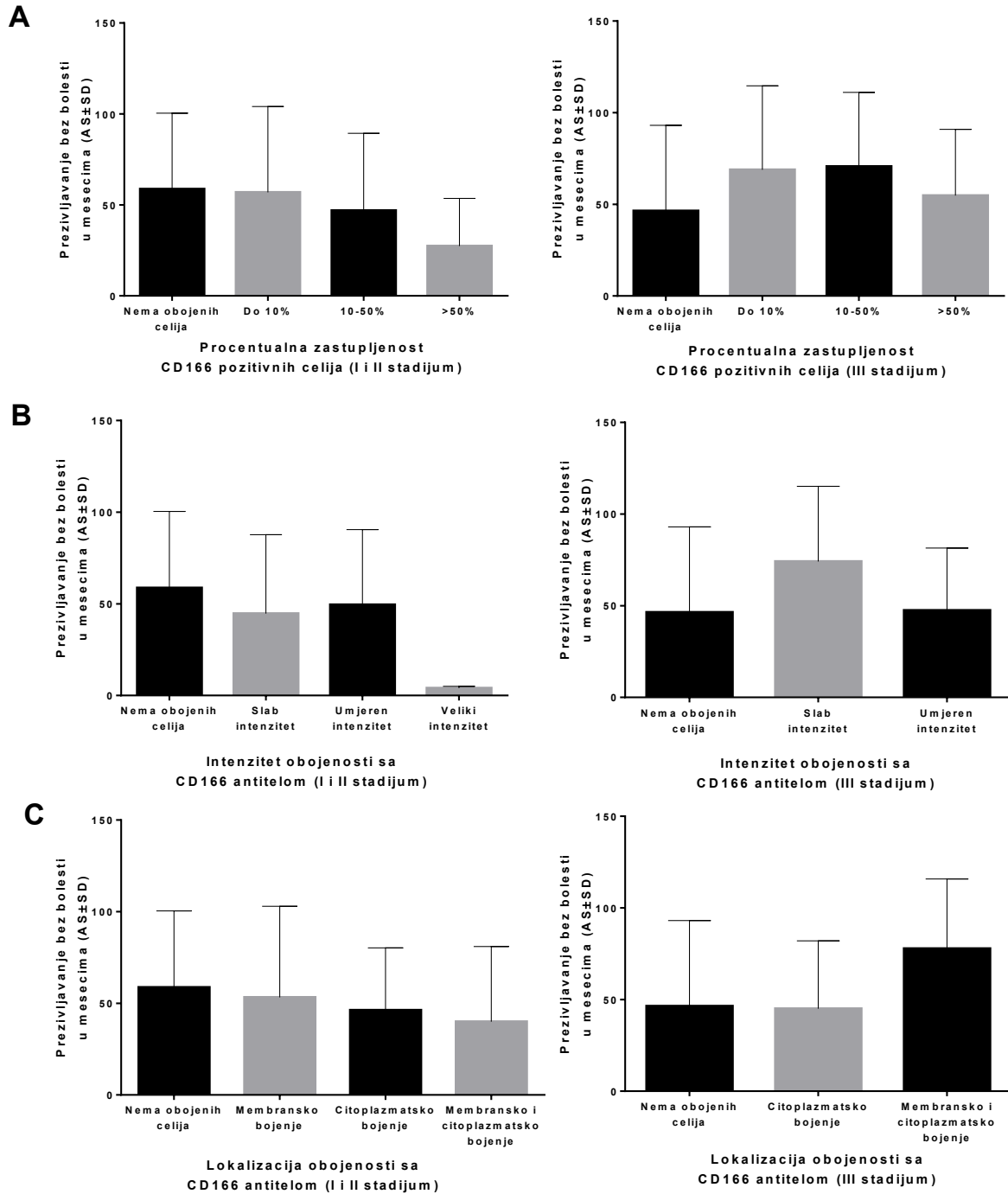
Процент CD166 позитивних ћелија, интензитет и локализација обојености	Преживљавање без болести у месецима AS ± SD	Z	p
Процент позитивних ћелија Нема обојених ћелија До 10% обојених ћелија 10–50% обојених ћелија Више од 50% обојених ћелија	53,09 ± 42,25 60,76 ± 46,09 51,96 ± 42,50 35,93 ± 31,26	2,212	0,530
Интензитет обојености Нема обојених ћелија Слаб интензитет обојености Умерен интензитет обојености Велики интензитет обојености	53,09 ± 42,25 54,27 ± 44,13 39,32 ± 7,43 4,00 ± 2,13	2,806	0,423
Локализација обојености Нема обојених ћелија Мембранско бојење Цитоплазматско бојење Мембранско и цитоплазматско бојење	53,09 ± 42,25 53,25 ± 49,70 45,85 ± 34,10 54,18 ± 43,69	0,346	0,951

AS – аритметичка средина; SD – стандардна девијација; p – статистичка значајност; Z – Крускал-Волисов тест са *post-hoc* тестирањем

4.13.6. Анализа просечних вредности преживљавања без болести оболелих од КРК према стадијуму болести у односу на процентуалну заступљеност CD166 позитивних ћелија, интензитет и локализацију обојености

Унутар група болесника са I и II стадијумом, као нити унутар групе са III стадијумом болести, није уочена статистички значајна разлика у просечним вредностима преживљавања без болести у месецима у односу на процентуалну заступљеност CD166 позитивних ћелија, њихов интензитет обојености или локализацију обојености (Графикон 10).



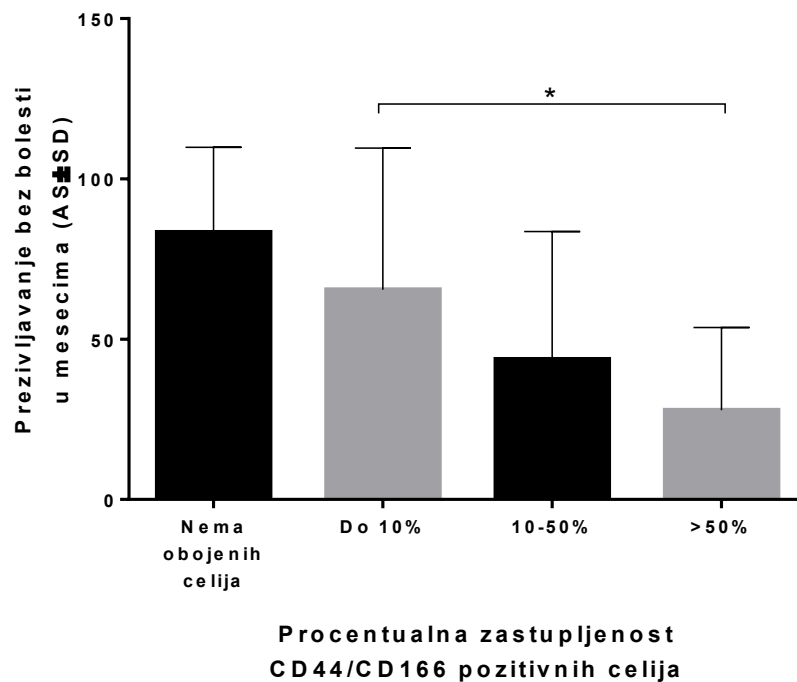


**Графикон 10.** Просечне вредности преживљавања без болести у месецима болесника у I и II стадијуму, као и у III стадијуму колоректалног карцинома у односу на (A) процентуалну заступљеност *CD166* позитивних ћелија, (B) интензитет и (C) локализацију обојености.

$p < 0,050$ ; Крускал-Волисов тест са *post-hoc* тестирањем

#### 4.13.7. Анализа просечних вредности преживљавања без болести свих болесника са колоректалним карциномом у односу на процентуалну заступљеност CD44/CD166 позитивних ћелија

Поређењем просечних вредности преживљавања без болести између група болесника подељених у категорије према процентуалној заступљености CD44/CD166 позитивних ћелија уочена је статистички значајна разлика ( $p = 0,041$ ). Болесници који су имали до 10% CD44/CD166 позитивних ћелија имали су значајно дужи период преживљавања без болести ( $65,44 \pm 44,20$  месеци) у односу на болеснике који су имали више од 50% CD44/CD166 позитивних ћелија ( $27,85 \pm 25,77$  месеци) (Графикон 11).

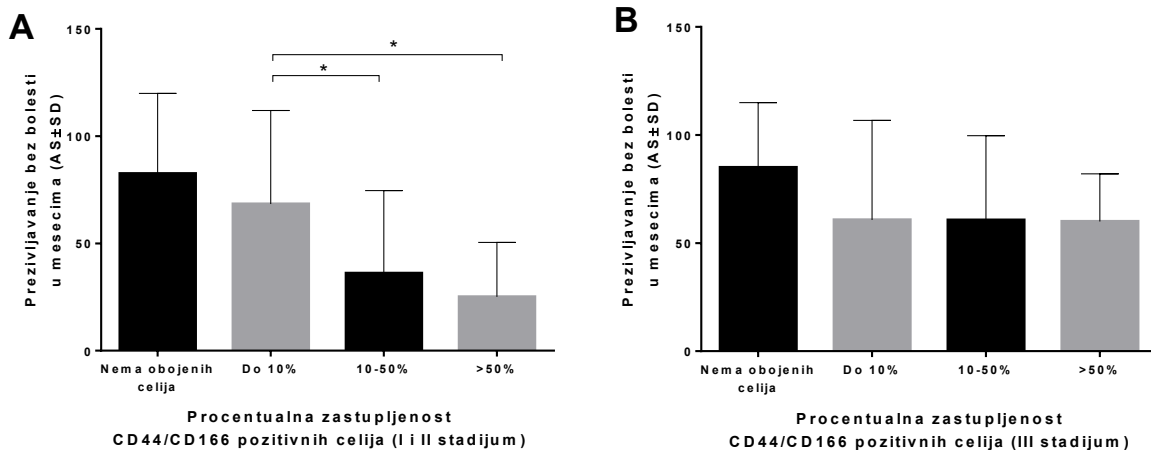


Графикон 11. Просечне вредности преживљавања без болести у месецима свих болесника са колоректалним карциномом у односу на процентуалну заступљеност CD44/CD166 позитивних ћелија

$p < 0,050$ ; Крускал-Волисов тест са *post-hoc* тестирањем

#### 4.13.8. Анализа просечних вредности преживљавања без болести оболелих од КРК према стадијуму болести у односу на процентуалну заступљеност *CD166* позитивних ћелија

Унутар групе болесника са I и II стадијумом болести уочена је статистички значајна разлика у просечним вредностима дужине преживљавања без болести у месецима између група болесника подељених према процентуалној заступљености *CD44/CD166* позитивних ћелија (Графикон 12А), док разлика унутар групе са III стадијумом болести није уочена (Графикон 12Б). Болесници са I и II стадијумом болести чији је проценат *CD44/CD166* позитивних ћелија мањи од 10% имају значајно дуже преживљавање у ( $68,33 \pm 43,65$  месеци) у односу на болеснике који су имали већи проценат позитивних ћелија, 10–50% ( $36,10 \pm 38,53$  месеци) ( $p = 0,043$ ) и више од 50% ( $25,38 \pm 25,04$  месеци) ( $p = 0,012$ ) (Графикон 12А).



**Графикон 12.** Просечне вредности преживљавања без болести у месецима болесника у (А) I и II стадијуму, као и у (Б) III стадијуму колоректалног карцинома у односу на процентуалну заступљеност *CD166* позитивних ћелија

$p < 0,050$ ; Крускал-Волисов тест са *post-hoc* тестирањем

**4.14. Анализа болесника умрлих од релапса болести**

Табела 45 показује просечне вредности преживљавања болесника у месецима, који су умрли од последица релапса болести (*DSS – disease specific survival* или *DOD – died of disease*) (укупно 50 болесника), након операције колоректалног карцинома у односу на категорије подељене према процентуалној заступљености КМТ обојених са *CD44*, интензитету и локализацији обојености. Између поменутих категорија болесника није уочена статистички значајна разлика у просечним вредностима *DSS* у месецима након примене Крускал-Валисовог тестирања са додатном пост-хок анализом (Табела 45).

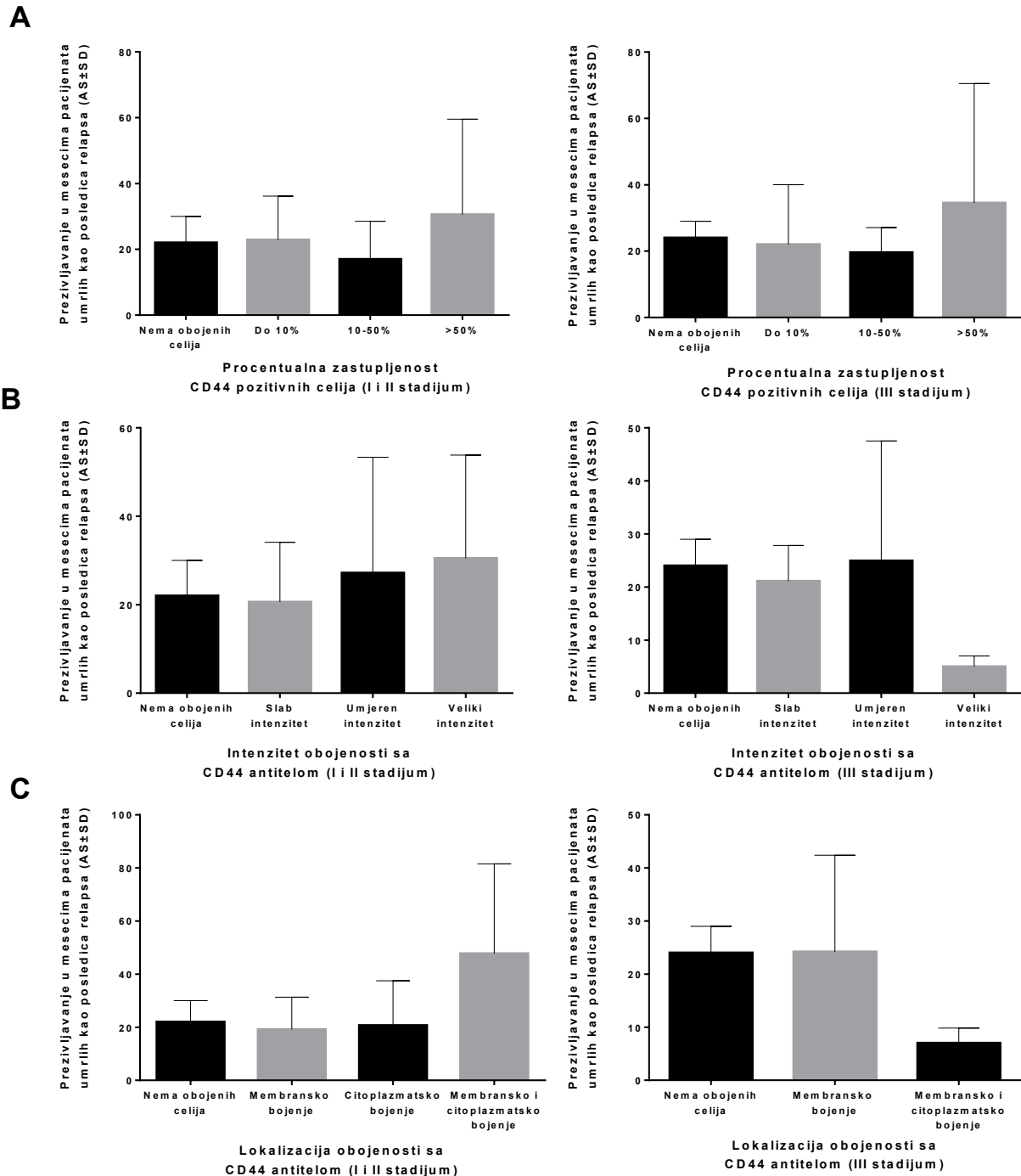
**Табела 45.** Просечне вредности преживљавања у месецима болесника умрлих од последица релапса након операције колоректалног карцинома у односу на категорије подељене према проценту, локализацији и интензитету обојености ћелија са *CD44* антителимом

Процент <i>CD44</i> позитивних ћелија, интензитет и локализација обојености	Преживљавање у месецима болесника умрлих од последица релапса $AS \pm SD$	Z	p
Процент позитивних ћелија Нема обојених ћелија До 10% обојених ћелија 10–50% обојених ћелија Више од 50% обојених ћелија	23,60 ± 4,39 22,37 ± 16,67 18,30 ± 9,26 31,27 ± 28,45	1,388	0,708
Интензитет обојености Нема обојених ћелија Слаб интензитет обојености Умерен интензитет обојености Велики интензитет обојености	23,60 ± 4,39 20,83 ± 10,72 25,95 ± 23,78 22,00 ± 22,11	0,674	0,879
Локализација обојености Нема обојених ћелија Мембранско бојење Цитоплазматско бојење Мембранско и цитоплазматско бојење	23,60 ± 4,39 22,31 ± 16,17 20,71 ± 16,79 34,16 ± 33,59	1,411	0,703

*AS* – аритметичка средина; *SD* – стандардна девијација; *p* – статистичка значајност *Z* – Крускал-Волисов тест са *post-hoc* тестирањем

4.14.1. Анализа просечних вредности преживљавања оболелих од КРК према стадијуму болести у односу на процентуалну заступљеност CD44 позитивних ћелија, интензитет и локализацију обојености

Унутар групе болесника са I и II стадијумом, као нити унутар групе са III стадијумом болести није уочена статистички значајна разлика у просечним вредностима преживљавања болесника умрлих као последица релапса у односу на процентуалну заступљеност CD44 позитивних ћелија, њихов интензитет обојености или локализацију обојености (Графикон 13).



**Графикон 13.** Просечне вредности преживљавања у месецима болесника умрлих од последица релапса у I и II стадијуму, као и у III стадијуму колоректалног карцинома у односу на (A) процентуалну заступљеност CD44 позитивних ћелија, (B) интензитет и (C) локализацију обојености

$p < 0,050$ ; Крускал-Волисов тест са *post-hoc* тестирањем

Табела 46 показује просечне вредности преживљавања болесника у месецима, који су умрли од последица релапса болести, након операције колоректалног карцинома у односу на категорије подељене према процентуалној заступљености КМЋ обојених са *Lgr5*, интензитету и локализацији обојености. Од укупно 50 болесника који су умрли као последица релапса колоректалног карцинома бојење са *Lgr5* рађено је код 42 болесника. Између поменутих категорија болесника није уочена статистички значајна разлика у просечним вредностима *DSS* у месецима након примене Крускал-Волисовог тестирања са додатном *post-hoc* анализом (Табела 46).

**Табела 46.** Просечне вредности преживљавања у месецима пацијената умрлих као последица релапса након операције колоректалног карцинома у односу на категорије подељене према проценту, локализацији и интензитету обојености ћелија са *Lgr5* антителом.

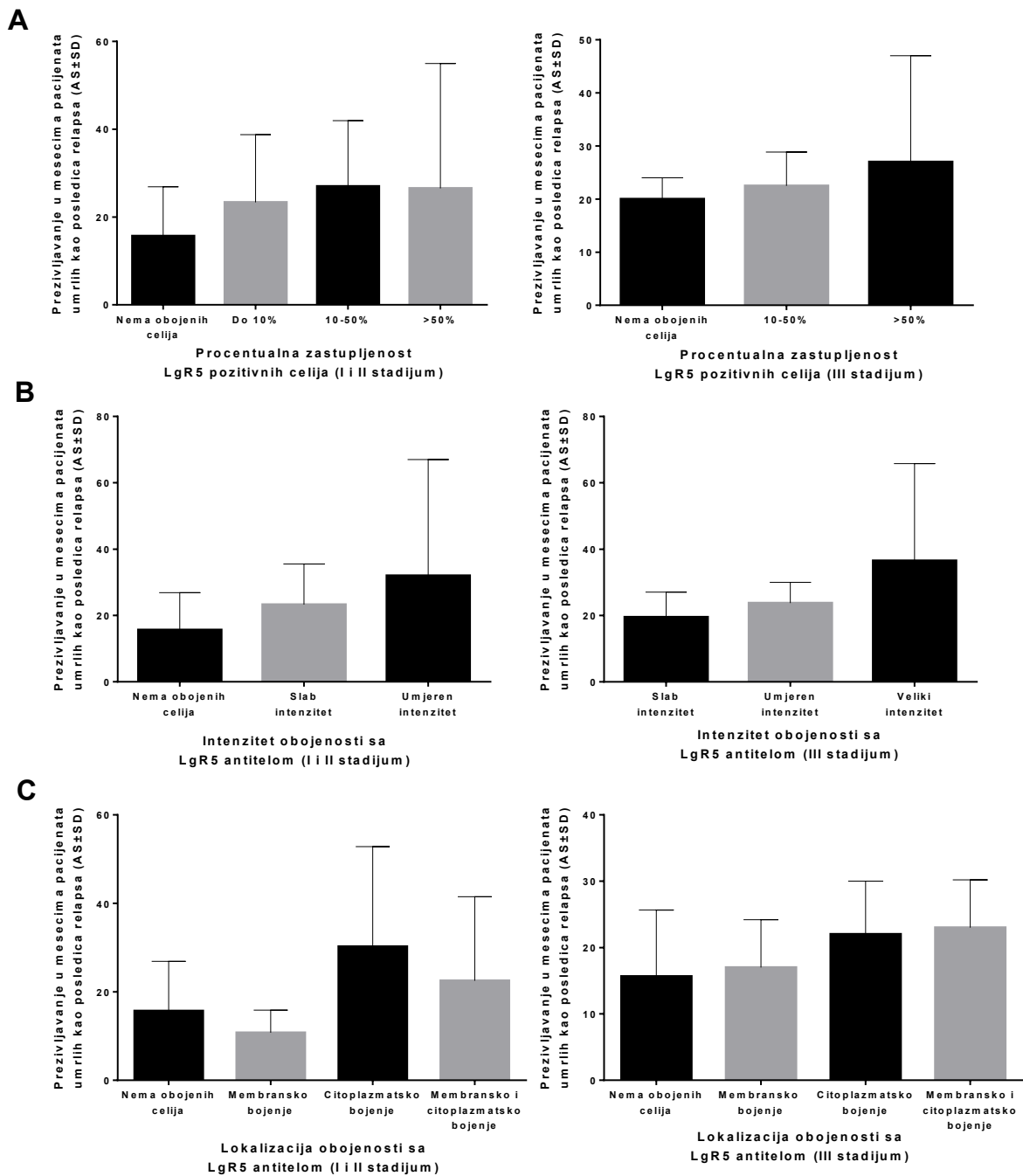
Процент <i>Lgr5</i> позитивних ћелија, интензитет и локализација обојености	Преживљавање у месецима болесника умрлих као последица релапса AS±SD	Z	p
<b>Процент позитивних ћелија</b> Нема обојених ћелија До 10% обојених ћелија 10–50% обојених ћелија Више од 50% обојених ћелија	15,66 ± 11,23 22,85 ± 14,14 25,87 ± 13,04 26,83 ± 23,00	1,216	0,749
<b>Интезитет обојености</b> Нема обојених ћелија Слаб интензитет обојености Умерен интензитет обојености Велики интензитет обојености	15,66 ± 11,23 21,95 ± 10,84 28,70 ± 27,22 36,50±29,28	1,516	0,679
<b>Локализација обојености</b> Нема обојених ћелија Мембранско бојење Цитоплазматско бојење Мембранско и цитоплазматско бојење	15,66 ± 11,23 10,75 ± 5,12 27,96 ± 20,25 22,50 ± 19,09	6,096	0,107

AS – аритметичка средина; SD – стандардна девијација; p – статистичка значајност Z – Крускал-Волисов тест са *post-hoc* тестирањем

4.14.2. Анализа просечних вредности преживљавања оболелих од КРК према стадијуму болести у односу на процентуалну заступљеност *Lgr5* позитивних ћелија, интензитет и локализацију обојености

Унутар групе болесника са I и II стадијумом, као нити унутар групе са III стадијумом болести није уочена статистички значајна разлика у просечним вредностима преживљавања болесника умрлих од последица релапса у односу на процентуалну заступљеност *Lgr5* позитивних ћелија, њихов интензитет обојености или локализацију обојености (Графикон 14).





Графикон 14. Просечне вредности преживљавања у месецима болесника умрлих од последица релапса у I и II стадијуму, као и у III стадијуму колоректалног карцинома у односу на (A) процентуалну заступљеност *Lgr5* позитивних ћелија, (B) интензитет и (C) локализацију обојености

$p < 0,050$ ; Крускал-Волисов тест са *post-hoc* тестирањем

4.14.3. Анализа просечних вредности преживљавања умрлих као последица релапса болести након операције колоректалног карцинома у односу на категорије подељене према проценту, локализацији и интензитету обојености ћелија са *CD166* антителима

Табела 47 показује просечне вредности преживљавања болесника у месецима, који су умрли као последица релапса болести након операције колоректалног карцинома у односу на категорије подељене према процентуалној заступљености КМЋ обојених са *CD166*, интензитету и локализацији обојености. Од укупно 50 болесника који су умрли од последица релапса колоректалног карцинома бојење са *CD166* рађено је код 33 болесника. Између поменутих категорија болесника није уочена статистички значајна разлика у просечним вредностима *DSS* у месецима након примене Крускал-Волисовог тестирања са додатном *post-hoc* анализом (Табела 47).

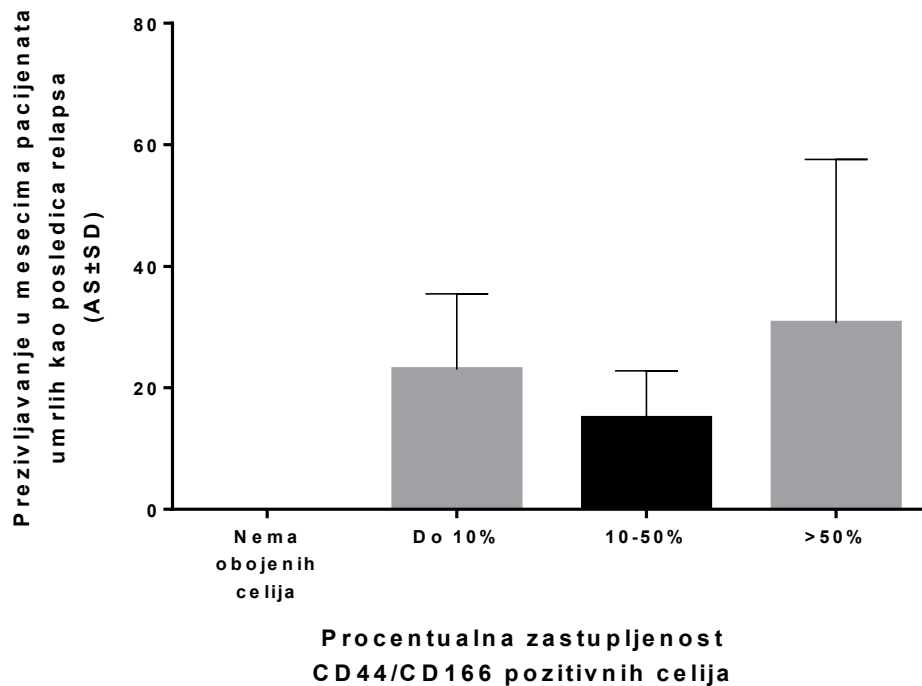
**Табела 47.** Просечне вредности преживљавања у месецима болесника умрлих од последица релапса након операције колоректалног карцинома у односу на категорије подељене према проценту, локализацији и интензитету обојености ћелија са *CD166* антителиом

Процент <i>CD166</i> позитивних ћелија, интензитет и локализација обојености	Преживљавање у месецима пацијената умрлих од последица релапса AS ± SD	Z	p
<b>Процент позитивних ћелија</b> Нема обојених ћелија До 10% обојених ћелија 10–50% обојених ћелија Више од 50% обојених ћелија	19,60 ± 15,53 21,87 ± 12,91 16,44 ± 9,28 32,54 ± 26,78	3,250	0,355
<b>Интензитет обојености</b> Нема обојених ћелија Слаб интензитет обојености Умерен интензитет обојености Велики интензитет обојености	19,60 ± 15,53 22,78 ± 22,95 27,53 ± 15,68 4,00±1,23	6,294	0,098
<b>Локализација обојености</b> Нема обојених ћелија Мембранско бојење Цитоплазматско бојење Мембранско и цитоплазматско бојење	19,60 ± 15,53 12,66 ± 10,11 31,90 ± 26,95 23,09 ± 10,66	5,757	0,124

AS – аритметичка средина; SD – стандардна девијација; p – статистичка значајност Z – Крускал-Волисов тест са *post-hoc* тестирањем

#### 4.14.4. Анализа просечних вредности преживљавања свих који су умрли од релапса болести у односу на процентуалну заступљеност *CD44/CD166* позитивних ћелија

Поређењем просечних вредности преживљавања у месецима умрлих од последица релапса између група болесника подељених у категорије према процентуалној заступљености *CD44/CD166* позитивних ћелија није уочена статистички значајна разлика (Графикон 15).



Графикон 15. Просечне вредности преживљавања у месецима свих болесника који су умрли од релапса у односу на процентуалну заступљеност *CD44/CD166* позитивних ћелија ( $Z = 3,004$ ;  $p = 0,223$ ).

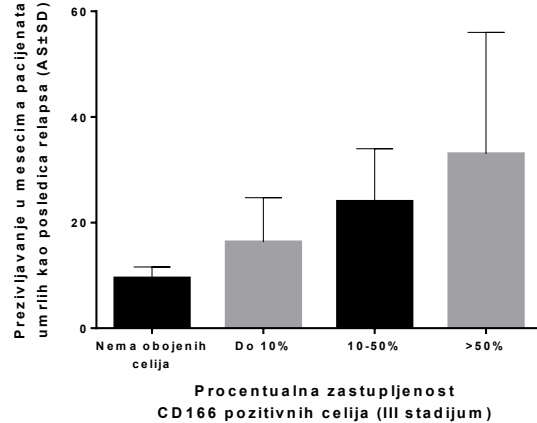
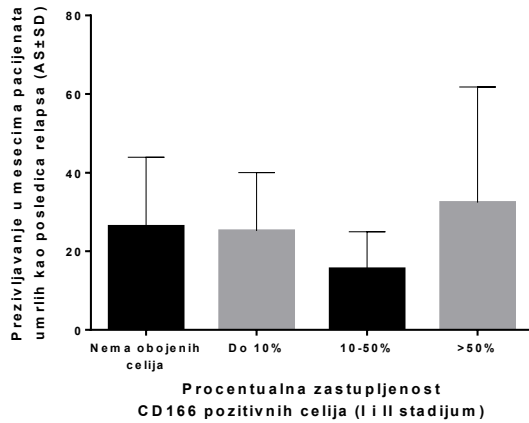
$Z$  – Крускал-Волисов тест са *post-hoc* тестирањем;  $p$  – статистичка значајност

#### **4.15. Анализа просечног преживљавања и свеукупног преживљавања болесника**

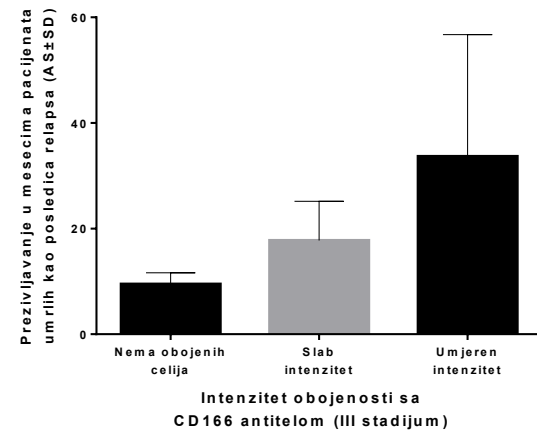
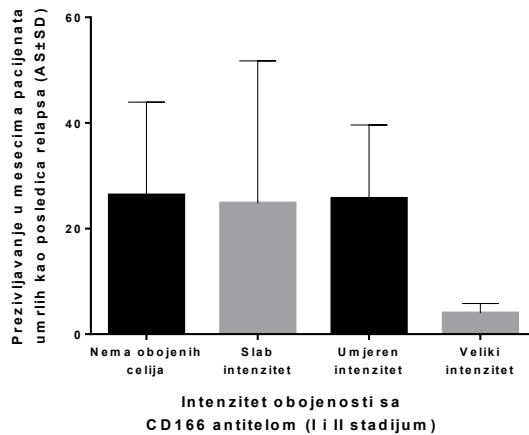
##### **4.15.1. Анализа просечних вредности преживљавања умрлих као последица релапса болести према стадијуму болести у односу на процентуалну заступљеност CD44/CD166 позитивних ћелија, интензитет и локализацију обојености**

Унутар групе болесника са I и II стадијумом, као нити унутар групе са III стадијумом болести, није уочена статистички значајна разлика у просечним вредностима преживљавања болесника умрлих од последица релапса у односу на процентуалну заступљеност CD166 позитивних ћелија, њихов интензитет обојености или локализацију обојености (Графикон 16).

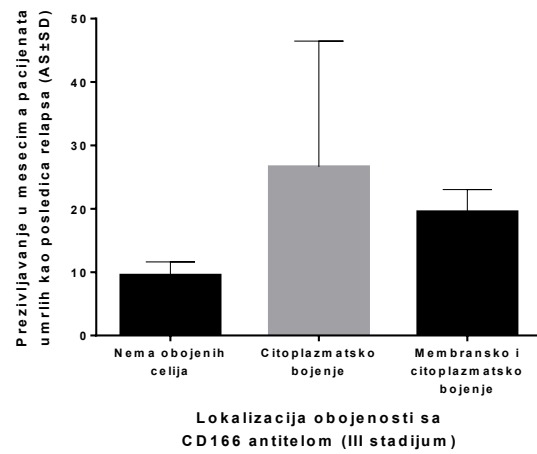
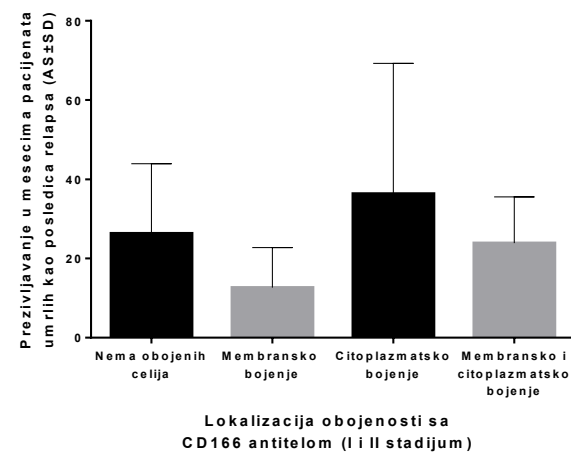
**A**



**B**



**C**

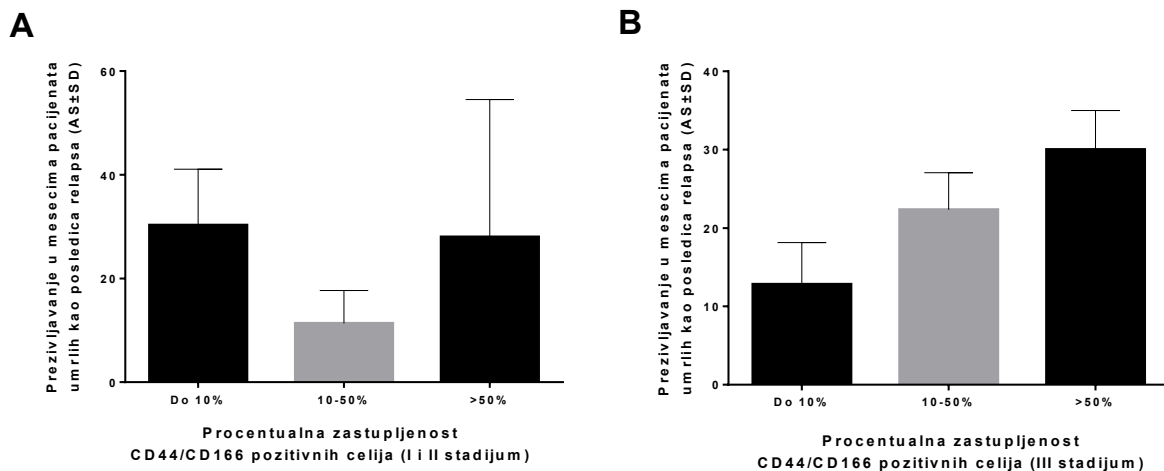


**Графикон 16.** Просечне вредности преживљавања у месецима болесника умрлих од последица релапса у I и II стадијуму, као и у III стадијуму, колоректалног карцинома у односу на (A) процентуалну заступљеност *CD44/CD166* позитивних ћелија, (B) интензитет и (C) локализацију обојености

$p < 0,050$ ; Z – Крускал-Волисов тест са *post-hoc* тестирањем

#### 4.15.2. Анализа просечних вредности преживљавања умрлих као последица релапса болести према стадијуму болести у односу на процентуалну заступљеност CD44/CD166 позитивних ћелија

Унутар групе болесника са I и II стадијумом, као нити унутар групе са III стадијумом болести, није уочена статистички значајна разлика у просечним вредностима преживљавања болесника умрлих од последица релапса у односу на процентуалну заступљеност CD44/CD166 позитивних ћелија (Графикон 17).



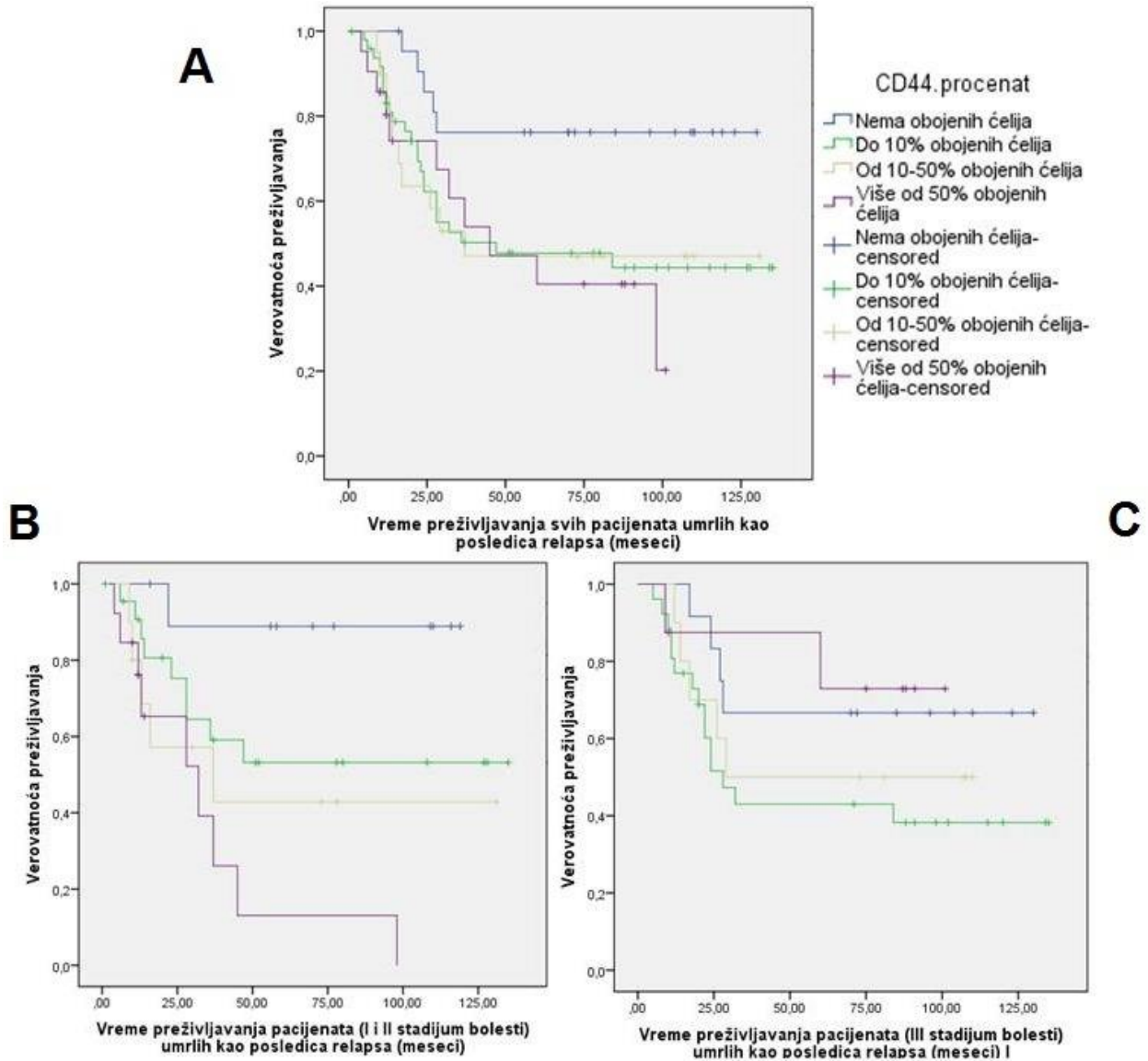
**Графикон 17.** Просечне вредности преживљавања у месецима болесника умрлих од последица релапса у (А) I и II стадијуму, као и у (Б) III стадијуму, колоректалног карцинома у односу на процентуалну заступљеност CD44/CD166 позитивних ћелија

$p < 0,050$ ; Z – Крускал-Волисов тест са *post-hoc* тестирањем

4.15.3. Анализа времена преживљавања оболелих од КРК који су умрли као последица релапса болести у групи свих болесника као и приликом поделе на стадијуме болести у односу на процентуалну заступљеност CD44 позитивних ћелија

Графикон 18 приказује Каплан-Мајерове криве вероватноће преживљавања у односу на групе болесника подељене према процентуалној заступљености CD44 позитивних ћелија. У групи свих болесника (А) између група болесника није уочена статистички значајна разлика у кривама вероватноће, као нити унутар групе (С) пацијената са III стадијумом болести. Међутим, унутар групе болесника са I и II стадијумом болести утврђено је да постоји статистички значајна разлика, идентификована како на почетку (*Breslow* = 9,106;  $p=0,028$ ), средини (*Tarone-Ware* = 10,525;  $p = 0,015$ ) и касније у времену (*Log Rank* = 12,515;  $p = 0,006$ ), при чему болесници са више од 50% обојених ћелија имају значајно нижу вероватноћу преживљавања (најраније су умирали) у односу на групу са 10-50% и мање од 10% позитивних ћелија, док је вероватноћа преживљавања највећа код болесника који немају обојене ћелије (Графикон 18).

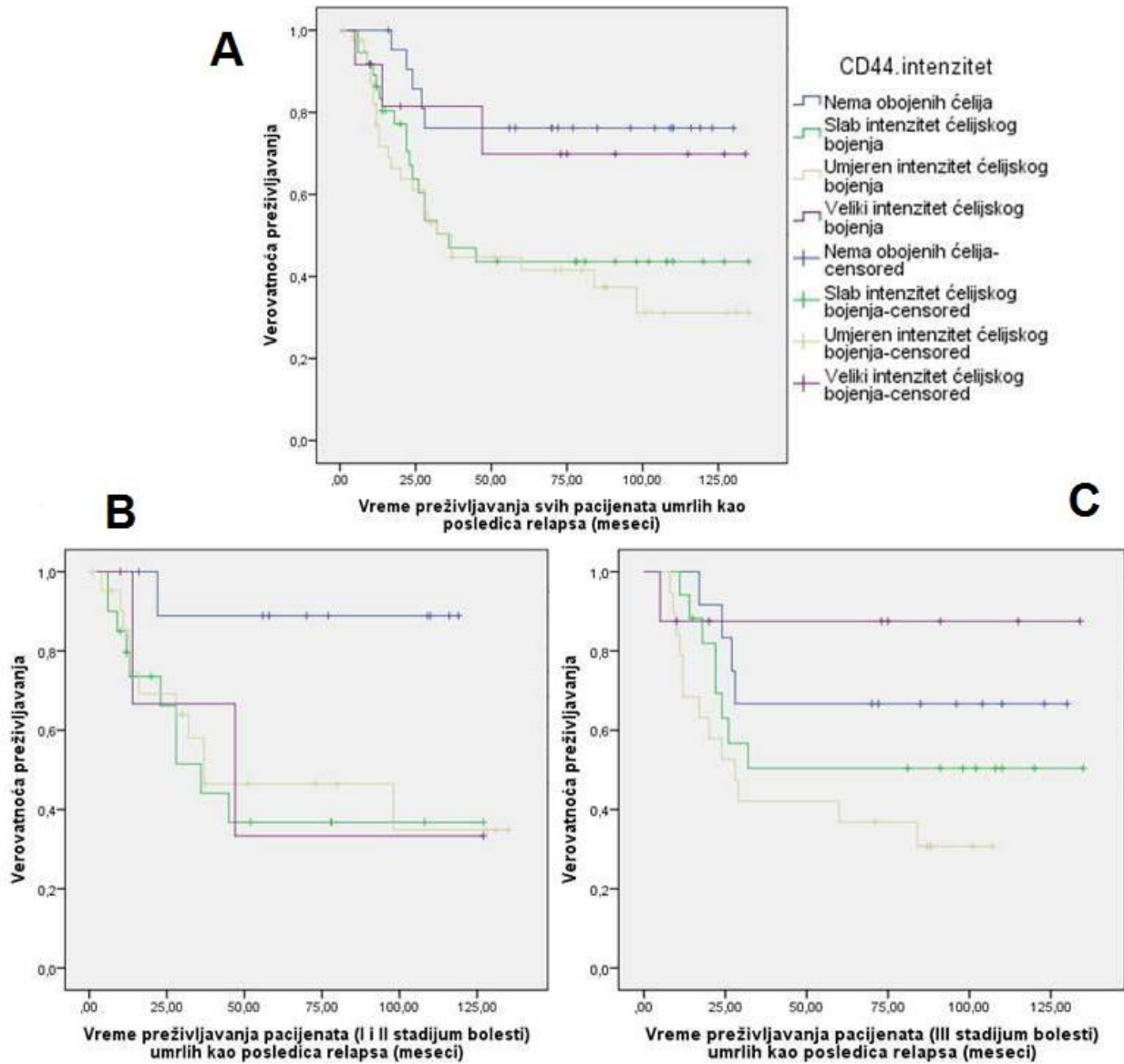




**Графикон 18.** Анализа времена преживљавања (А) свих болесника са колоректалним карциномом, (В) болесника са I и II стадијумом и (С) болесника са III стадијумом болести који су умрли као последица релапса (Каплан-Мајер) у односу на процентуалну заступљеност CD44 позитивних ћелија

4.15.4. Анализа времена преживљавања оболелих од КРК који су умрли као последица релапса болести у групи свих болесника као и приликом поделе на стадијуме болести у односу на интензитет обојености ћелија са CD44 антителиом

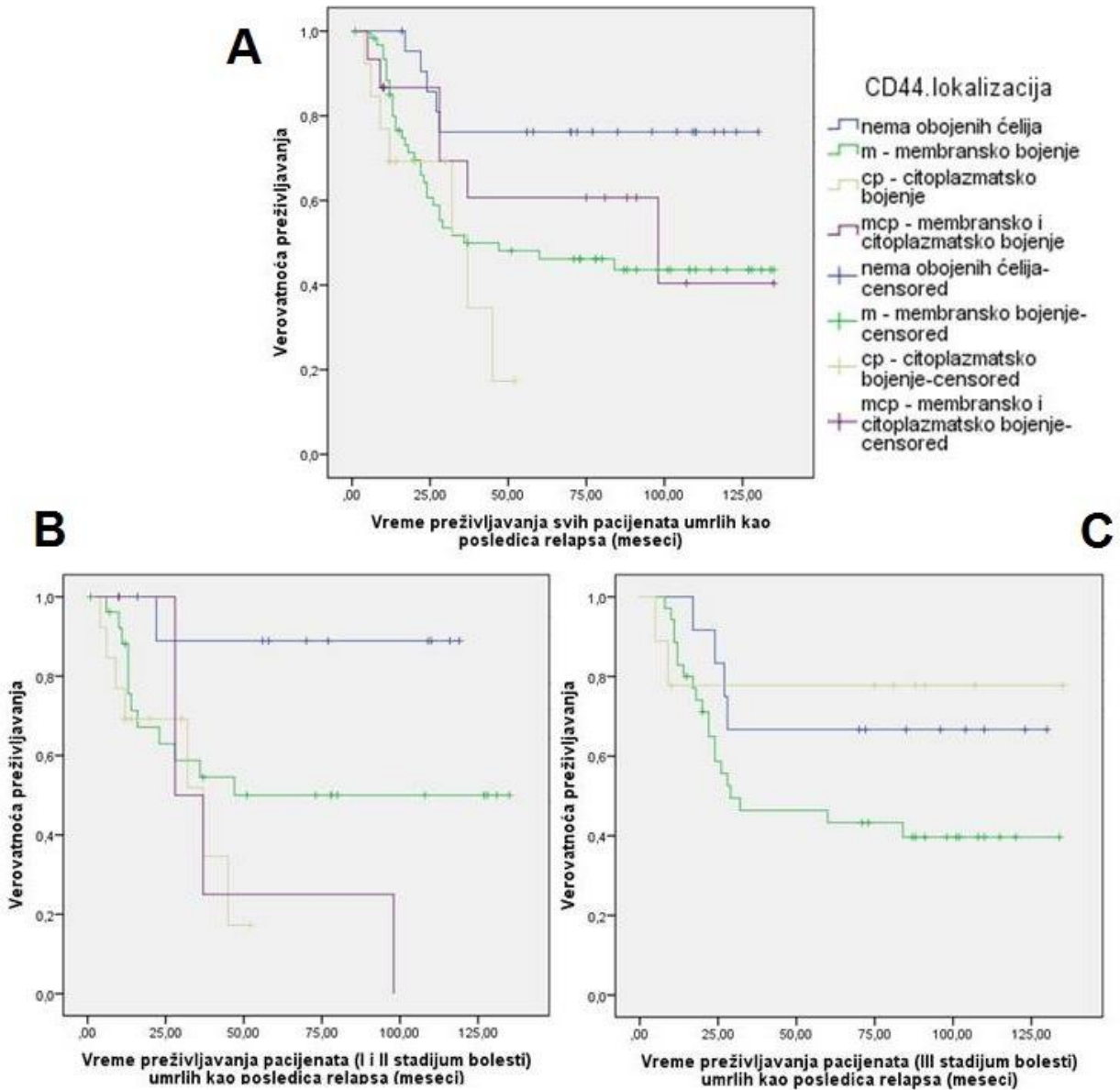
У групи свих болесника (А) између група болесника подељених према интензитету обојености са CD44 антителиом уочена је статистички значајна разлика у кривама вероватноће преживљавања. Разлика је идентификована како на почетку (*Breslow* = 8,889;  $p = 0,031$ ), средини (*Tarone-Ware* = 9,288;  $p = 0,026$ ) и касније у времену (*Log Rank* = 9,683;  $p = 0,021$ ), при чему болесници са умерено обојеним ћелијама имају значајно нижу вероватноћу преживљавања (најраније су умирали) у односу на групу са slabим и великим интензитетом, док је вероватноћа преживљавања највећа код болесника који немају обојене ћелије. Унутар група болесника подељених у односу на стадијум (B и C) није уочена статистички значајна разлика у кривама вероватноће преживљавања (Графикон 19).



**Графикон 19.** Анализа времена преживљавања (А) свих болесника са колоректалним карциномом, (В) болесника са I и II стадијумом и (С) пацијената са III стадијумом болести који су умрли као последица релапса (Каплан-Мајер) у односу на интензитет обојености ћелија са *CD44* антителимом

4.15.5. Анализа времена преживљавања оболелих од КРК који су умрли као последица релапса болести у групи свих болесника као и приликом поделе на стадијуме болести у односу на локализацију обојености ћелија са CD44 антителиом

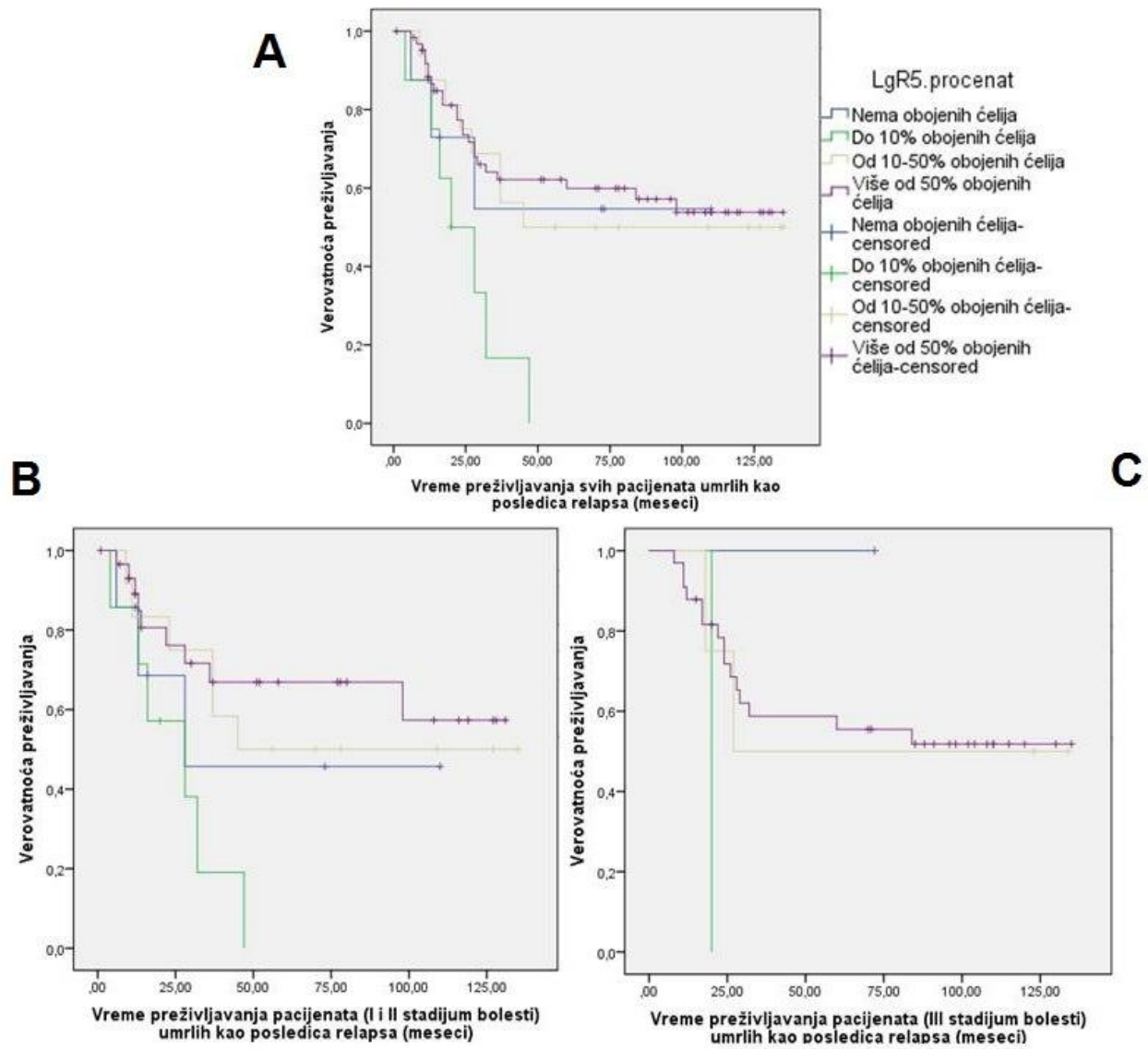
У групи свих болесника (А) између група болесника подељених према локализацији обојености са CD44 антителиом уочена је статистички значајна разлика у кривама вероватноће преживљавања. Разлика је идентификована како на почетку (*Breslow* = 8,517;  $p = 0,036$ ), средини (*Tarone-Ware* = 8,628;  $p = 0,035$ ) и касније у времену (*Log Rank* = 8,670;  $p = 0,034$ ), при чему болесници са цитоплазматски обојеним ћелијама имају значајно нижу вероватноћу преживљавања (најраније су умирали) у односу на групу са мембранским и комбинованим бојењем, док је вероватноћа преживљавања највећа код болесника који немају обојене ћелије. Унутар групе болесника са I и II стадијумом болести (В) постоји значајна разлика између група болесника (*Log Rank* = 8,754;  $p = 0,033$ ), при чему болесници са цитоплазматским и комбинованим бојењем имају најмању вероватноћу преживљавања у односу на болеснике са мембранским бојењем и болеснике чије ћелије нису обојене, који имају највећу вероватноћу преживљавања. Унутар групе болесника са III стадијумом (С) није уочена статистички значајна разлика у кривама вероватноће преживљавања (Графикон 20).



**Графикон 20.** Анализа времена преживљавања (А) свих болесника са колоректалним карциномом, (В) болесника са I и II стадијумом и (С) болесника са III стадијумом болести који су умрли од последица релапса (Каплан-Мајер) у односу на локализацију обојености ћелија са *CD44* антителиом

4.15.6. Анализа времена преживљавања оболелих од КРК који су умрли као последица релапса болести у групи свих болесника као и приликом поделе на стадијуме болести у односу на процентуалну заступљеност *Lgr5* позитивних ћелија

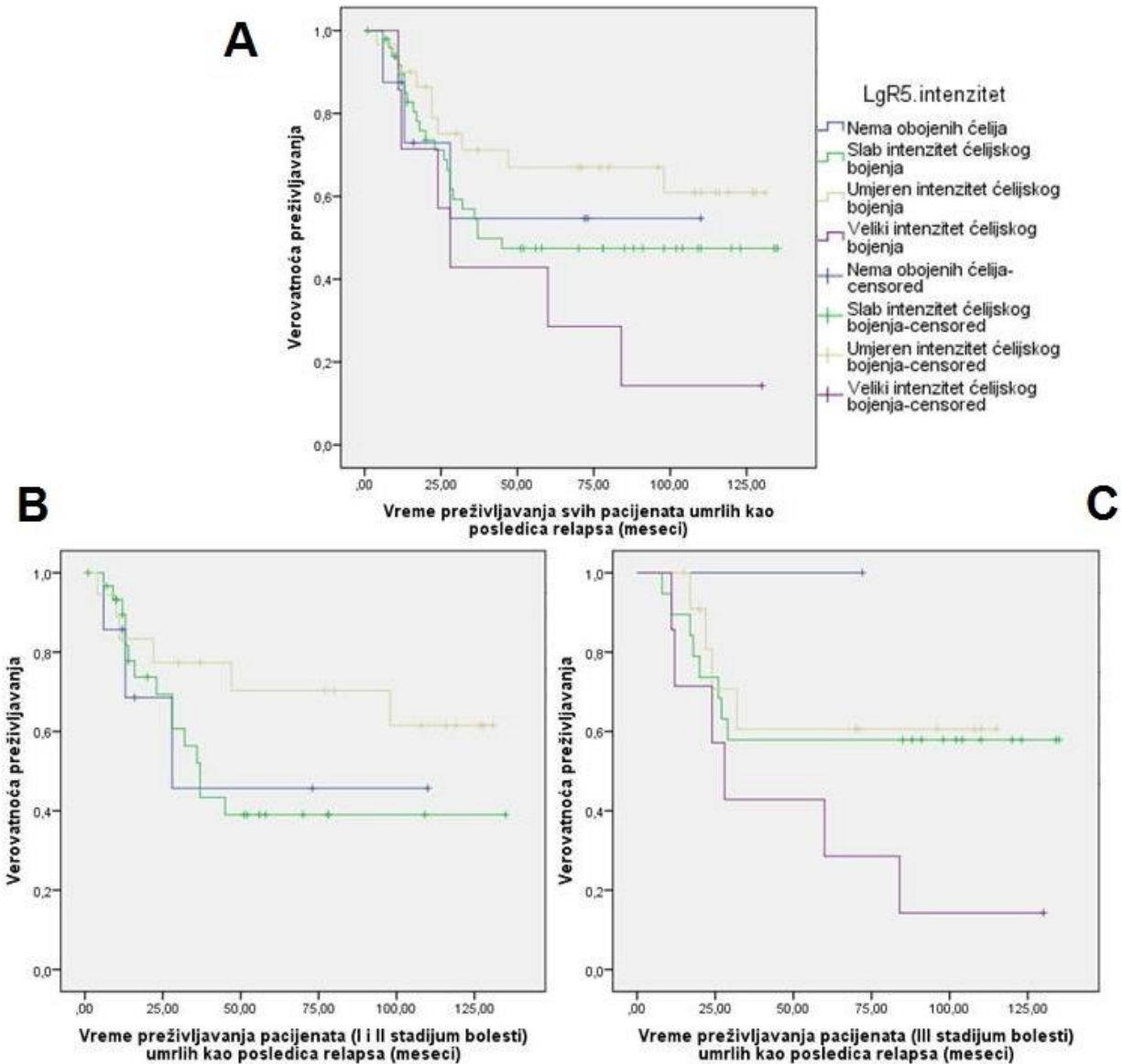
У групи свих болесника (А) између група болесника подељених према процентуалној заступљености *Lgr5* позитивних ћелија уочена је статистички значајна разлика у кривама вероватноће преживљавања на средини (*Tarone-Ware* = 8,185;  $p = 0,042$ ) и касније у времену (*Log Rank* = 9,687;  $p = 0,021$ ), при чему болесника са до 10% обојених ћелија имају значајно нижу вероватноћу преживљавања у односу на групе са од 10 до 50% и више од 50% обојених ћелија, док је вероватноћа преживљавања највећа код болесника који немају обојене ћелије. Унутар група болесника подељених према стадијуму болести (В и С) није уочена статистички значајна разлика у кривама вероватноће преживљавања (Графикон 21).



**Графикон 21.** Анализа времена преживљавања (А) свих болесника са колоректалним карциномом, (В) болесника са I и II стадијумом и (С) болесника са III стадијумом болести који су умрли од последица релапса (Каплан-Мајер) у односу на процентуалну заступљеност *Lgr5* позитивних ћелија

4.15.7. Анализа времена преживљавања оболелих од КРК који су умрли као последица релапса болести у групи свих болесника као и приликом поделе на стадијуме болести у односу на интензитет обојености ћелија *Lgr5* антителиом

У групи свих болесника (А), као и унутар група пацијената подељених према стадијуму болести (В и С) није уочена статистички значајна разлика између криви вероватноће преживљавања (групе подељене у односу на интензитет обојености са *Lgr5* антителиом) (Графикон 22).

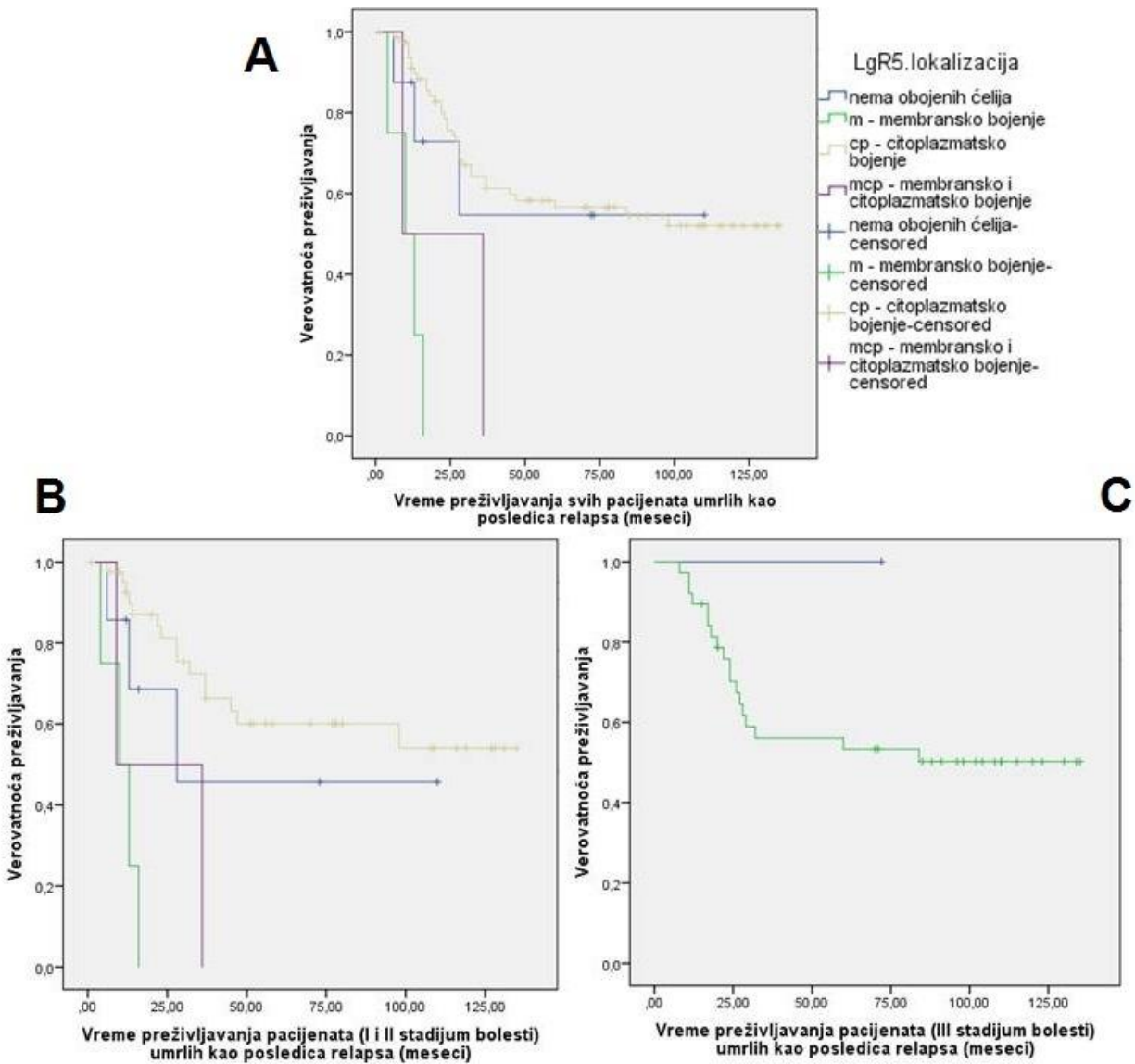


**Графикон 22.** Анализа времена преживљавања (А) свих болесника са колоректалним карциномом, (В) болесника са I и II стадијумом и (С) болесника са III стадијумом болести који су умрли од последица релапса (Каплан-Мајер) у односу на интензитет обојености ћелија *Lgr5* антителиом



4.15.8. Анализа времена преживљавања оболелих од КРК који су умрли као последица релапса болести у групи свих болесника као и приликом поделе на стадијуме болести у односу на локализацију обојености ћелија са *Lgr5* антителиом

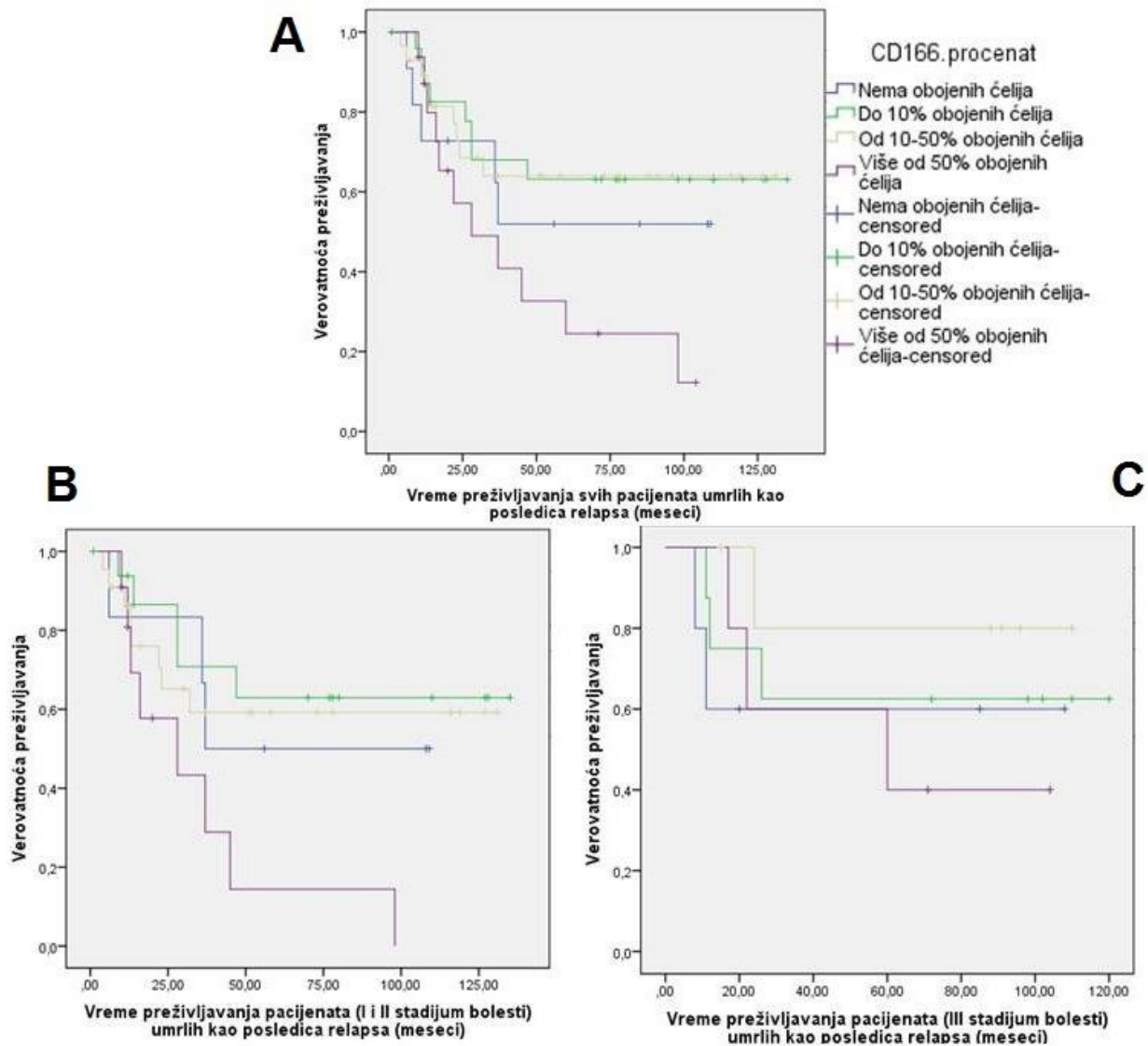
У групи свих болесника (А) између група болесника подељених према локализацији обојености *Lgr5* антителиом уочена је статистички значајна разлика у кривама вероватноће преживљавања на почетку (*Breslow* = 32,109;  $p < 0,001$ ), средини (*Tarone-Ware* = 33,332;  $p < 0,001$ ) и касније у времену (*Log Rank* = 34,675;  $p < 0,001$ ). Исте разлике су уочене и унутар групе болесника са I и II стадијумом болести (В) на почетку (*Breslow* = 24,014;  $p < 0,001$ ), средини (*Tarone-Ware* = 25,234;  $p < 0,001$ ) и касније у времену (*Log Rank* = 26,448;  $p < 0,001$ ) при чему болесници са мембрански и комбиновано обојеним ћелијама имају значајно нижу вероватноћу преживљавања у односу на групе са цитоплазматски обојеним и необојеним ћелијама. Статистички значајна разлика унутар групе болесника са III стадијумом болести (С) није уочена (Графикон 23).



**Графикон 23.** Анализа времена преживљавања (А) свих болесника са колоректалним карциномом, (В) болесника са I и II стадијумом и (С) болесника са III стадијумом болести који су умрли од последица релапса (Каплан-Мајер) у односу на локализацију обојености ћелија са *Lgr5* антителим

4.15.9. Анализа времена преживљавања оболелих од КРК који су умрли као последица релапса болести у групи свих болесника као и приликом поделе на стадијуме болести у односу на процентуалну заступљеност *CD166* позитивних ћелија

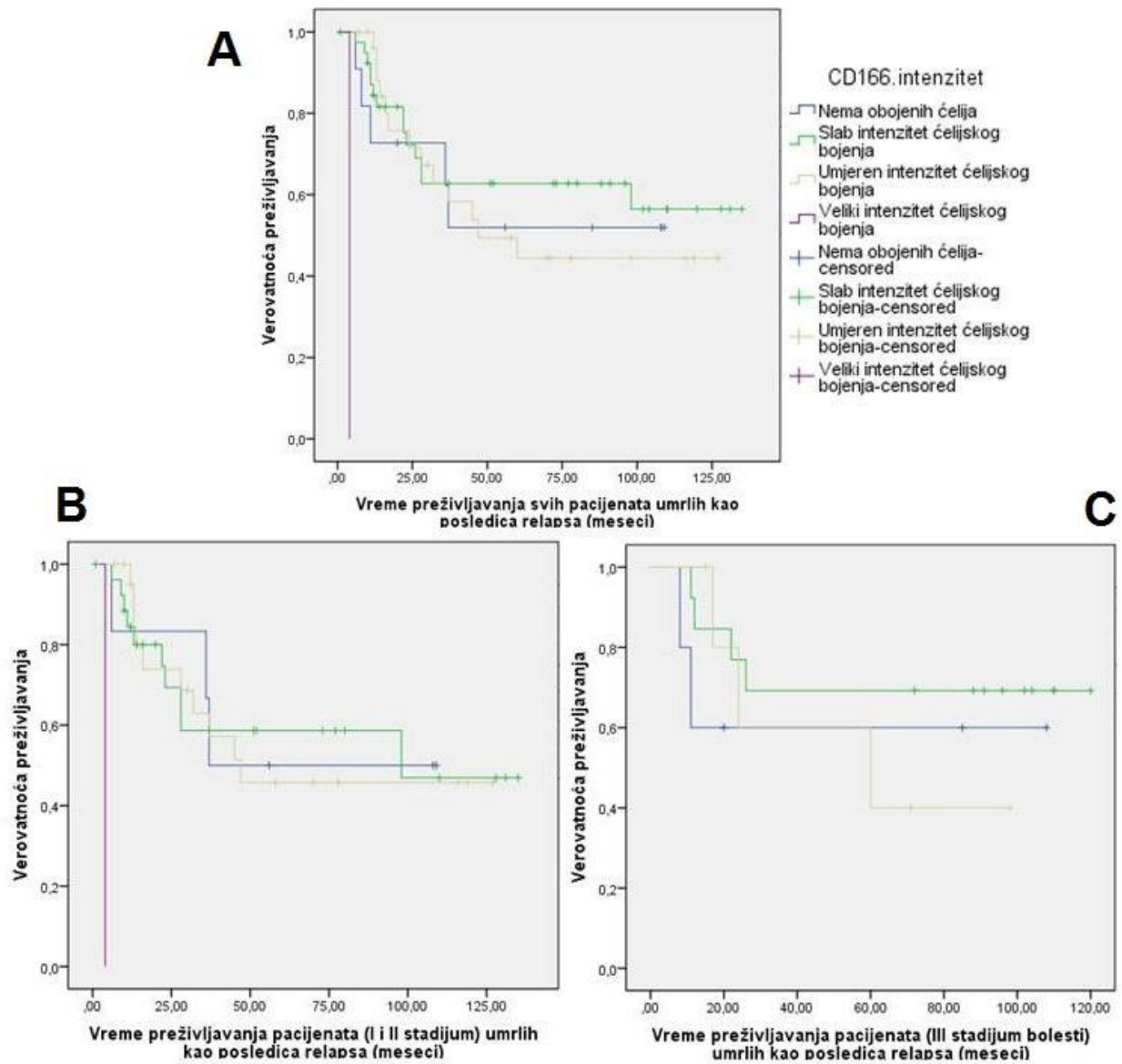
У групи свих болесника (А), као и унутар група болесника подељених према стадијуму болести (В и С) није уочена статистички значајна разлика између криви вероватноће преживљавања (групе подељене у односу на процентуалну заступљеност *CD166* позитивних ћелија) (Графикон 24).



**Графикон 24.** Анализа времена преживљавања (А) свих болесника са колоректалним карциномом, (В) болесника са I и II стадијумом и (С) болесника са III стадијумом болести који су умрли од последица релапса (Каплан-Мајер) у односу на процентуалну заступљеност *CD166* позитивних ћелија

4.15.10. Анализа времена преживљавања оболелих од КРК који су умрли као последица релапса болести у групи свих болесника као и приликом поделе на стадијуме болести у односу на интензитет обојености ћелија CD166 антителиом

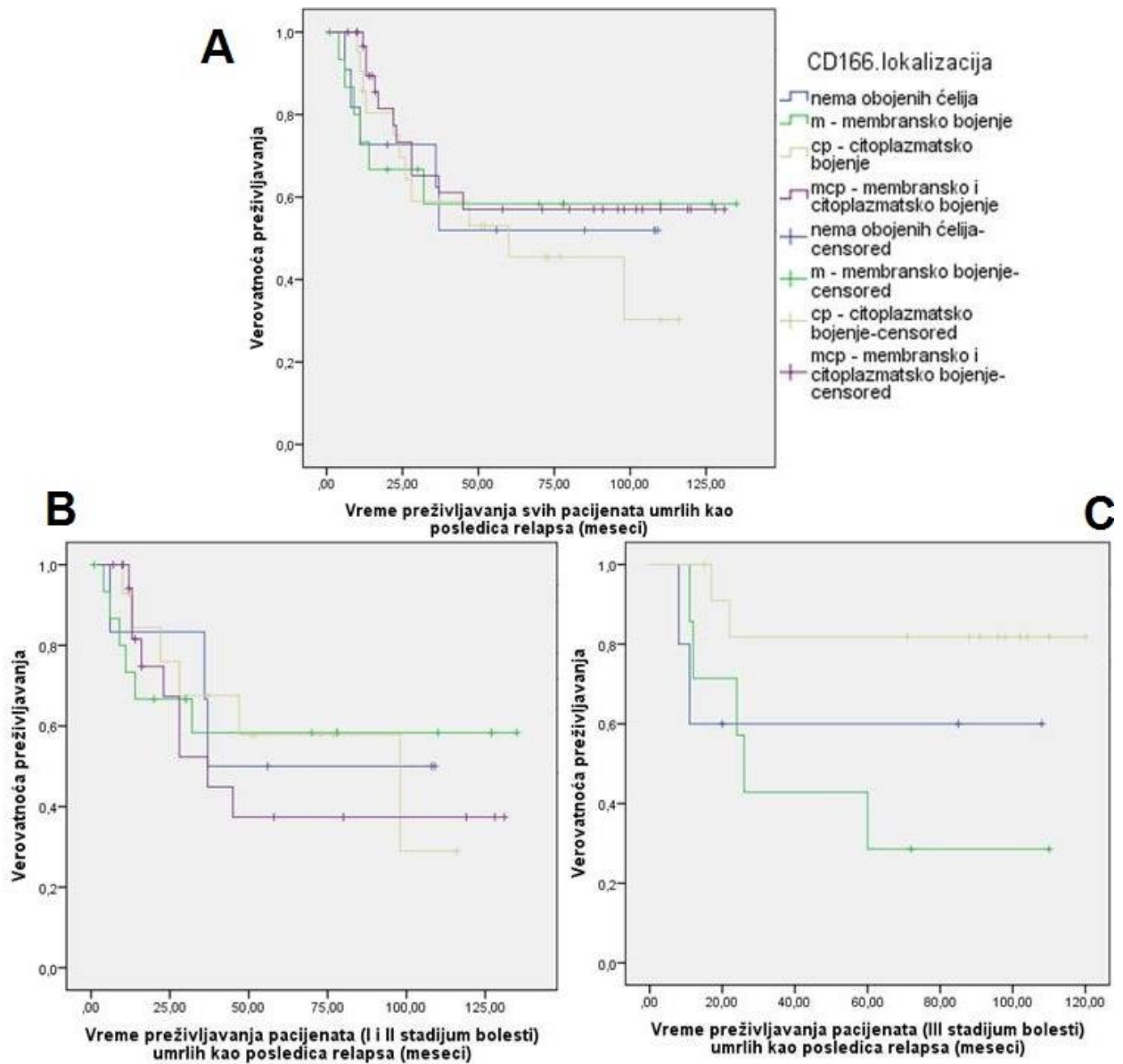
У групи свих болесника (А) између група болесника подељених према интензитету обојености CD166 антителиом уочена је статистички значајна разлика у кривама вероватноће преживљавања. Разлика је идентификована како на почетку (*Breslow* = 78,367;  $p < 0,001$ ), средини (*Tarone-Ware* = 78,360;  $p < 0,001$ ) и касније у времену (*Log Rank* = 78,482;  $p < 0,001$ ), при чему болесници са великим интензитетом обојености ћелија имају значајно нижу вероватноћу преживљавања (најраније су умирали) у односу на групе са slabим и умереним интензитетом обојености, као и групу са необојеним ћелијама. Унутар групе болесника са I и II стадијумом болести (B) такође постоји значајна разлика између група болесника како на почетку (*Breslow* = 54,021;  $p < 0,001$ ), средини (*Tarone-Ware* = 54,003;  $p < 0,001$ ) и касније у времену (*Log Rank* = 54,023;  $p < 0,001$ ), при чему болесници са великим интензитетом обојености ћелија имају значајно нижу вероватноћу преживљавања (најраније су умирали) у односу на групе са slabим и умереним интензитетом обојености, као и групу са необојеним ћелијама. Унутар групе болесника са III стадијумом (C) није уочена статистички значајна разлика у кривама вероватноће преживљавања (Графикон 25).



**Графикон 25.** Анализа времена преживљавања (А) свих болесника са колоректалним карциномом, (В) болесника са I и II стадијумом и (С) болесника са III стадијумом болести који су умрли од последица релапса (Каплан-Мајер) у односу на интензитет обојености ћелија *CD166* антителим

4.15.11. Анализа времена преживљавања оболелих од КРК који су умрли као последица релапса болести у групи свих болесника као и приликом поделе на стадијуме болести у односу на локализацију обојености ћелија CD166 антителиом

У групи свих болесника (А), као и унутар група болесника подељених према стадијуму болести (В и С) није уочена статистички значајна разлика између криви вероватноће преживљавања (групе подељене у односу на локализацију обојености CD166 антителиом) (Графикон 26).

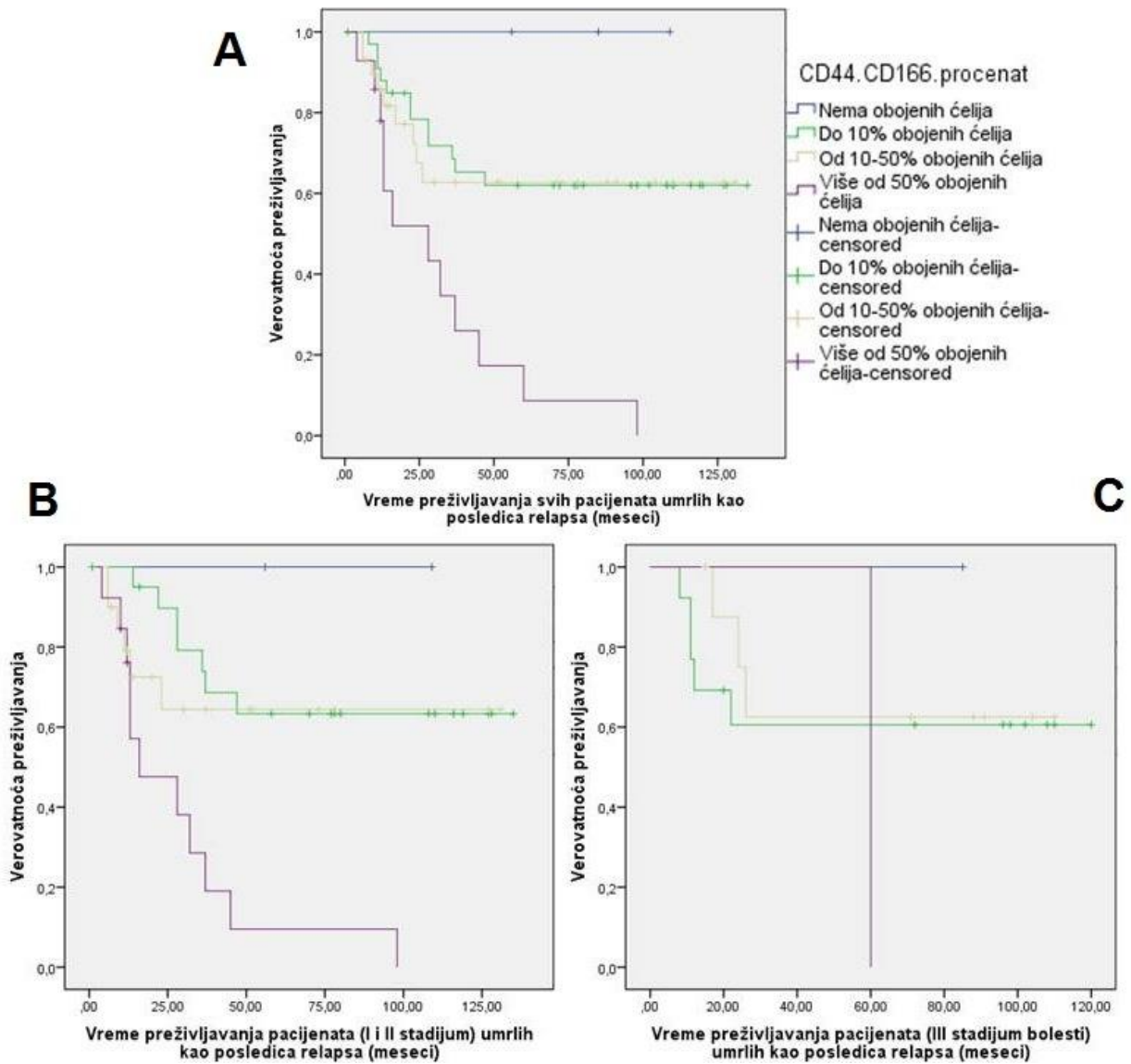


**Графикон 26.** Анализа времена преживљавања (А) свих болесника са колоректалним карциномом, (В) болесника са I и II стадијумом и (С) болесника са III стадијумом болести који су умрли као последица релапса (Каплан-Мајер) у односу на локализацију обојености ћелија *CD166* антителим



4.15.12. Анализа времена преживљавања оболелих од КРК који су умрли као последица релапса болести у групи свих болесника као и приликом поделе на стадијуме болести у односу на процентуалну заступљеност  $CD44/CD166$  позитивних ћелија

У групи свих болесника (А) између група болесника подељених према процентуалној заступљености  $CD44/CD166$  позитивних ћелија уочена је статистички значајна разлика у кривама вероватноће преживљавања. Разлика је идентификована како на почетку ( $Breslow = 11,109$ ;  $p = 0,011$ ), средини ( $Tarone-Ware = 13,762$ ;  $p = 0,003$ ) и касније у времену ( $Log Rank = 17,449$ ;  $p = 0,001$ ), при чему су болесници са више од 50% позитивних ћелија имали значајно нижу вероватноћу преживљавања (најраније су умирали) у односу на групе са мање од 10% или 10–50% позитивних ћелија, као и групу са необојеним ћелијама која је имала највишу вероватноћу преживљавања (најкасније су умирали). Унутар групе болесника са I и II стадијумом болести (B) такође постоји значајна разлика између група болесника како на почетку ( $Breslow = 12,254$ ;  $p = 0,007$ ), средини ( $Tarone-Ware = 14,133$ ;  $p = 0,003$ ) и касније у времену ( $Log Rank = 16,818$ ;  $p = 0,001$ ), при чему су болесници са више од 50% позитивних ћелија имали значајно нижу вероватноћу преживљавања (најраније су умирали) у односу на групе са мање од 10% или 10–50% позитивних ћелија, као и групу са необојеним ћелијама која је имала највишу вероватноћу преживљавања (најкасније су умирали). Унутар групе болесника са III стадијумом (C) није уочена статистички значајна разлика у кривама вероватноће преживљавања (Графикон 27).



**Графикон 27.** Анализа времена преживљавања (А) свих болесника са колоректалним карциномом, (В) болесника са I и II стадијумом и (С) болесника са III стадијумом болести који су умрли од последица релапса (Каплан-Мајер) у односу на процентуалну заступљеност *CD44/CD166* позитивних ћелија

#### **4.16. Мултиваријантна анализа фактора ризика за настанак релапса након операције колоректалног карцинома у групи свих болесника**

Анализа фактора ризика за настанак релапса након операције колоректалног карцинома рађена је мултиваријантном Кокс пропорционалном регресионом анализом код свих болесника код којих је дошло до релапса. Утврђено је да од свих фактора ризика за настанак релапса само детектоване позитивне *CD44* ћелије представљају статистички значајан фактор ризика за настанак релапса (OR = 5,210, [CI = 1,027-26,439],  $p = 0,046$ ), што значи да болесници након операције карцинома дебелог црева имају 5,2 пута већи ризик за настанак релапса уколико имају *CD44* позитивне ћелије. Међутим, пол, старост, већи број позитивних лимфних чворова, стадијум болести, лимфоваскуларна и перинеурална инвазија, присуство муцина и некрозе у тумору, и присуство КМТ позитивних на *Lgr5*, *CD166* и *CD44/CD166* маркере не представљају статистички значајне факторе ризика за настанак релапса после операције карцинома дебелог црева (Табела 48).

**Табела 48.** Мултиваријантна анализа фактора ризика за настанак релапса након операције болесника са карциномом дебелог црева, рађена Кокс регресионом анализом

Мултиваријантна анализа	OR [95% CI]	<i>p</i>
Старост	0,976 [0,868-1,098]	0,686
Пол	0,616 [0,195-1,944]	0,409
Број позитивних лимфних чворова	1,209 [0,710-2,059]	0,484
Стадијум болести	0,262 [0,016-4,276]	0,347
Лимфоваскуларна инвазија	1,085 [0,243-4,850]	0,915
Перинеурална инвазија	5,714 [0,369-88,380]	0,212
Муцин у тумору	0,885 [0,145-5,400]	0,895
Некроза у тумору	0,760 [0,224-2,582]	0,660
Присуство <i>CD44</i> позитивних ћелија	<b>5,210 [CI=1,027-26,439]</b>	<b>0,046</b>
Присуство <i>Lgr5</i> позитивних ћелија	0,404 [0,060-2,698]	0,349
Присуство <i>CD166</i> позитивних ћелија	0,365 [0,049-2,728]	0,326
Присуство <i>CD44/CD166</i> позитивних ћелија	1,290 [0,178-6,575]	0,999

OR – odds ratio – означава ризик тј. однос укрштених шанси; CI – интервал поверења (*confidence interval*) значајне вредности,  $p < 0,050$  су болдоване

#### **4.17. Мултиваријантна анализа фактора ризика за настанак смрти као последица релапса након операције колоректалног карцинома у групи свих болесника**

Анализа фактора ризика за настанак смрти као последица релапса након операције колоректалног карцинома (*DOD*) рађена је мултиваријантном Кокс пропорционалном регресионом анализом код свих болесника који су умрли од последица релапса. Утврђено је да од свих фактора ризика за настанак смрти услед релапса само детектоване позитивне *CD44* позитивне ћелије представљају статистички значајан фактор ризика за настанак смрти услед релапса ( $OR = 6,246$ ,  $[CI = 1,024-38,097]$ ,  $p = 0,047$ ), што значи да болесници након операције карцинома дебелог црева имају 6,2 пута већи ризик од смрти услед релапса уколико имају *CD44* позитивне ћелије. Међутим, пол, старост, већи број позитивних лимфних чворова, стадијум болести, лимфоваскуларна и перинеурална инвазија, присуство муцина и некрозе у тумору, и присуство КМЋ позитивних на *Lgr5*, *CD166* и *CD44/CD166* маркере не представљају статистички значајне факторе ризика за настанак смрти услед релапса после операције карцинома дебелог црева (Табела 49).

**Табела 49.** Мултиваријантна анализа фактора ризика за *DOD* након операције болесника са карциномом дебелог црева, рађена Кокс регресионом анализом

Мултиваријантна анализа	<i>OR</i> [95% <i>CI</i> ]	<i>p</i>
Старост	1,029 [0,924-1,147]	0,600
Пол	0,465 [0,158-1,366]	0,164
Број позитивних лимфних чворова	1,008 [0,626-1,622]	0,975
Стадијум болести	0,643 [0,085-4,483]	0,668
Лимфоваскуларна инвазија	0,528 [0,117-2,373]	0,405
Перинеурална инвазија	3,607 [0,476-27,332]	0,214
Муцин у тумору	0,795 [0,136-4,644]	0,799
Некроза у тумору	1,381 [0,457-4,175]	0,660
Присуство <i>CD44</i> позитивних ћелија	<b>6,246 [CI = 1,024-38,097]</b>	<b>0,047</b>
Присуство <i>Lgr5</i> позитивних ћелија	1,307 [0,223-7,657]	0,766
Присуство <i>CD166</i> позитивних ћелија	0,437 [0,073-2,628]	0,365
Присуство <i>CD44/CD166</i> позитивних ћелија	1,764 [0,939-5,940]	0,998

*OR* – odds ratio – означава ризик тј. однос укрштених шанси; *CI* – интервал поверења (*confidence interval*) значајне вредности,  $p < 0,050$  су болдоване

**4.18. Мултиваријантна анализа фактора ризика за настанак релапса након операције колоректалног карцинома у групи болесника подељених према стадијуму болести**

Мултиваријантном Кокс пропорционалном регресионом анализом утврђено је да унутар групе болесника са I и II стадијумом болести од свих фактора ризика за настанак релапса само детектоване позитивне *CD44* позитивне ћелије представљају статистички значајан фактор ризика (OR = 7,120, [CI = 0,957-52,944], p = 0,045), што значи да ови болесници након операције карцинома дебелог црева имају 7,1 пута већи ризик за настанак релапса уколико имају *CD44* позитивне ћелије. Међутим, пол, старост, лимфоваскуларна и перинеурална инвазија, присуство муцина и некрозе у тумору, и присуство КМЋ позитивних на *Lgr5*, *CD166* и *CD44/CD166* маркере не представљају статистички значајне факторе ризика за настанак релапса после операције карцинома дебелог црева унутар групе болесника са I и II стадијумом. Унутар групе болесника са III стадијумом колоректалног карцинома ниједан од фактора ризика није идентификован као статистички значајан (Табела 50).

**Табела 50.** Мултиваријантна анализа фактора ризика за настанак релапса након операције болесника са карциномом дебелог црева, рађена Кокс регресионом анализом

Мултиваријантна анализа	I и II стадијум болести		III стадијум болести	
	OR [95% CI]	p	OR [95% CI]	p
Старост	0,952 [0,828-1,095]	0,495	3,520 [0,005-2,379]	0,705
Пол	0,382 [0,090-1,618]	0,191	1,090 [0,034-35,296]	0,961
Број позитивних лимфних чворова	/	/	1,203 [0,483-2,992]	0,692
Стадијум болести	0,264 [0,035-1,974]	0,194	6,483 [0,085-49,518]	0,398
Лимфоваскуларна инвазија	0,588 [0,049-2,013]	0,769	2,893 [0,118-71,238]	0,516
Перинеурална инвазија	0,146 [0,008-2,576]	0,189	3,193 [0,095-107,400]	0,517
Муцин у тумору	0,629 [0,152-2,599]	0,522	2,938 [0,014-62,754]	0,694
Некроза у тумору	<b>7,120 [0,957-52,944]</b>	<b>0,045</b>	2,074 [0,005-83,499]	0,812
Присуство CD44 позитивних ћелија	0,454 [0,055-3,750]	0,464	0,655 [0,317-6,926]	0,850
Присуство LgR5 позитивних ћелија	0,482 [0,035-6,573]	0,584	0,170 [0,001-33,520]	0,511
Присуство CD166 позитивних ћелија	0,271 [0,134-1,379]	0,659	0,703 [0,328-7,744]	0,912

OR – odds ratio – означава ризик тј. однос укрштених шанси; CI – интервал поверења (*confidence interval*), значајне вредности,  $p < 0,050$  болдоване су

#### **4.19. Мултиваријантна анализа фактора ризика за настанак смрти као последица релапса након операције колоректалног карцинома у групи болесника подељених према стадијуму болести**

Анализа фактора ризика за настанак смрти као последица релапса након операције колоректалног карцинома (*DOD*) рађена је мултиваријантном Кокс пропорционалном регресионом анализом. Утврђено је да од свих фактора ризика за настанак смрти болесника у I и II стадијуму болести, услед релапса, само детектоване позитивне *CD44* позитивне ћелије представљају статистички значајан фактор ризика за настанак смрти услед релапса ( $OR = 12,251$ ,  $[CI = 0,867-173,129]$ ,  $p = 0,037$ ), што значи да ови болесници након операције карцинома дебелог црева имају 12,2 пута већи ризик за настанак смрти услед релапса уколико имају *CD44* позитивне ћелије. Међутим, пол, старост, стадијум болести, лимфоваскуларна и перинеурална инвазија, присуство муцина и некрозе у тумору, и присуство КМЋ позитивних на *Lgr5*, *CD166* и *CD44/CD166* маркере не представљају статистички значајне факторе ризика за настанак смрти услед релапса болесника у I и II стадијуму после операције карцинома дебелог црева. Унутар групе болесника са III стадијумом колоректалног карцинома ниједан од фактора ризика није идентификован као статистички значајан (Табела 51).

**Табела 51.** Мултиваријантна анализа фактора ризика за *DOD* након операције болесника са карциномом дебелог црева, рађена Кокс регресионом анализом

Мултиваријантна анализа	I и II стадијум болести		III стадијум болести	
	OR [95% CI]	<i>p</i>	OR [95% CI]	<i>p</i>
Старост	2,940 [0,261-33,132]	0,383	1,110 [0,826-1,493]	0,489
Пол	0,215 [0,046-0,993]	0,089	0,660 [0,023-19,180]	0,809
Број позитивних лимфних чворова	/	/	0,861 [0,369-2,010]	0,729
Стадијум болести	0,172 [0,015-1,945]	0,155	5,134 [0,070-375,557]	0,455
Лимфоваскуларна инвазија	0,321 [0,173-2,759]	0,245	10,331 [0,412-258,846]	0,155
Перинеурална инвазија	0,126 [0,007-2,236]	0,158	3,236 [0,089-117,922]	0,522
Муцин у тумору	0,894 [0,209-3,815]	0,880	1,440 [0,011-190,041]	0,884
Некроза у тумору	<b>12,251 [0,867-173,129]</b>	<b>0,037</b>	4,778 [0,008-2,946]	0,633
Присуство <i>CD44</i> позитивних ћелија	0,856 [0,104-7,045]	0,885	0,277 [0,019-2,396]	0,801
Присуство <i>Lgr5</i> позитивних ћелија	0,311 [0,022-4,437]	0,389	0,331 [0,004-26,079]	0,511
Присуство <i>CD166</i> позитивних ћелија	1,120 [0,287-2,472]	0,508	1,156 [0,321-3,372]	0,773

OR – odds ratio – означава ризик тј. однос укрштених шанси; CI – интервал поверења (*confidence interval*), значајне вредности,  $p < 0,050$  болдоване су



## 5. ДУСКУСИЈА

### 5.1. Уводне напомене, дизајн студије и величина узорка

Спроведена је проспективно-ретроспективна рандомизована аналитичка студија. Сви болесници укључени у студију су оперисани у Институту за онкологију Војводине у периоду 2007–2012. године. Болесници су одабирани насумично из базе информационог система Института за онкологију Војводине (*BIRPIS*) а потом груписани у односу на појаву рецидива болести и присуство метастаза у регионалним лимфним чворовима у односу 1 : 1. Рандомизација је била изведена стратификованом шемом како би се спречила и избегла пристрасност у формирању узорка. У студију је укључено 112 болесника и на овај начин је задовољен критеријум да се при типу I грешке са вероватноћом од  $\alpha = 0,05$ , при снази студије од 80% детектује разлика у дистрибуцији налаза од 25%. Шахријар (*Shahriar*) и сарадници су у своју ретроспективну студију укључили насумично одабраног 121 болесника оперисаног у периоду 2006–2012. године. *CD166* је одређиван у туморским ресекатима. Заступљеност преко 50% ћелија у препарату се сматрало позитивним налазом те су болесници рандомизовани на основу тог критеријума у две групе (*CD166+* и *CD166-* болесници). Потом се за сваку групу болесника посматрао утицај експресије *CD166* на дубину инвазије тумора, лимфоваскуларну инвазију, перинеуралну инвазију, локализацију тумора, релапс болести, преживљавање без болести и свеукупно преживљавање (201). Такези (*Tachezy*) и сар. су применили исту методу одабира болесника и рандомизације у својој ретроспективној студији на 229 болесника након чега су поредили утицај експресије *CD166* на релапс болести, преживљавање без болести и свеукупно преживљавање (202). Лугли (*Lugli*) и сарадници су у своју ретроспективну студију насумично укључили 1.420 оперисаних болесника. У хируршким ресекатима тумора је одређиван степен експресије маркера КМЋ (*CD133*, *CD166*, *CD44*, *EpCAM* и *ALDH1*) а потом су болесници рандомизовани у две групе (појачана експресија и губитак експресије) и посматран је њихов утицај на дубину инвазије тумора, локализацију тумора, перинеуралну и лимфоваскуларну инвазију, појаву метастаза, дужину преживљавања без болести и свеукупно преживљавање (187). У литератури је описано још преко 50 ретроспективних студија на којима су засноване три мета анализе Фана, Хана, Фернандеза (*Fan*, *Han*, *Fernandez*) и сар. које су поредиле утицај експресије маркера КМЋ на појаву релапса, преживљавање без болести и свеукупно преживљавање. Ниједна од поменутих студија није вршила рандомизацију болесника на основу појаве релапса болести према стадијумима болести што наш рад чини оригиналним. Такође предност наше студије је у томе што је проспективно формирана и унапред је одређена јачина студије (174, 199, 200).

## **5.2. Карактеристике болесника и преоперативни статус**

### *Пол болесника*

Познато је да је инциденца јављања КРК већа код мушкараца (26). Ови подаци се базирају на сазнањима GLOBOCAN-а и IARC-а који сакупљају податке о 36 карцинома из 185 земаља (24, 25). Бреј (*Bray*) и сарадници су у последњој ревизији GLOBOCAN-а за 2018. годину навели да је случају КРК однос оболелих мушкараца према женама 1,4 : 1 (24). Топдађи (*Topdagi*) и сар. у својој ретроспективној студији на 752 болесника наводе да је 56,8% оболелих мушкараца и 43,2% жена (203). У нашој серији је било укупно 5161 (54,5%) мушког пола и (45,5%) особа женског пола. Наша студија, будући да је заснована на малом узорку случајно одабраних болесника, не може се мерити са популационим студијама. Поклапање наших података са подацима поменутих популационих студија указује на адекватан и непристрасан одабир и рандомизацију болесника за студију.

### *Старост болесника*

Просечна старост оболелих од колоректалног карцинома одређена је на основу мултицентричних студија спроведених у циљу скрининга КРК као и података преузетих са GLOBOCAN-а и IARC-а а износи између 60 и 70 година живота (24–26). Гајтонд (*Gaitonde*) и сар. у својој студији на 858 оболелих од КРК такође наводе просечну старост болесника између 60 и 70 година за оба пола (204). Према резултатима нашег истраживања просечна старост болесника је  $67,05 \pm 9,51$  годину. Без обзира на малу количину узорка и немогућност поређења са популационим студијама, наши резултати се налазе у оквиру резултата великих студија из доступне литературе захваљујући непристрасној рандомизацији.

Према *MeSH* критеријумима (*Medical Subject Headings*) граница за поделу болесника на средовечне је од 44 до 65 година и старије животне доби од 66 до 80 година (205). У нашем истраживању болесници су подељени у две групе према старости – група млађе животне доби (од 45 до 65 година) и старије животне доби (од 66 до 84 године) будући да је 67 година била просечна старост свих болесника и на тај начин смо у обе групе добили приближно исти број болесника. Александер (*Alexander*) и сар. су објавили рад у којем су показали да се средовечни и млађи болесници чешће налазе у трећем стадијуму болести односно имају позитивне регионалне лимфне чворове (206). У приложеним резултатима нашег истраживања, показано је да између група пацијената подељених према старости постоји статистички значајна разлика ( $\chi^2 = 6,196$ ;  $p = 0,013$ ), при чему се млађа група пацијената знатно чешће налазила у трећем стадијуму болести у односу на старију групу болесника, (30 тј. 63,8% vs 26 односно 40%). Овакво поклапање са подацима великих студија на малом узорку какав је наш указује на адекватан одабир болесника и непристрасност приликом рандомизације.

Каплан и сарадници у својој мултицентричној студији указују на значај старости и пола болесника на релапс болести (207). Приликом анализе података наше студије, између болесника подељених на групе према старости и полу није уочена статистички значајна разлика у односу на учесталост појаве релапса. Наша студија се по величини не може поредити са великим популационим студијама те се стога утицај пола и старости на релапс болести не може адекватно сагледати.

### **5.3. Прогностички фактори, њихов утицај на релапс болести и свеукупно преживљавање**

Релапс болести се дефинише као враћање болести након периода ремисије (44, 53, 54). Од укупног броја болесника укључених у студију (112 болесника), 58 (51,8%) је доживело релапс болести, док код преосталих 54 (48,2%) није дошло до релапса болести. Такође од укупног броја болесника који су имали релапс, 50 (44,6%) је умрло од болести док су остали болесници умрли из другог разлога. Од 56 болесника који су сврстани у I и II стадијум болести, 30 (53,6%) је имало релапс док је у групи 56 болесника који су сврстани у III стадијум болести 28 (50%) имало релапс. Већи број болесника који су имали релапс у групи нодус-негативних болесника (болесници у I и II стадијуму болести) могао би се објаснити самим одабиром болесника за студију у односу 1 : 1 на основу постојања релапса болести.

Просечна вредност свеукупног преживљавања је високо статистички значајна ( $p < 0,010$ ) код болесника који нису имали релапс ( $88,85 \pm 36,42$  месеци) у односу на болеснике са појавом релапса ( $44,67 \pm 30,49$  месеци). Такође преживљавање без појаве болести у месецима је статистички значајно веће у групи болесника без појаве релапса ( $88,85 \pm 36,42$  месеци) у односу на групу у којој је дошло до појаве релапса болести ( $22,75 \pm 17,30$  месеци). Поклапање наших резултата свеукупног преживљавања и преживљавања без појаве болести са резултатима мултицентричних студија је знак коректне рандомизације болесника (44, 54). Међутим, између група болесника подељених у односу на стадијум болести није уочена статистички значајна разлика у просечним вредностима свеукупног преживљавања, преживљавања без појаве болести и преживљавања болесника умрлих од последица релапса (у месецима) што би се могло објаснити самим одабиром болесника за студију у односу 1 : 1 на основу постојања релапса болести.

#### *Место релапса*

Према подацима из литературе највећи број болесника има релапс болести у виду удаљених метастаза. Такође подаци из литературе указују на то да је код КРК најчешћи вид удаљених метастаза на јетри имајући у виду хематогено метастазирање путем портне циркулације (22, 26, 44, 53, 54). Каплан и сар. у свом раду наводе јетру као најчешће место метастазирања (64,3%) (207). Робинсон (*Robinson*) и сар. у популационој студији на преко 1.200 болесника потврђују јетру као најчешће место метастазирања карцинома дебелог

црева (208). У нашој групи испитаника који су имали релапс, највећи број, 20 (17,9%), имао је метастазе на јетри што се поклапа са доступним наводима из литературе.

У дистрибуцији болесника у групе према стадијуму болести, болесници у првом и другом стадијуму најчешће су имали релапс у виду локалног рецидива на месту анастомозе (11 болесника односно 19,6%) док код болесника у трећем стадијуму болести јетра предњачи као место релапса (12 болесника односно 21,4%). Овакви подаци код болесника оперисаних у првом и другом стадијуму се највероватније могу објаснити биологијом самог тумора односно њиховом локалном инвазивношћу док су подаци за болеснике у трећем стадијуму у оквиру очекиваних.

*NCCN*, *ESMO*, *TNM* и *AJCC* као најважније прогностичке факторе наводе: дубину туморске инвазије, број прегледаних лимфних чворова, присуство метастаза у лимфним чворовима, присуство лимфоваскуларне инвазије, перинеуралне инвазије, муцина и некрозе у тумору и степен диферентованости тумора (44, 53, 54, 81). Новије студије указују на све већи значај локализације тумора (204).

#### *Дубина туморске инвазије*

Према *AJCC* и *TNM* класификацији болесници су разврстани у односу на дубину инвазије тумора у четири категорије: *T1*, *T2*, *T3* и *T4*. *T1* означава туморе ограничене на субмукозу, *T2* туморе који захватају мускуларис проприју, *T3* туморе који захватају супсерозу или неперитонизовано периколично масно ткиво док су ознаком *T4* обележени тумори који захватају висцерални перитонеум и околне органе (54, 81). Вонг (*Wong*) и сар. у својој кохортној студији на 796 болесника директно повезују дубину туморске инвазије са метастазирањем у регионалне ЛГ, лимфоваскуларном инвазијом, лоше диферентованим туморима и лошијом прогнозом (209). Дистрибуцијом свих болесника у односу на захваћеност тумором, у нашем истраживању показано је да се највећи број оболелих налазио у *T3* стадијуму (103 болесника односно 92%) што је у складу са тренутним подацима из доступне литературе без обзира на малу величину нашег узорка у поређењу са популационим студијама (54,81). Три болесника (2,7%) била су у *T2* стадијуму и шест болесника у *T4* стадијуму (5,4%). Међу болесницима обухваћених нашом студијом није било оних који су се налазили у *T1* стадијуму.

У нашој студији свих шест болесника који су се налазили у *T4* категорији имали су релапс болести, од укупно 103 болесника који су се налазили у *T3* категорији, 52 је имало релапс док ниједан болесник (од укупно три) *T2* категорије није имао релапс болести. У нашој студији између група болесника подељених према појави релапса уочена је високо статистички значајна разлика у односу на захваћеност тумором ( $p = 0,003$ ) што се поклапа са подацима великих студија из литературе (44, 53, 54, 81).

### Укупан број прегледаних лимфних чворова

Према истакнутим светским водичима за дијагностику и лечење КРК попут најновијих ревизија *NCCN*, *AJCC* и *ESMO*-а тренутни стандард за адекватно одређивање стадијума болести је минимум 12 прегледаних ЛЧ што уједно представља и мерило хирушког и патолошког квалитета рада (44, 53, 54). На основу приказаних резултата нашег истраживања може се закључити да је овај критеријум испуњен код највећег броја болесника (укупан број извађених лимфних чворова за све болеснике  $15,53 \pm 9,03$ ) што указује на адекватност хирушке технике и ангажованост патолога приликом патохистолошког прегледа. У нашој студији између група болесника подељених према појави релапса није уочена статистички значајна разлика у просечном броју извађених ЛЧ (укупних и позитивних) када су у питању сви болесници и у просечном броју извађених ЛЧ када су у питању болесници подељени према стадијуму болести.

### Присуство метастаза у прегледаним лимфним чворовима

Бакстер (*Baxter*) и сарадници су у својој популационој студији на 116.995 оперисаних због КРК јасно указали утицај позитивних ЛЧ на преживљавање и исход болести (210). Светски водичи за дијагностику и лечење КРК као што су *NCCN*, *AJCC* и *ESMO* сматрају присуство метастаза у прегледаним ЛЧ једним од најбитнијих прогностичких фактора (44, 53, 54). У нашој студији приликом поделе болесника према појави релапса није уочена статистички значајна разлика у броју метастатски измењених ЛЧ. Статистички значајна разлика у броју метастатски измењених ЛЧ у односу на појаву релапса болести је идентификована код болесника у III стадијуму болести ( $4,78 \pm 3,98$  vs  $2,96 \pm 2,20$ ;  $p = 0,039$ ). Поклапање наших података са подацима великих студија из литературе указује на непристрасност приликом одабира болесника и адекватну рандомизацију (54, 87, 88, 92, 95, 206, 210).

### Лимфоваскуларна инвазија

Статистичка значајност лимфоваскуларне инвазије као фактора лоше прогнозе и њена повезаност са стадијумом болести уочена је и у радовима Лима (*Lim*) и Бетга (*Betge*) (102, 104, 105). У нашој студији, од укупног броја болесника код 35 (31,3%) утврђено је присуство лимфоваскуларне инвазије. Између група болесника подељених према стадијуму болести на две групе уочена је статистички високо значајна разлика ( $p = 0,001$ ) у односу на учесталост присуства лимфоваскуларне инвазије (седам болесника односно 12,5% у првом и другом стадијуму болести наспрам 28 болесника односно 50% у трећем стадијуму болести). Анализом болесника подељених према стадијуму болести, у односу на појаву релапса болести, уочена је статистичка значајност у односу на учесталост присуства лимфоваскуларне инвазије код болесника у трећем стадијуму болести ( $p = 0,008$ ). Поклапање наших резултата са резултатима мултицентричних студија јесте знак да није било пристрасности приликом рандомизације болесника.

### Перинеурална инвазија

Лајбиг (*Liebig*) и сар. су у свом раду присуство перинеуралне инвазије окарактерисали као независан прогностички фактор за КРК (106). У нашој студији од укупног броја болесника, перинеурална инвазија је идентификована код 14 оболелих (12,5%) од тога код једног болесника у првом стадијуму и другом стадијуму и 13 болесника у трећем стадијуму болести чиме је добијена статистички значајна разлика ( $p = 0,001$ ). Међутим статистичка значајност у погледу релапса болести и присуства перинеуралне инвазије није идентификована како у групи свих болесника тако ни приликом поделе према стадијуму болести. Поклапање наших резултата са резултатима мултицентричних студија је знак да није било пристрасности приликом рандомизације болесника.

### Присуство муцина и некрозе у тумору

Иако се у поменутој студији и важећим водичима за лечење и дијагностику КРК присуство муцина и некрозе у тумору повезује са краћим преживљавањем болести, у нашој студији није добијена статистички значајна разлика приликом корелације ова два параметра са релапсом болести како за целу групу болесника тако и приликом поделе болесника према стадијуму болести (62, 103, 124).

### Степен диферентованости тумора

Светска здравствена организација (*World Health Organisation*) поделила је туморе према степену диферентованости на четири категорије: *G1*, *G2*, *G3* и *G4*. При чему су *G1* и *G2* тумори ниског градуса а *G3* и *G4* тумори високог градуса према двостепеном систему хистолошког градирања (79).

АЈСС истиче значај високог градуса тумора (*G3*) на прогнозу болести (53). Ова теза потврђена је и у студији Јена (*Uena*) и сар. који су на 500 болесника оперисаних због КРК утврдили статистичку значајност у преживљавању без болести и свеукупном преживљавању у случају хистолошки лоше диферентованог тумора (211). Хистолошком анализом тумора, у нашој студији од укупног броја болесника, 13 (11,6%) је имало добро диферентован тумор, 94 (83,9%) средње диферентован и пет (4,5%) лоше диферентован тумор. Није било болесника са недиферентованим тумором. Приликом поделе на стадијуме болести, највећи број болесника у I и II стадијуму болести је имао средње диферентован тумор (46 болесника односно 82,1%). Добро диферентовани тумори су такође би најзаступљенији у III стадијуму болести (48 болесника односно 85,7%). Између група болесника подељених према појави релапса није уочена статистички значајна разлика у односу на хистолошки градус тумора како код свих болесника, као ни унутар група подељених према стадијуму болести. Као што се види из приложеног, у нашој студији највећи број болесника је имао тумор *G2* стадијума. Такође, испитивања су рађена на малом узорку те тиме може објаснити изостајање статистичке значајности.

*Локализација тумора*

У последњих десетак година се све више говори о значају локализације КРК где тумори на десном колону имају лошију прогнозу (204, 212). У десетом издању Шварцовог (*Schwartz*) уџбеника наводи се да је најчешћа локализација тумора на левом колону (50%), што Јеремиић и сарадници потврђују у својој књизи *Абдоминална хирургија* (16, 22). Топдађи и сар. у својој ретроспективној студији на 752 оболела од КРК указали су на чешћу локализацију тумора на левом колону (83,9%). Такође су указали да тумори десног колона имају лошију прогнозу због касније дијагнозе као и да су учесталији код жена (203). Гајтонд (*Gaitonde*) и сар. су дошли до сличних резултата у својој проспективној анализи на 858 оболелих од КРК где се деснострани локализација и женски пол повезују са лошијом прогнозом (204). У нашој студији болесници су у односу на локализацију тумора подељени на две групе. Прву групу чинили су болесници са туморском локализацијом на десном колону (цекум, колон асценденс, хепатична флексура и трансверзални колон), док су другу групу чинили болесници са тумором локализованим на левом колону (лијенална флексура, десцендентни колон и сигмоидни колон). У нашем истраживању, од укупног броја болесника тумор је био локализован код 68 (60,7%) на левом, а код преосталих 44 (39,3%) на десном колону. Приликом дистрибуције у односу на стадијум болести такође доминира левострани локализација тумора, како код болесника у I и II (31 болесник односно 55,4%), тако и код болесника у III стадијуму болести (37 болесника односно 66,1%). Преминација тумора левог колона међу болесницима у нашем истраживању је у складу са доступним подацима из литературе. Овакво поклапање са подацима великих студија на малом узорку какав је наш указује на адекватан одабир болесника и непристрасност приликом рандомизације (17, 26, 44, 54, 204, 212).

Клинички трајали попут *CALGB/SWOG 80405* поредили су утицај локализације примарног тумора на појаву релапса и укупно преживљавање. Подела је извршена на туморе десног и левог колона и то на тај начин што су туморима десног колона сматрани они који су локализовани проксимално од лијеналне флексуре док су туморима левог колона сматрани они који су се налазили проксимално од лијеналне флексуре. Подаци су узети из *The Surveillance Epidemiology and End Results Program (SEER)* дата базе а обухватили су 25.887 болесника у III стадијуму и 16.755 болесника у стадијуму IV болести. Показано је да су болесници са локализацијом тумора на десном колону имали значајно лошију прогнозу и краће преживљавање у односу на оне са локализацијом на левом колону, док дистрибуција на десни и леви колон у корелацији са стадијумом болести није показала статистички значајну корелацију (203, 204, 207, 212). У нашој студији је уочена статистички значајна разлика у односу на локализацију тумора и појаву релапса ( $p = 0,025$ ). Болесници са локализацијом тумора на левом колону имали су у значајни већем броју релапс болести (41 болесника са релапсом vs 27 болесника без релапса). Такође висока статистички значајна разлика је уочена унутар групе болесника у I и II стадијуму болести где су болесници са левостраном локализацијом тумора имали

чешћу појаву релапса ( $p = 0,004$ ). Унутар групе болесника у III стадијуму болести није уочена статистички значајна разлика. Према броју болесника укључених у студију, наш узорак се не може поредити са узорком поменутих популационих студија. Неслагање са поменутих подацима из литературе може се објаснити поделом болесника на групе у односу према релапсу болести у односу 1 : 1, податком да је највећи број болесника укључених у студију имао левострану локализацију тумора као и податком да је највећи проценат болесника у III стадијуму болести адјувантно третиран хемиотерапијом.

#### **5.4. Примена адјувантне хемиотерапије и њен утицај на појаву релапса болести**

Адјувантна хемиотерапија је стандард лечења код болесника у трећем стадијуму болести код којих је показала значајан ефекат на спречавање враћања болести и укупно преживљавање болесника (54, 124). У првом и другом стадијуму болести КРК адјувантна хемиотерапија није показала клинички значајан ефекат, осим у случају високоризичних болесника (лоше диферентован тумор, прегледано мање од 12 ЛЧ, лимфоваскуларна инвазија, хитна операција због опструкције или перфорације тумора (44, 53, 54, 94, 103, 125). До повратка болести долази у 30–50% случајева и то најчешће у виду удаљених метастаза. Према систему стејџинга *AJCC*, ризик од поновне појаве болести је повезан са стадијумом болести. Код већине болесника у првом стадијуму, болест се неће развити поново, док ће се код 20–25% болесника у другом стадијуму и код 40–50% болесника у трећем стадијуму болести, након иницијалног куративног третмана болести вратити (54). У нашем истраживању од укупног броја болесника, њих 54 (48,2%) лечено је хемиотерапијом, од тога њих 50 (89,3%) налазило се у трећем стадијуму болести док су само четири болесника (7,1%) који су се налазили у првом и другом стадијуму болести, примила хемиотерапију. Четири болесника у првом и другом стадијуму болести су примила хемиотерапију јер су спадали у помуну високорозичну групу док шест болесника из трећег стадијума болести није примило хемиотерапију због постојања коморбидитета и лошег *ECOG* (*Eastern Cooperative Oncology Group*) перформанс статуса. Имајући у виду висок проценат леталног исхода унутар првих пет година од операције код ових болесника, постоји потреба да се дефинише високоризична група нодус-негативних болесника за које се претпоставља да би могли имати користи од адјувантне хемиотерапије (105, 134). У нашој студији није уочена статистички значајна разлика у релапсу болести у односу на примену адјувантне хемиотерапије како код свих болесника тако ни унутар група подељених према стадијуму болести. У нашој студији болесници су одабирани према појави рецидива болести у односу 1 : 1 те се стога утицај адјувантне терапије није могао адекватно проценити.

#### **5.5. Матичне ћелије колоректалног карцинома**

Карциногенеза се карактерише кумулацијом генетских/епигенетских аберација која је мултиетапни процес. Аристидес (*Aristides*) и сарадници су у свом прегледном чланку о туморским матичним ћелијама представили два модела карциногенезе:



стохастички модел и модел канцерских матичних ћелија (КМЋ). Према стохастичкој рак настаје у ембрионално-сличним ћелијама, остајући у разним ткивима још из фазе ембриона да би се током живота развио карцином, односно свака ћелија у организму је способна да се развије у канцерску ћелију. Према моделу канцерских матичних ћелија, канцерске ћелије су хијерархијски организоване и само канцерске матичне ћелије могу индуковати настанак карцинома (139).

Канцерске матичне ћелије се одликују могућношћу самообнављања, мултипотентношћу, неограниченим пролиферативним потенцијалом и могућношћу избегавања имуносистема. На стандардну хемиотерапију КМЋ су високорезистентне и тиме директно одговорне за повратак болести путем експресије механизма обнове ДНК, детоксикајућих ензима и носача лекова (142). Молекуларни путеви, као што су винглес инт (*Wingless/Int – Wnt*) и нотч (*Notch*) и комплексна укрштања између микрооколине (нише матичних ћелија) и канцерских матичних ћелија инволвирани су у настанак колоректалног карцинома (186). Многи истраживачи су дошли до закључка да неке туморске ћелије морају имати одлике канцерских матичних ћелија да би прошле епителијално-мезенхималну баријеру која је одговорна за напредак инвазије канцерских ћелија кроз базалну мембрану у микрооколину укључујући и лимфоваскуларну инвазију – феномен који доводи до интра и екстравазације туморских ћелија (142, 194).

Према поменутиим подацима из литературе, КМЋ су одговорне за лош одговор на конвенционалну хемиотерапију будући да примењени агенси нису у стању да елиминишу резерве КМЋ. Узимајући у обзир да апроксимативно 20% болесника са одсуством метастаза у регионалним лимфним чворовима умире од враћања болести унутар пет година од операције примарног тумора неопходна су даља истраживања на пољу канцерских матичних ћелија у циљу откривања нове, ефикасније терапије (44, 54, 121, 140, 160, 166, 168, 186, 191–194).

Идентификација КМЋ остаје контроверза због недостатка општеприхваћених специфичних молекуларних маркера. Вишегодишњим истраживањем на пољу КМЋ предложено је неколико потенцијалних маркера за откривање КМЋ: *CD133*, *CD44*, *CD24*, *CD166*, *Lgr-5* и *ALDH-1* (121, 140). *CD133*, пентагони, трансмембранозни гликопротеин који се налази у ћелијској плазма мембрани први је предложени маркер КМЋ карцинома колоне и спомиње се у студијама Обрајена и Ричи-Винтијанија (134, 164). Сматрало се да је његова експресија повезана са лошијом прогнозом и ниском стопом преживљавања. Међутим, новији подаци указују на његову неспецифичност као маркера КМЋ карцинома колоне. *CD44*- ћелијски адхезивни молекул је предложен као алтернативни маркер. Експресија овог молекула је у корелацији са дубином инвазије, инфилтрацијом лимфних чворова, лошијом прогнозом и преживљавањем

(191 – 194). Према подацима из литературе комбинација експресије оба молекула (*CD133* и *CD44*) повећава сензитивност и специфичност у откривању канцерских матичних ћелија (121). Као додатни маркери КМЋ карцинома колона предложени су *CD24*, *CD166*, *Lgr-5* и *ALDH-1*. Њихова експресија се такође доводи у везу са стадијумом тумора, диференцијацијом, дубином инвазије, метастазирањем, прогнозом и преживљавањем. Плурипотентни гени *Oct-4*, *Sox-2*, *Nanog*, *Lin-28*, *Klf-4* и *C-myc* су нови обећавајући сурогат маркери (137, 139, 140–144, 150, 151, 160, 168).

Према нашим сазнањима, у литератури не постоје истраживања која су поредиле утицај присуства КМЋ на релапс приликом поделе болесника на стадијум болести. Овај податак наше истраживање чини оригиналним те ће на тај начин и резултати бити дискутовани.

Угледајући се на наводе из литературе са највишим нивоом доказа, а имајући у виду доступност реагенаса за маркере КМЋ на т-ржишту, за наше истраживање смо се одлучили за примену *CD44*, *Lgr5* и *CD166* у циљу идентификације КМЋ.

Као потенцијални маркер КМЋ *CD44* предложен је за неколико солидних карцинома укључујући карциноме дојке, панкреаса, главе и врата, крупноћелијског карцинома плућа и карцинома колона (172, 187). Дју (*Du*) и сарадници у свом истраживању на ксенографским моделима наводе да *CD44+* ћелије показују израженију могућност за формирање туморских колонија ин витро као и већи туморски потенцијал ин vivo (176). Контрoверзна су истраживања на пољу повезаности постојања *CD44+* ћелија, туморске прогресије и метастазирања код оболелих КРК. Студије Дјуа и сарадника, као и Наганоа (*Nagano*) и сарадника на ксенографским моделима показале су да је експресија *CD44* на туморским ћелијама повезана са туморском прогресијом и метастазирањем (176, 196). Њихови резултати нису потврђени у студијама Даласа (*Dallas*), Јланга (*Ylagan*) и Лаглија (*Lugli*) који туморску агресивност и метастазирање повезују са губитком експресије *CD44* а истраживања су такође вршена на имунодефицијентним мишевима (187, 197, 198). У нашој студији, од укупног броја болесника (112 болесника), код 90 су детектоване *CD44* позитивне ћелије. Иако резултати показују да је већи број болесника из групе која је имала релапс са више од 50% обојених ћелија у односу на групу у којој није дошло до релапса (14 болесника vs 7 болесника) као и да је већи број болесника у групи са релапсом са до 10% обојених ћелија у односу на групу без релапса (28 болесника vs 21 болесника) између поменутих група уочена је гранична статистички значајна разлика ( $p = 0,052$ ). Овакав резултат може се објаснити малим узорком болесника који су селектовани у односу 1 : 1 на појаву релапса болести као и различит утицај овог маркера у односу на стадијум болести.

Фан (*Fan*) и сарадници у својој метаанализи која је укључивала 17 студија на 3.098 оболелих од КРК наводе да се експресија *CD44* не доводи у везу са стадијумом болести али се може повезати са лошијим свеукупним преживљавањем (174). Фернандез и сарадници су спровели студију на 72 болесника оперисана од КРК. Проточном (*Flow*) цитометријском анализом су идентификовали *CD44+* ћелије. Просечним праћењем болесника од 30 месеци показали су да експресија *CD44* на површини ћелија јесте повезана са повећаном туморском пролиферацијом али не и са исходом болести. У групи болесника подељених према *Dukes* стадијуму болести, нису доказали статистичку значајност у појави релапса болести и укупног преживљавања (199).

У нашој студији, приликом корелације експресије *CD44* и релапса болести унутар групе болесника у I и II стадијуму болести уочена је висока статистички значајна разлика будући да су болесници са релапсом болести имали присуство *CD44+* ћелија већу од 50%. Овакав резултат може указати на потенцијални значај присуства *CD44* позитивних ћелија у предвиђању релапса болести и дужине преживљавања за болеснике у I и II стадијуму болести.

Значај интензитета обојености *CD44* маркера је испитиван у радовима Лија (*Li*) и Луа (*Luo*) на реналном и хепатоцелуларном карциному. Наиме Ли и сар. су у својој метаанализи на 1.672 болесника испитали утицај интензитета експресије *CD44* код карцинома бубрега где су дошли до закључка да је висок интензитет обојености *CD44* повезан са краћим преживљавањем без болести и свеукупним преживљавањем (213). Лу и сарадници су у својој мета анализи на укупно 2.235 болесника испитивали интензитет обојености *CD44* код хепатоцелуларног карцинома и показали да појачана експресија *CD44* нема утицаја на дужину преживљавања без болести али лоше утиче на свеукупно преживљавање (214). У литератури нису доступни подаци о радовима који су испитивали значај локализације тј. цитоплазматске или мембранске експресије *CD44* на дужину преживљавања болесника без болести и свеукупно преживљавање. Такође, према нашим сазнањима у доступној литератури не постоје студије које су испитивале утицај интензитета и локализације експресије *CD44* на релапс болести, дужину преживљавања без болести и свеукупно преживљавање код КРК. Постојање поменутих анализа оправдава анализу интензитета али и локализације обојености *CD44* маркера код КРК. Када је у питању интензитет обојености, у нашој студији је уочена статистички значајна разлика у односу на појаву релапса болести, где је у групи са умереним и slabим интензитетом обојености већи број болесника са релапсом. Статистички значајна разлика добијена је и приликом корелације локације експресије *CD44* у односу на релапс болести где је највећи број болесника са релапсом имао мембранску експресију *CD44*.

Приликом поређења просечних вредности дужине преживљавања без болести између група болесника подељених у категорије према процентуалној заступљености *CD44+* ћелија у нашој студији је добијена статистички значајна разлика ( $p = 0,022$ , односно болесници који нису имали *CD44+* ћелије имали су значајно дуже преживљавање без болести у односу на оне који су имали више од 50% обојених ћелија (74,50 месеци vs 40,19 месеци).

Поређењем просечних вредности дужине преживљавања без болести, изражених у месецима, унутар групе болесника који су били у I и II стадијуму болести, а између група подељених у категорије према процентуалној заступљености *CD44+* ћелија уочена је статистички значајна разлика ( $p = 0,019$ ). Унутар групе болесника у III стадијуму болести није уочена статистички значајна разлика у корелацији процентуалне заступљености *CD44+* ћелија и периода преживљавања без болести. Овакав податак указује на могућност употребе *CD44* не само као маркера КМћ већ и прогностичког фактора за болеснике у I и II стадијуму болести. Подаци наше анализе поклапају се са са подацима метаанализе Фана и сар. (174).

Приликом посматрања свеукупног преживљавања болесника у I и II стадијуму болести уочена је висока статистички значајна разлика у процентуалној заступљености *CD44+* ћелија. Болесници који су имали преко 50% обојених ћелија су имали значајно нижу вероватноћу преживљавања (најраније су умирали). Као што је споменуто раније у тексту, у студијама Фернандеза и Фана уочена је статистичка значајност *CD44+* ћелија на свеукупно преживљавање али ни у једној од поменутих студија није доказана статистичка значајност у групи болесника подељених према стадијуму болести (174, 199).

*CD166* је мезенхимални маркер матичних ћелија који је презентован као потенцијални комаркер за КМћ (168). У нашем истраживању имунохистохемијско бојење применом *CD166* моноклонског антитела је извршено код 80 болесника. Нисмо уочили статистички значајну разлику у корелацији појаве релапса и експресије *CD166* као ни приликом поделе болесника на групе према стадијуму болести. Приликом корелације експресије *CD166* и периода преживљавања без болести нисмо уочили статистичку значајност. У метаанализи која је укључивала 15 студија на 3.332 КРК болесника, Хан и сарадници нису повезали експресију *CD166* са дужином свеукупног преживљавања приликом мултиваријантне регресионе анализе података. Од поментих 15 студија које су биле укључене у анализу, само једна указује на могућност корелације експресије *CD166* и дужине свеукупног преживљавања за болеснике у II стадијуму болести (200). Приликом анализе података, у нашој студији, није добијена статистичка значајност у кривама вероватноће дужине преживљавања како у групи свих болесника тако ни унутар група подељених према стадијуму болести у односу на

процентуалну заступљеност *CD166+* ћелија.

Према нашим сазнањима у литератури не постоје радови који испитују повезаност интезитета бојења ћелија *CD166* антителима са преживљавањем. У нашој студији добијена је статистичка значајност у кривама вероватноће преживљавања у групи болесника подељених према интезитету обојености *CD166* ћелија при чему болесници са великим интензитетом ћелија имају значајно нижу вероватноћу преживљавања. Статистичка значајност у кривама вероватноће преживљавања је добијена и унутар групе болесника у I и II стадијуму болести, где болесници са великим интензитетом обојености ћелија *CD166* антителима имају значајно нижу вероватноћу преживљавања. Унутар групе болесника у III стадијуму болести није уочена статистички значајна разлика у кривама вероватноће преживљавања у вези са интезитетом обојености ћелија. Овакав резултат може указати на потенцијални значај интезитета обојености ћелија *CD166* антителима у предвиђању дужине преживљавања за болеснике у I и II стадијуму болести. Ипак, овакав резултат треба узети са резервом будући да интензитет бојења у имунохистохемији зависи од бројних преаналитичких и аналитичких фактора приликом припреме ткива као и приликом самог третирања ткива имунохистохемијским препаратима (квалитет хемикалија тј. квалитет примарног и секундарног антителима као и хромогеног супстрата).

Иако је у наводима из литературе *CD166* је представљен као ћелијски адхезивни молекул чија је највећа активност у мембрани ћелије, не постоје радови који указују на повезаност локализације експресије *CD166* са вероватноћом преживљавања (187, 200). У нашој студији, у групи свих болесника, као и унутар група болесника подељених према стадијуму болести нисмо добили статистичку значајност између криви вероватноћа преживљавања подељених у односу на локализацију експресије *CD166* антителима.

На основу ксенографских модела Далерба и сарадници су дошли до сазнања да је коекспресија *CD166* и *CD44* повезана са јачом туморигенезом (157). Лугли и сарадници у свом истраживању тврде да тумори који показују губитак експресије *CD166* или *CD44* имају лошију прогнозу (187). Као што је споменуто раније у тексту, ова истраживања су спроведена на ксенографским моделима те можемо направити само индиректно поређење њихових резултата са добијеним резултатима наше студије.

Приликом испитивања утицаја коекспресије *CD166* и *CD44* на појаву релапса болести, уочена је висока статистички значајна разлика у односу на проценталну заступљеност *CD166/CD44+* ћелија, при чему је значајно већи број болесника са релапсом (92,9%) имало више од 50% *CD166/CD44* позитивних КМЋ. С обзиром да је коекспресија *CD166* и *CD44* дала већу значајност разлике у односу на било који појединачни маркер самтрамо да се на овај начин потврђује и клинички значај њихове

коегзистенције. Овакав резултат се индиректно слаже са резултатима Далербе и сарадника (157).

Посматрањем процентуалне заступљености *CD166/CD44+* ћелија у односу на период преживљавања без болести уочена је статистички значајна разлика. Болесници који су имали мањи проценат заступљености *CD166/CD44+* ћелија (до 10% и између 10% и 50% обојених ћелија) имали су значајно дужи период преживљавања без болести изражен у месецима у односу на болеснике код којих је процентуална заступљеност *CD166/CD44+* ћелија била преко 50% (65,44 месеци vs 27,85 месеци). Статистичка значајност у дужини преживљавања без болести у односу на процентуалну заступљеност *CD166/CD44+* ћелија је добијена и унутар групе болесника у I и II стадијуму болести. Болесници са мањом процентуалном заступљеношћу *CD166/CD44+* ћелија имали су дуже преживљавање без болести мерено у месецима. Овакав податак указује на могућност употребе одређивања процентуалне заступљености *CD166/CD44+* ћелија у прогностичком моделу оболелих од КРК.

У групи свих болесника, између болесника подељених према процентуалној заступљености *CD166/CD44+* ћелија уочена је статистички значајна разлика у кривама вероватноће преживљавања, при чему су болесници са више од 50% обојених ћелија имали значајно нижу вероватноћу преживљавања. Статистичка значајност утицаја процентуалне заступљености *CD166/CD44+* ћелија на криву вероватноће преживљавања је добијена и унутар групе болесника у I и II стадијуму болести, док је у групи болесника у III стадијуму болести статистичка значајност изостала. Добијени подаци у нашој студији указују на потенцијалну примену процентуалне заступљености *CD166/CD44+* у предвиђању вероватноће преживљавања за болеснике у I и II стадијуму болести.

Мерло-Суарез (*Merlos-Suárez*) и сарадници су испитивали експресију *Lgr5* у идентификацији ИМЋ и КМЋ на имунодефицијентном мишу као и њен значај. У својој кохортној студији на 340 болесника оболелих од КРК јасно су повезали повећану експресију *Lgr5* са релапсом болести, лошијом прогнозом и лошије диферентованим тумором. Показано је да је експресија овог члана породице хормонских рецептора гликопротеина има удела у туморогенези у смислу инвазивности и метастазама у лимфним чворовима (182, 184, 186).

У нашем истраживању није уочена статистички значајна разлика везана за експресију *Lgr5* у појави релапса. Иако је код болесника у III стадијуму болести (болесници са метастазама у ЛЧ) највећи број њих са појавом релапса имао више од 50% позитивних ћелија (17 болесника vs 16 болесника) са веома великим интензитетом обојености (6 болесника vs 1 болесника), статистичка значајност није добијена. Ђанг

(*Jiang*) и сарадници у својој метаанализи, која је укључивала 12 студија и 2.600 оболелих од КРК, повезују повећану експресију *Lgr5* са краћим свеукупним преживљавањем и периодом преживљавања без болести. Ђанг и сар. такође наводе да је повећана експресија *Lgr5* повезана са вишим стадијумом болести (према *AJCC* критеријумима) али анализе у групи болесника подељених према стадијуму болести (I и II стадијум *vs* III стадијум) нису вршене ни у једној студији која је била саставни део поменутог метаанализе (184).

Према нашим сазнањима у литератури не постоје радови који испитују повезаност интензитета и локализације *Lgr5* са преживљавањем. У нашој студији приликом корелације интензитета обојености и дужине преживљавања без болести, статистичка значајност је уочена само унутар групе болесника у I и II стадијуму болести. Болесници који су имали јачи интензитет обојености ћелија *Lgr5* имали су дуже преживљавање без болести.

Вермулен, Баркер (*Vermeulen, Barker*) и њихови сарадници у својим истраживањима на ксенографским моделима и на ткиву здравог и туморски измењеног колона, наводе да је експресија *Lgr5* повезана са повећаним потенцијалом туморогенезе, метастазирањем и лошијим свеукупним преживљавањем (150, 156, 182). Шеперс (*Scherers*) и сарадници потврђују ове наводе у свом истраживању на имунодефицијентном мишу (181). Чен (*Chen*) и сарадници у својој метаанализи која је укључивала седам студија и 1.883 оболела од КРК повезују повећану експресију *Lgr5*+ ћелија са краћим свеукупним преживљавањем и периодом преживљавања без болести (182). У нашем истраживању, приликом посматрања болесника подељених према процентуалној заступљености *Lgr5*+ ћелија, уочена је висока статистички значајна разлика у кривама вероватноће преживљавања, како на средини, тако и касније у времену ( $p = 0,021$ , *Log Rank* = 9,687), при чему болесници који имају мање од 10% обојених ћелија имају већу вероватноћу свеукупног преживљавања у поређењу са болесницима са 10–50% односно преко 50% *Lgr5* антителима обојених ћелија. Унутар група подељених на стадијуме болести нисмо уочили статистички значајну разлику у кривама вероватноће преживљавања. Познато је да *Lgr5* испољава своје функције на ћелијској мембрани (150, 156, 181–184). Иако у литератури не постоје радови који повезују локализацију обојености *Lgr5* у ћелији са вероватноћом преживљавања, у нашем истраживању је добијен податак да болесници са мембранским и комбиновано обојеним ћелијама имају значајно нижу вероватноћу преживљавања у односу на групе ћелија са цитоплазматски обојеним и необојеним ћелијама. Овај налаз је потребно узети с резервом будући да интензитет, а понекад, и локализација обојености ћелија антителима зависи од преаналитичких и аналитичких фактора. Статистичка значајност у локализацији обојености ћелија добијена је и унутар групе болесника у I и II стадијуму болести. Унутар групе болесника у III стадијуму болести није уочена статистичка

значајност везана за локализацију обојености ћелија *Lgr5* антителимом.

Аристидес и сарадници у свом прегледном чланку, који је базиран на истраживањима која су спроведена на ксенографским моделима и препаратима туморског ткива, наводе повезаност експресије *CD44*, *CD166* и *Lgr5* са лошијом прогнозом и краћим свеукупним преживљавањем (139). Иако смо у нашем раду указали на повезаност процентуалне заступљености *CD44+* ћелија и појаве релапса болести нисмо уочили статистички значајну разлику у процентуалној заступљености *CD44+* код болесника код којих је наступила смрт као последица релапса. Статистичка значајност није уочена ни приликом посматрања корелације експресије *CD166*, *Lgr5* и *CD44/CD166+* ћелија и смртог исхода насталог као последица релапса болести.

Као што је приказано у радовима Мерло-Суареза, Луглија и других постоје бројни фактори ризика за релапс и смрт као последицу релапса након куративне операције КРК (186, 187).

У нашој студији мултиваријантном анализом фактора није добијена статистички значајна разлика у настанку релапса болести и смрти као последице релапса везана за старост, пол, број позитивних ЛЧ, стадијум болести, лимфоваскуларну инвазију, перинеуралну инвазију, присуство муцина и некрозе у тумору и присуство *Lgr5*, *CD166*, *CD44/CD166* позитивних ћелија. Поменутом анализом фактора ризика за настанак релапса болести и смрти, као последице релапса, у нашој студији је утврђено да само детектоване *CD44+* ћелије представљају статистички значајан фактор ризика за настанак релапса и смрти као последице релапса.

Мултиваријантном Кокс пропорционалном регресионом анализом утврђено је да унутар групе болесника у I и II стадијуму болести од свих поменутих фактора ризика само детектоване *CD44+* ћелије представљају статистички значајан фактор ризика за настанак релапса и смрти као последице релапса док статистичка значајност унутар групе болесника у III стадијуму болести није утврђена. Овакав податак се поклапа са резултатима студије Далерба и сарадника али не и подацима популационих студија и метаанализа који су поменуте факторе окарактерисали као факторе ризика за релапс болести. Такође, постојање статистичке значајности у групи болесника у I и II стадијуму болести указује на потенцијалну могућност употребе *CD44+* ћелија, а нарочито у комбинацији са *CD166*, као предиктивног фактора ризика за релапс и смрт као последицу релапса болести. Овај налаз указује на потребу за интензивнијим мониторингом ризичних група болесника као и потребу за циљаном терапијом у будућности (44, 54, 144, 157, 160).



## 6. ЗАКЉУЧЦИ

Освртом на претходна поглавља ове дисертације у којима смо исказали хипотезе и потребе за нашим истраживањем а потом их поткрепили резултатима нашег истраживања и упоредили са релевантним подацима из доступне литературе, можемо изнети следеће закључке:

1. Болесници у првом и другом стадијуму карцинома колоне при релапсу болести имају већу процентуалну заступљеност CD44+ и CD44/CD166+ канцерских матичних ћелија у поређењу са оболелима у истом стадијуму болести који нису имали релапс.
2. Нисмо доказали утицај експресије ниједног коришћеног маркера канцерских матичних ћелија на релапс болести код болесника у трећем стадијуму болести.
3. Висока процентуална заступљеност CD44+ и CD44/CD166+ канцерских матичних ћелија код болесника у првом и другом стадијуму болести је повезана са краћим периодом преживљавања без болести док се већа процентуална заступљеност Lgr5 показала као позитивни предиктивни фактор.
4. Нисмо доказали утицај експресије ниједног маркера који је коришћен у студији за идентификацију канцерских матичних ћелија код болесника у трећем стадијуму болести на дужину преживљавања без болести.
5. Висока процентуална заступљеност (преко 50% обојених ћелија) CD44+ ћелија, а поготово коекспресија CD166/CD44+ ћелија, може се користити као поуздан маркер за идентификацију канцерских матичних ћелија карцинома колоне и као прогностички фактор релапса болести, дужине преживљавања без болести и свеукупног преживљавања за болеснике у првом и другом стадијуму болести.

**7. ЛИТЕРАТУРА**

1. Marvin C. Rectal Prolapse or Procidentia. In: Marvin C, editor. Colon and Rectal Surgery. 5th ed. New York: Lippincott Williams & Wilkins; 2005.
2. Wexner S, Maricio J. Anatomy and Embryology of the Anus, Rectum and Colon. In: Marvin C, editor. Colon and Rectal Surgery. 5th ed. New York: Lippincott Williams & Wilkins; 2005. p. 1–30.
3. Muldoon J. History of colorectal surgery. In: Mazie r W, Levien D, MA L, Senagore A, editors. Surgery of the Colon, Rectum, and Anus. illustrate. Philelphia: WB Saunders; 1995.
4. Faure S, Santa Barbara P. Molecular Embryology of the Foregut. JPGN, 2011.
5. Feldman M, Friedman LS, Brandt LJ. Sleisenger and Fortran’s Gastrointestinal and Liver Disease. 9th ed. Philadelphia, PA: Elsevier Health Sciences; 2010.
6. Kleinman RE, Goulet OJ, Mieli-Vergani G, et al. Walker’s Pediatric GI Disease. 5th edition ed. Hamilton, Ontario: BC Decker, Inc; 2008.
7. Newgreen D, Young H. Enteric Nervous System: Development and Developmental Disturbances—Part 1. Pediatric and Developmental Pathology 5, 2002.
8. Newgreen D, Young H. Enteric Nervous System: Development and Developmental Disturbances—Part 2. Pediatric and Developmental Pathology 5, 2002.
9. Skandalakis JE, Colbon GL, Weidman T, Foster R. Large Intestine and Anorectum. In: Skandalakis JE, Colbon GL, Weidman T, Foster R, editors. Skandalakis’ Surgical Anatomy: the embryologic and anatomic basis of modern surgery [Internet]. McGraw-Hill Education; 2004. p. 861. Available from: <http://books.google.rs/books?id=TSFkPgAACAAJ>
10. Strouse P. Disorders of intestinal rotation and fixation (“malrotation”). Pediatr Radiol. 2004;34:837–51.
11. Kluth D, Jaeschke-Melli S, Fiegel H. The Embryology of Gut Rotation. Seminars in Pediatric Surgery. 2003;12:275–9.
12. Borley NR. Gastrointestinal tract - Large intestine. In: Standring S, Ellis H, Healy JC, Johnson D, Williams A, editors. Gray’s Anatomy. 39th ed. London: Elsevier churchill livingstone; 2008. p. 1170–212.
13. Anson B, McVay C. Surgical Anatomy. 5th ed. Anson B, McVay C, editors. Philelphia: Saunders; 1971.
14. Capius P, Bokey L, Fahrer M, Al E. Mobilization of the rectum: anatomic concepts and the bookshelf revisited. Dis Colon Rectum. 2002;45(1’9).
15. Krivokapić Z, Dimitrijević I, Barišić G. Anatomija i fiziologija rektuma i analnog kanala. In: Krivokapić Z, editor. Karcinom rektuma. 1st ed. Beograd: Zavod za udžbenike; 2012. p. 23’36.

16. Jeremić M, Stojanović M, Stanojević G, Višnjić M. Abdominalna hirurgija II. Prvo izdanje. Niš: Medicinski fakultet u Nišu; 2009. p. 691'849.
17. John R. Goldblum, Laura W. Lamps, Jesse K. McKenney, Jeffrey L Myers - Rosai and Ackerman's Surgical Pathology [chapter 13-22] (2017, Elsevier).
18. Shamsuddin AM, Phelps PC, Trump BF. Human large intestinal epithelium: light microscopy, histochemistry, and ultrastructure. Hum Pathol. 1982;13(9):790-803.
19. Patai Á. Serrated pathway: Alternative route to colorectal cancer. World Journal of Gastroenterology. 2013;19(5):607.
20. Wu ML, Zhao X. Multinucleated stromal giant cells in colonic lamina propria. Histopathology. 2007;50(5):584-590.
21. O'Leary AD, Sweeney EC. Lymphoglandular complexes of the colon: structure and distribution. Histopathology. 1986;10(3):267-283.
22. Brunicaudi F, Anderson D. Schwartz's principles of surgery. 10th Edition. New York: McGraw-Hill; 2015. p 1176'1239.
23. Cancer of the Colon and Rectum - Cancer Stat Facts [Internet]. SEER. 2019 [cited 23 Jun 2019]. Available from: <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/colorect.html> Colorectal cancer statistics [Internet]. World Cancer Research Fund. 2019 [cited 18 September 2019]. Available from: <https://www.wcrf.org/dietandcancer/cancer-trends/colorectal-cancer-statistics>
24. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel R, Torre L, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA: A Cancer Journal for Clinicians. 2018;68(6):394-424.
25. ARC – INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER [Internet]. Iarc.fr. 2019 [cited 19 September 2019]. Available from: <https://www.iarc.fr/>
26. Dugandžija T, Kukić B. Etiologija, distribucija i prevencija raka debelog creva. 2014. Novi Sad.
27. IOPHOS - Batut :: Home [Internet]. Batut.org.rs. 2019 [cited 19 September 2019]. Available from: <http://www.batut.org.rs/index.php?lang=2>
28. Miladinov-Mikov M, Gudurić B. Epidemiologij raka debelog creva i rektuma u Vojvodini. In: Gudurić B, Breberina M, Jovanović D, editors. Rak debelog creva u Vojvodini. 1st ed. Novi Sad: Stojkov; 2009. p. 9–18.
29. Šipetić Grujičić S, Krivokapić Z. Epidemiološke i etiološke karakteristike rak kolona i rektuma. In: Krivokapić Z, editor. Karcinom rektuma. 1st ed. Beograd: Zavod za udžbenike; 2012. p. 37–53.
30. Center MM, Jemal A, Ward E. International trends in colorectal cancer incidence rates. Cancer epidemiology, biomarkers & prevention: a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology [Internet]. 2009 Jun [cited 2019 Sep 19];18(6):1688–94. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19505900>

31. Center MM, Jemal A, Smith RA, Ward E. Worldwide variations in colorectal cancer. *CA: a cancer journal for clinicians* [Internet]. [cited 2019 Sep 19];59(6):366–78. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19897840>
32. Bardou M, Barkun AN, Martel M. Obesity and colorectal cancer. *Gut* [Internet]. 2013 Mar 12 [cited 2019 Sep 19]; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23481261>
33. Giovannucci E. Modifiable risk factors for colon cancer. *Gastroenterology clinics of North America* [Internet]. 2002 Dec [cited 2019 Sep 19];31(4):925–43. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12489270>
34. Bray F, Sankila R, Ferlay J, Parkin DM. Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 1995. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)* [Internet]. 2002 Jan [cited 2019 Sep 19];38(1):99–166. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11750846>
35. Slattery ML, Potter JD. Physical activity and colon cancer: confounding or interaction? *Medicine and science in sports and exercise* [Internet]. 2002 Jun [cited 2019 Sep 19];34(6):913–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12048315>  
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3561276&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
36. Ruder EH, Laiyemo AO, Graubard BI, Hollenbeck AR, Schatzkin A, Cross AJ. Non-steroidal anti-inflammatory drugs and colorectal cancer risk in a large, prospective cohort. [Am J Gastroenterol. 2011; 106\(7\): 1340–1350.](#)
37. Scaringi S, Di Martino C, Zambonin D, Fazi M, Canonico G, Leo F, et al. Colorectal cancer and Crohn's colitis: clinical implications from 313 surgical patients. *World journal of surgery* [Internet]. 2013 Apr [cited 2019 Sep 20];37(4):902–10. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23381673>
38. Umar A, Boland CR, Terdiman JP, Syngal S, De la Chapelle A, Rüschoff J, et al. Revised Bethesda Guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability. *Journal of the National Cancer Institute* [Internet]. 2004 Feb 18 [cited 2019 Sep 20];96(4):261–8. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2933058&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
39. Kouraklis G, Misiakos EP. Hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome): criteria for identification and management. *Digestive diseases and sciences* [Internet]. 2005 Feb [cited 2019 Sep 20];50(2):336–44. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15745097>
40. Nagorni A. Genetski faktori u nastanku raka debelog creva i rektuma. In: Gudurić B, Breberina M, Jovanović D, editors. *Rak debelog creva u Vojvodini*. 1st ed. Novi Sad: Stojkov; 2009. p. 26–39.
41. Leslie A, Carey FA, Pratt NR, Steele RJC. The colorectal adenoma-carcinoma sequence. *The British journal of surgery* [Internet]. 2002 Jul [cited 2019 Sep 20];89(7):845–60. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12081733>

41. Bond JH. Polyp guideline: diagnosis, treatment, and surveillance for patients with colorectal polyps. *The American Journal of Gastroenterology* [Internet]. 2000 Nov [cited 2019 Sep 20];95(11):3053–63. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11095318>
42. Bond JH. Colon polyps and cancer. *Endoscopy* [Internet]. 2005 Mar [cited 2019 Sep 20];37(3):208–12. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15731935>
43. Zauber AG, Winawer SJ, O'Brien MJ, Lansdorp-Vogelaar I, Van Ballegooijen M, Hankey BF, et al. Colonoscopic polypectomy and long-term prevention of colorectal-cancer deaths. *The New England journal of medicine* [Internet]. 2012 Feb 23 [cited 2019 Sep 20];366(8):687–96. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3322371&tool=pmcentrez&endertype=abstract>
44. Schmoll H, Van Cutsem E, Stein A, Valentini V, Glimelius B, Haustermans K et al. ESMO Consensus Guidelines for management of patients with colon and rectal cancer. A personalized approach to clinical decision making. *Annals of Oncology*. 2012;23(10):2479-2516.
45. Knychalski B, Lukieńczyk T. The evaluation of diagnostic value of the tumor markers: CCSA-2 and CEA in colorectal cancer. *Polski przegląd chirurgiczny* [Internet]. 2012 Feb [cited 2019 Sep 20];84(2):86–92. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22487741>
46. Lin J-K, Lin C-C, Yang S-H, Wang H-S, Jiang J-K, Lan Y-T, et al. Early postoperative CEA level is a better prognostic indicator than is preoperative CEA level in predicting prognosis of patients with curable colorectal cancer. *International journal of colorectal disease* [Internet]. 2011 Sep [cited 2019 Sep 20];26(9):1135–41. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21538056>
47. Stojadinovic A, Avital I, Steele S. Special issue on precision risk stratification-based screening in colorectal cancer. *Journal of Cancer* [Internet]. 2013 Jan [cited 2019 Sep 20];4(3):170–1. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3584830&tool=pmcentrez&endertype=abstract>
48. Rockey DC, Paulson E, Niedzwiecki D, Davis W, Bosworth HB, Sanders L, et al. Analysis of air contrast barium enema, computed tomographic colonography, and colonoscopy: prospective comparison. *Lancet* [Internet]. [cited 2019 Sep 20];365(9456):305–11. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15664225>
49. Chung S-Y, Park SH, Lee SS, Lee JH, Kim AY, Park S-K, et al. Comparison between CT colonography and double-contrast barium enema for colonic evaluation in patients with renal insufficiency. *Korean journal of radiology: official journal of the Korean Radiological Society* [Internet]. [cited 2019 Sep 20];13(3):290–9. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3337865&tool=pmcentrez&endertype=abstract>

50. Halligan S, Wooldrage K, Dadswell E, Kralj-Hans I, Von Wagner C, Edwards R, et al. Computed tomographic colonography versus barium enema for diagnosis of colorectal cancer or large polyps in symptomatic patients (SIGGAR): a multicentre randomised trial. *Lancet* [Internet]. 2013 Feb 13 [cited 2019 Sep 20]; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23414648>
51. Lučić M, Miučin-Vukdinović I, Lučić S, Spirovski M, Kozarski D. Savremena dijagnostika i određivanje stepena proširenosti raka debelog creva i rektuma. In: Gudurić B, Breberina M, Jovanović D, editors. *Rak debelog creva u Vojvodini*. 1st ed. Novi Sad: Stojkov; 2009. p. 92–107.
52. Kukić B. Savremena dijagnostika i određivanje stepena proširenosti raka debelog creva i rektuma. In: Gudurić B, Breberina M, Jovanović D, editors. *Rak debelog creva u Vojvodini*. 1st ed. Novi Sad: Stojkov; 2009. p. 107–16.
53. Edge S, Edge S. *AJCC cancer staging manual 8th ed*. New York: Springer; 2017.
54. NCCN- National Comprehensive Cancer Network. [Internet]. *Nccn.org*. 2019 [cited 20 September 2019]. Available from: [https://www.nccn.org/store/login/login.aspx?ReturnURL=https://www.nccn.org/professionals/physician\\_gls/pdf/colon.pdf](https://www.nccn.org/store/login/login.aspx?ReturnURL=https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/colon.pdf)
55. Knežević-Ušaj S. Patološke i molekularno-biološke karakteristike raka debelog creva i rektuma. In: Gudurić B, Breberina M, Jovanović D, editors. *Rak debelog creva u Vojvodini*. 1st ed. Novi Sad: Stojkov; 2004. p. 66–92.
56. Loeb LA. A mutator phenotype in cancer. *Cancer research* [Internet]. 2001 Apr 15 [cited 2019 Sep 21];61(8):3230–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11309271>
57. Pritchard CC, Grady WM. Colorectal cancer molecular biology moves into clinical practice. *Gut* [Internet]. 2011 Jan [cited 2019 Sep 21];60(1):116–29. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3006043&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
58. Laurent-Puig P, Agostini J, Maley K. [Colorectal oncogenesis]. *Bulletin du cancer* [Internet]. 2010 Nov [cited 2019 Sep 21];97(11):1311–21. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21115420>
59. Gupta S, Balasubramanian B, Fu T, Genta R, Rockey D, Lash R. Polyps With Advanced Neoplasia Are Smaller in the Right Than in the Left Colon: Implications for Colorectal Cancer Screening. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*. 2012;10(12):1395-1401.e2.
60. Antonić V, Stojadinović A, Kester KE, Weina PJ, Brücher BL, Protić M, et al. Significance of infectious agents in colorectal cancer development. *Journal of Cancer* [Internet]. 2013 Jan [cited 2013 Mar 17];4(3):227–40. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3584836&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

61. De Smedt L, Lemahieu J, Palmans S, et al. Microsatellite instable vs stable colon carcinomas: analysis of tumour heterogeneity, inflammation and angiogenesis. *Br J Cancer*. 2015;113(3):500-509.
62. Walsh MD, Clendenning M, Williamson E, et al. Expression of MUC2, MUC5AC, MUC5B, and MUC6 mucins in colorectal cancers and their association with the CpG island methylator phenotype. *Mod Pathol*. 2013;26(12):1642-1656.
63. Database G. APC Gene - GeneCards | APC Protein | APC Antibody [Internet]. *GeneCards.org*. 2019 [cited 23 September 2019]. Available from: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=APC>
64. De Jesus-Monge W, Gonzalez-Keelan C, Zhao R, Hamilton S, Rodriguez-Bigas M, Cruz-Correa M. Mismatch repair protein expression and colorectal cancer in Hispanics from Puerto Rico. *Familial Cancer*. 2009;9(2):155-166.
65. Nowak JA, Yurgelun MB, Bruce JL, Rojas-Rudilla V, Hall DL, Shivdasani P, Garcia EP et al. Detection of mismatch repair deficiency and microsatellite instability in colorectal adenocarcinoma by targeted next-generation sequencing. *J Mol Diagn*. 2017;19:84-91.
66. Stadler ZK, Battaglin F, Middha S, Hechtman JF, Tran C, Cercek A, Yaeger R, et al. Reliable detection of mismatch repair deficiency in colorectal cancers using mutational load in next-generation sequencing panels. *J Clin Oncol*. 2016; 34:2141-7.
67. Grady WM, Markowitz SD. The molecular pathogenesis of colorectal cancer and its potential application to colorectal cancer screening. *Dig Dis Sci*. 2015;60(3): 762-772.
68. KRAS Q61P - My Cancer Genome [Internet]. *Mycancergenome.org*. 2019 [cited 23 September 2019]. Available from: <https://www.mycancergenome.org/content/alteration/kras-q61p/#Colorectal%20Carcinoma>
69. Ren J, Li G, Ge J, et al. Is K-ras gene mutation a prognostic factor for colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *Dis Colon Rectum*. 2012;55(8):913-923.
70. Database G. BRAF Gene - GeneCards | BRAF Protein | BRAF Antibody [Internet]. *GeneCards.org*. 2019 [cited 23 September 2019]. Available from: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=BRAF&keywords=raf>
71. Brabletz T, Jung A, Reu S, et al. Variable beta-catenin expression in colorectal cancers indicates tumorprogression driven by the tumor environment. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001;98(18):10356-10361.
72. Rodrigues NR, Rowan A, Smith ME, et al. p53 mutations in colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1990;87(19):7555-7559.
73. Tuppurainen K, Makinen JM, Junttila O, et al. Morphology and microsatellite instability in sporadic serrated and non-serrated colorectal cancer. *J Pathol*. 2005;207(3): 285-294.
74. Hinoi T, Tani M, Lucas PC, et al. Loss of CDX2 expression and microsatellite instability are prominent features of large cell minimally differentiated carcinomas of the colon. *Am J Pathol*. 2001;159(6):2239-2248.

75. Compton CC, Henson DE, Hutter R V, Sobin LH, Bowman HE. Updated protocol for the examination of specimens removed from patients with colorectal carcinoma. A basis for checklists. Archives of pathology & laboratory medicine [Internet]. 1997 Dec [cited 2019 Sep 23];121(12):1247–54. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9431313>
76. 1. [Internet]. Documents.cap.org. 2020 [cited 25 January 2020]. Available from: <https://documents.cap.org/protocols/cp-gilower-colonrectum-17protocol-4010.pdf>
77. Lankshear S, Srigley J, McGowan T, Yurcan M, Sawka C. Standardized Synoptic Cancer Pathology Reports: So What and Who Cares? A Population-Based Satisfaction Survey of 970 Pathologists, Surgeons, and Oncologists. Archives of pathology & laboratory medicine [Internet]. 2013 Feb 21 [cited 2019 Sep 23]; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23432456>
78. Fielding LP, Arsenault PA, Chapuis PH, Dent O, Gathright B, Hardcastle JD, et al. Clinicopathological staging for colorectal cancer: an International Documentation System (IDS) and an International Comprehensive Anatomical Terminology (ICAT). Journal of gastroenterology and hepatology [Internet]. [cited 2019 Sep 23];6(4):325–44. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1912440>
79. Aust DE. [WHO classification 2010 for the lower gastrointestinal tract: what is new?]. Der Pathologe [Internet]. 2011 Nov [cited 2019 Sep 23];32 Suppl 2:326–31. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21915662>
80. Tumor Grade - National Cancer Institute [Internet]. [cited 2019 Mar 23]. Available from: <http://www.cancer.gov/cancertopics/factsheet/detection/tumor-grade>
81. UICC TNM | UICC. 2016. [cited 2017 Apr 24]. Available from: <http://www.uicc.org/resources/tnm>
82. Dukes C. Histological grading of rectal cancer: (Section of Pathology). Proc R Soc Med. 1937;30(4):371-376.
83. Terese Winslow LLC, Medical and Scientific Illustration [Internet]. Terese Winslow LLC, Medical and Scientific Illustration. 2020 [cited 27 January 2020]. Available from: <https://www.teresewinslow.com/>
84. Lee Y, Kim H, Jung K, Cho Y, Yun S, Lee W et al. Oncologic Outcomes of Stage IIIA Colon Cancer for Different Chemotherapeutic Regimens. Journal of the Korean Society of Coloproctology. 2012;28(5):259.
85. Chang GJ, Kaiser AM, Mills S, et al. Practice parameters for the management of colon cancer. Diseases of the colon and rectum. Aug 2012;55(8):831-843.
86. Panarelli NC, Schreiner AM, Brandt SM, Shepherd NA, Yantiss RK. Histologic features and cytologic techniques that aid pathologic stage assessment of colonic adenocarcinoma. The American journal of surgical pathology. Aug 2013;37(8):1252-1258.
87. Schumacher P, Dineen S, Barnett C, et al. The metastatic lymph node ratio predicts survival in colon cancer. Am J Surg. 2007;194(6):827-831, discussion 831-832.



88. Derwinger K, Carlsson G, Gustavsson B. A study of lymph node ratio as a prognostic marker in colon cancer. *Eur J Surg Oncol.* 2008;34(7):771-775.
89. Lo DS, Pollett A, Siu LL, et al. Prognostic significance of mesenteric tumor nodules in patients with stage III colorectal cancer. *Cancer.* 2008;112(1):50-54.
90. Puppa G, Maisonneuve P, Sonzogni A, et al. Pathological assessment of pericolonic tumor deposits in advanced colonic carcinoma: relevance to prognosis and tumor staging. *Mod Pathol.* 2007;20(8):843-855.
91. Bilchik A, Nissan A, Wainberg Z, et al. Surgical quality and nodal ultrastaging is associated with long-term disease-free survival in early colorectal cancer: an analysis of 2 international multicenter prospective trials. *Ann Surg.* 2010;252(3):467-474, discussion 474-476.
92. Faerden AE, Sjo OH, Bukholm IRK, et al. Lymph node micrometastases and isolated tumor cells influence survival in stage I and II colon cancer. *Dis Colon Rectum.* 2011;54(2):200-206.
93. Koebrugge B, Bosscha K, Liefers G-J, et al. Can micrometastases be used to predict colon cancer prognosis? Hopes for the EnRoute+ study. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol.* 2011;5(5):559-561.
94. Protic M, Stojadinovic A, Nissan A, et al. Prognostic Effect of Ultra-Staging Node-Negative Colon Cancer Without Adjuvant Chemotherapy: A Prospective National Cancer Institute-Sponsored Clinical Trial. *Journal of the American College of Surgeons.* Sep 2015;221 (3):643-651.
95. Le Voyer T, Sigurdson E, Hanlon A, Mayer R, Macdonald J, Catalano P et al. Colon Cancer Survival Is Associated With Increasing Number of Lymph Nodes Analyzed: A Secondary Survey of Intergroup Trial INT-0089. *Journal of Clinical Oncology.* 2003;21(15):2912-2919.
96. Jin M, Roth R, Rock JB, Washington MK, Lehman A, Frankel WL. The Impact of Tumor Deposits on Colonic Adenocarcinoma AJCC TNM Staging and Outcome. *The American journal of surgical pathology.* 2015;39( 1): 109-115.
97. Chen VW, Hsieh MC, Charlton ME, et al. Analysis of stage and clinical/prognostic factors for colon and rectal cancer from SEER registries: AJCC and collaborative stage data collection system. *Cancer.* 2014;120(S23):3793-3806.
98. Lemmens VE, Klaver YL, Verwaal VJ, Rutten HJ, Coebergh JWW, de Hingh IH. Predictors and survival of synchronous peritoneal carcinomatosis of colorectal origin: A populationbased study. *International Journal of Cancer.* 2011;128(11): 2717-2725.
99. Segelman J, Granath F, Holm T, Machado M, Mahteme H, Martling A. Incidence, prevalence and risk factors for peritoneal carcinomatosis from colorectal cancer. *British Journal of Surgery.* 2012;99(5):699-705.
100. Franko J, Shi Q, Goldman CD. et al. Treatment of colorectal peritoneal carcinomatosis with systemic chemotherapy: a pooled analysis of north central cancer

- treatment group phase III trials N9741 and N9841. *Journal of Clinical Oncology*. 2012;30(3):263-267.
101. Compton CC, Fielding LP, Burgart LJ, et al. Prognostic factors in colorectal cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999. *Arch Pathol Lab Med*. 2000;124(7):979-994.
  102. Sato T, Ueno H, Mochizuki H, et al. Objective criteria for the grading of venous invasion in colorectal cancer. *Am J Surg Pathol*. 2010;34(4):454-462.
  103. Santos C, Lopez-Doriga A, Navarro M, et al. Clinicopathological risk factors of stage II colon cancer: results of a prospective study. *Colorectal Disease*. 2013; 15(4):414-422.
  104. Lim S-B, Yu CS, Jang SJ, Kim TW, Kim JH, Kim JC. Prognostic significance of lymphovascular invasion in sporadic colorectal cancer. *Diseases of the colon & rectum*. 2010;53(4):377-384.
  105. Betge J, Pollheimer MJ, Lindtner RA, et al. Intramural and extramural vascular invasion in colorectal cancer. *Cancer*. 2012; 118(3):628-638.
  106. Liebig C, Ayala G, Wilks J, et al. Perineural invasion is an independent predictor of outcome in colorectal cancer. *Journal of clinical oncology*. 2009;27(31):5131-5137.
  107. Alexander J, Watanabe T, Wu TT, et al. Histopathological identification of colon cancer with microsatellite instability. *Am J Pathol*. 2001;158(2):527-535.
  108. Pavlopoulou A, Scorilas A. A comprehensive phylogenetic and structural analysis of the carcinoembryonic antigen (CEA) gene family. *Genome biology and evolution*. 2014;6(6): 1314-1326.
  109. Locker GY, Hamilton S, Harris J. et al. ASCO 2006 update of recommendations for the use of tumor markers in gastrointestinal cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 2006;24(33):5313-5327.
  110. Ristić S, Puhalo-Sladoje D, Tošović D. Tumorski markeri. *Biomedicinska istraživanja*. 2013;4(2).
  111. Ogino S, Meyerhardt JA, Irahara N, et al. KRAS mutation in stage III colon cancer and clinical outcome following intergroup trial CALGB 89803. *Clinical Cancer Research*. 2009; 15(23): 7322-7329.
  112. Allegra CJ, Jessup JM, Somerfield MR, et al. American Society of Clinical Oncology provisional clinical opinion: testing for KRAS gene mutations in patients with metastatic colorectal carcinoma to predict response to anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody therapy. *Journal of Clinical Oncology*. 2009;27(12):2091-2096.
  113. Petrelli F, Coiu A, Cabiddu M, Ghilardi M, Barni S. KRAS as prognostic biomarker in metastatic colorectal cancer patients treated with bevacizumab: a pooled analysis of 12 published trials. *Medical oncology*. 2013;30(3): 1-8.

114. Souglakos J, Philips J, Wang R, et al. Prognostic and predictive value of common mutations for treatment response and survival in patients with metastatic colorectal cancer. *British journal of cancer*. 2009; 101(3):465-472.
115. Ooki A, Akagi K, Yatsuoka T, et al. Combined microsatellite instability and BRAF gene status as biomarkers for adjuvant chemotherapy in stage III colorectal cancer. *Journal of surgical oncology*. 2014; 110(8):982-988.
116. Pietrantonio F, Petrelli F, Coinu A, et al. Predictive role of BRAF mutations in patients with advanced colorectal cancer receiving cetuximab and panitumumab: A meta-analysis. *European journal of cancer*. 2015;51(5):587-594.
117. Estrella JS, Tetzlaff MT, Bassett RL, Jr., et al. Assessment of BRAF V600E Status in Colorectal Carcinoma: Tissue-Specific Discordances between Immunohistochemistry and Sequencing. *Mol Cancer Ther*. Dec 2015; 14( 12);2887-2895.
118. Zaanani A, Cuilliere-Dartigues P, Guilloux A, et al. Impact of p53 expression and microsatellite instability on stage III colon cancer disease-free survival in patients treated by 5-fluorouracil and leucovorin with or without oxaliplatin. *Annals of oncology*. 2010; 21(4):772-780.
119. Kuwabara K, Kumamoto K, Ishibashi K, Ohsawa T, Kumagai Y, Baba H, et al. [Clinical significance of serum anti-p53 antibody measurement for colorectal cancer]. *Gan to kagaku ryoho. Cancer & chemotherapy [Internet]*. 2012 Nov [cited 2019 Sep 27];39(12):2167–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23268012>
120. Summers T, Langan RC, Nissan A, Brücher BLD, Bilchik AJ, Protic M, et al. Serum-based DNA methylation biomarkers in colorectal cancer: potential for screening and early detection. *Journal of Cancer [Internet]*. 2013 Jan [cited 2019 Sep 27];4(3):210–6. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3584834&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
121. Langan R, Mullinax J, Raiji M, Upham T, Summers T, Stojadinovic A et al. Colorectal Cancer Biomarkers and the Potential Role of Cancer Stem Cells. *Journal of Cancer*. 2013;4(3):241-250.
122. Shackelford R, Yeo C, DeMeester S, McFadden D, Matthews J, Fleshman J. *Shackelford's surgery of the alimentary tract*. Philadelphia: Elsevier; 2019.
123. De Gramont A, Van Cutsem E, Schmoll H-J, Tabernero J, Clarke S, Moore MJ, et al. Bevacizumab plus oxaliplatin-based chemotherapy as adjuvant treatment for colon cancer (AVANT): a phase 3 randomised controlled trial. *The lancet oncology [Internet]*. 2012 Dec [cited 2019 Sep 27];13(12):1225–33. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23168362>
124. Beck D, Roberts P, Saclarides T, Senagore A, Stamos M, Wexner S. *The ASCRS Textbook of Colon and Rectal Surgery*. New York, NY: Springer Science+Business Media, LLC; 2011. p. 716-718.

125. Venook A, Niedzwiecki D, Lenz H, Innocenti F, Mahoney M, O'Neil B et al. CALGB/SWOG 80405: Phase III trial of irinotecan/5-FU/leucovorin (FOLFIRI) or oxaliplatin/5-FU/leucovorin (mFOLFOX6) with bevacizumab (BV) or cetuximab (CET) for patients (pts) with KRAS wild-type (wt) untreated metastatic adenocarcinoma of the colon or rectum (MCRC). *Journal of Clinical Oncology*. 2014;32(18\_suppl):LBA3-LBA3.
126. Zhu D, Yang Z, Miao X, Yang W, Jiang M, Chen Y. Association of Serum Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) with Colorectal Cancer: A Systemic Review and Meta-Analysis. *Journal of Cancer Science and Clinical Therapeutics*. 2019;04(01).
127. Zong S, Li H, Shi Q, Liu S, Li W, Hou F. Prognostic significance of VEGF-C immunohistochemical expression in colorectal cancer: A meta-analysis. *Clinica Chimica Acta*. 2016;458:106-114.
128. Arnold D, Lueza B, Douillard J, Peeters M, Lenz H, Venook A et al. Prognostic and predictive value of primary tumour side in patients with RAS wild-type metastatic colorectal cancer treated with chemotherapy and EGFR directed antibodies in six randomized trials. *Annals of Oncology*. 2017;28(8):1713-1729.
129. Rowland A, Dias M, Wiese M, Kichenadasse G, McKinnon R, Karapetis C et al. Meta-analysis comparing the efficacy of anti-EGFR monoclonal antibody therapy between KRAS G13D and other KRAS mutant metastatic colorectal cancer tumours. *European Journal of Cancer*. 2016;55:122-130.
130. Eyler, C. E., and J. N. Rich. "Survival of the Fittest: Cancer Stem Cells in Therapeutic Resistance and Angiogenesis. *Journal of Clinical Oncology*. 2008; 2839-845.
131. Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, et al: Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*. 2001; 414:105-111.
132. Wicha MS, Liu S, Dontu G: Cancer stem cells: An old idea—A paradigm shift. *Cancer Res*. 2006; 66:1883-1890.
133. Dylla SJ, Beviglia L, Park IK, Chartier C, Raval J, Ngan L, Pickell K, Aguilar J, Lazetic S, Smith-Berdan S, Clarke MF, Hoey T, Lewicki J, Gurney AL. Colorectal cancer stem cells are enriched in xenogeneic tumors following chemotherapy. 2008; 3:e2428.
134. Ricci-Vitiani, Lucia, Eros Fabrizi, Elisabetta Palio, and Ruggero De Maria. Colon cancer stem cells. *Journal of Molecular Medicine*. 2009; 1097-104.
135. Boman BM, Huang E. Human colon cancer stem cells: A new paradigm in gastrointestinal oncology. *J Clin Oncol* 2008;26:2828–2838

136. Vries RG, Huch M, Clevers H. Stem cells and cancer of the stomach and intestine. *Mol Oncol* 2010;4:373–384
137. Medema JP, Vermeulen L. Microenvironmental regulation of stem cells in intestinal homeostasis and cancer. *Nature* 2011;474:318–326..)
138. Paul S. and Cameron P. Colorectal cancer stem cells. *ANZ J Surg* 79 2009; 697-702
139. Vaiopoulos, Aristides G., Ioannis D. Kostakis, Michael Koutsilieris, and Athanasios G. Papavassiliou. Colorectal Cancer Stem Cells. *Stem Cells*. 2012; 363-71.
140. Papailiou J, Bramis KJ, Gazouli M et al. Stem cells in colon cancer. A new era in cancer theory begins. *Int J Colorectal Dis* 2011;26:1–11.
141. Garza-Treviño E, Said-Fernández S, Martínez-Rodríguez H. Understanding the colon cancer stem cells and perspectives on treatment. *Cancer Cell International*. 2015;15(1):2.
142. Salama P, Platell C. Colorectal cancer stem cells. *ANZ Journal of Surgery*. 2009;79(10):697-702.
143. Todaro M, Francipane MG, Medema JP et al. Colon cancer stem cells: Promise of targeted therapy. *Gastroenterology* 2010;138:2151–2162.
144. Valent P, Bonnet D, De Maria R, Lapidot T, Copland M, Melo J et al. Cancer stem cell definitions and terminology: the devil is in the details. *Nature Reviews Cancer*. 2012;12(11):767-775.
145. Willis N, Przyborski S, Hutchison C, Wilson R. Colonic and colorectal cancer stem cells: progress in the search for putative biomarkers. *Journal of Anatomy*. 2008;213(1):59-65.
146. Kayahara T, Sawada M, Takaishi S, Fukui H, Seno H, Fukuzawa H, Suzuki K, Hiai H, Kageyama R, Okano H, Chiba T. Candidate markers for stem and early progenitor cells, Musashi-1 and Hes1, are expressed in crypt base columnar cells of mouse small intestine. *FEBS Lett* 2003;535:131–135.
147. Holmberg J, Genander M, Halford MM, Anneren C, Sondell M, Chumley MJ, Silvany RE, Henkemeyer M, Frisen J. EphB receptors coordinate migration and proliferation in the intestinal stem cell niche. *Cell* 2006;125:1151–1163.
148. Sangiorgi E, Capecchi MR. Bmi1 is expressed in vivo in intestinal stem cells. *Nat Genet* 2008;40:915–920.
149. Batlle E, Bacani J, Begthel H, Jonkheer S, Gregorieff A, van de Born M, Malats N, Sancho E, Boon E, Pawson T, Gallinger S, Pals S, Clevers H. EphB receptor activity suppresses colorectal cancer progression. *Nature* 2005;435:1126–1130.
150. Barker N, van Es JH, Kuipers J, Kujala P, van den Born M, Cozijnsen M, Haegebarth A, Korving J, Begthel H, Peters PJ, Clevers H. Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene Lgr5. *Nature* 2007;449:1003–1007.
151. Avital I, Summers T, Steele S, Waldman S, Nissan A, Bilchik A et al.

- Colorectal cancer stem cells as biomarkers: Where it all starts?. *Journal of Surgical Oncology*. 2013;107(8):791-793.
152. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000;100(1):57–70.
153. Huang EH, Hynes MJ, Zhang T et al. Aldehyde dehydrogenase 1 is a marker for normal and malignant human colonic stem cells (SC) and tracks SC overpopulation during colon tumorigenesis. *Cancer Res* 2009;69:3382–3389.
154. Hardwick JC, Kodach LL, Offerhaus GJ et al. Bone morphogenetic protein signalling in colorectal cancer. *Nat Rev Cancer* 2008;8:806–812.
155. Burness ML, Sipkins DA. The stem cell niche in health and malignancy. *Semin Cancer Biol* 2010;20:107–115.
156. Vermeulen L, De Sousa EMF, van der Heijden M et al. Wnt activity defines colon cancer stem cells and is regulated by the microenvironment. *Nat Cell Biol* 2010;12:468–476.
157. Dalerba P, Cho RW, Clarke MF. Cancer stem cells: models and concepts. *Annu Rev Med*. 2007;58:267–84.
158. Ashley N, Yeung TM, Bodmer WF. Stem cell differentiation and lumen formation in colorectal cancer cell lines and primary tumors. *Cancer Res*. 2013;73(18):5798–809.
159. Yang, C., Shi, X., Huang, Y., Zhang, Z., Cooke, H.J., Wang, M., et al. Rapid proliferation of daughter cells lacking particular chromosomes due to multipolar mitosis promotes clonal evolution in colorectal cancer cells. *Cell Cycle* 2012; 11, 2650–2659.
160. Munro, M.J., Wickremesekera, S.K., Peng, L., Tan, S.T., Itinteang, T., Cancer stem cells in colorectal cancer: a review. *J. Clin. Pathol*. 2017; 1–7.
161. Chruścik A, Gopalan V, Lam A. The clinical and biological roles of transforming growth factor beta in colon cancer stem cells: A systematic review. *European Journal of Cell Biology*. 2018;97(1):15-22.
162. Tirino, V.; Desiderio, V.; Paino, F.; Papaccio, G.; de Rosa, M. Methods for cancer stem cell detection and isolation. *Methods Mol. Biol*. 2012, 879, 513–529.
163. Deng S, Yang X, Lassus H, et al. Distinct expression levels and patterns of stem cell marker, aldehyde dehydrogenase isoform 1 (ALDH1), in human epithelial cancers. *PloS one* 2010;5:e10277.
164. O'Brien, C.A., Kreso, A., Ryan, P., Hermans, K.G., Gibson, L., Wang, Y., Tsatsanis, A., Gallinger, S., and Dick, J.E. ID1 and ID3 regulate the self renewal capacity of human colon cancer-initiating cells through p21. *Cancer Cell* 2012;21. 777–792.

165. [Feras J. Abdul Khalek](#), [G. Ian Gallicano](#), and [Lopa Mishra](#). Colon Cancer Stem Cells. [Gastrointest Cancer Res](#). 2010;1:S16–S23.
166. Zeuner A, Todaro M, Stassi G, De Maria R. Colorectal Cancer Stem Cells: From the Crypt to the Clinic. *Cell Stem Cell*. 2014;15(6):692-705.
167. Hatano Y, Fukuda S, Hisamatsu K, Hirata A, Hara A, Tomita H. Multifaceted Interpretation of Colon Cancer Stem Cells. *International Journal of Molecular Sciences*. 2017;18(7):1446.
168. Fanali C. Cancer stem cells in colorectal cancer from pathogenesis to therapy: Controversies and perspectives. *World Journal of Gastroenterology*. 2014;20(4):923.
169. Miraglia S, Godfrey W, Yin AH, Atkins K, Warnke R, Holden JT, Bray RA, Waller EK, Buck DW. A novel five-transmembrane hematopoietic stem cell antigen: isolation, characterization, and molecular cloning. *Blood* 1997; 90:5013-5021
170. Mohammadi M, Bzorek M, Bonde JH, Nielsen HJ, Holck S. The stem cell marker CD133 is highly expressed in sessile serrated adenoma and its borderline variant compared with hyperplastic polyp. *J Clin Pathol* 2013; 66: 403-408
171. Fan CW, Chen T, Shang YN, Gu YZ, Zhang SL, Lu R, OuYang SR, Zhou X, Li Y, Meng WT, Hu JK, Lu Y, Sun XF, Bu H, Zhou ZG, Mo XM. Cancer-initiating cells derived from human rectal adenocarcinoma tissues carry mesenchymal phenotypes and resist drug therapies. *Cell Death Dis* 2013; 4:e828
172. Ylagan LR, Scholes J, Demopoulos R. Cd44: a marker of squamous differentiation in adenosquamous neoplasms. *Arch Pathol Lab Med* 2000; 124: 212-215
173. Dylla SJ, Beviglia L, Park IK, Chartier C, Raval J, Ngan L, Pickell K, Aguilar J, Lazetic S, Smith-Berdan S, Clarke MF, Hoey T, Lewicki J, Gurney AL. Colorectal cancer stem cells are enriched in xenogeneic tumors following chemotherapy. *PLoS One* 2008; 3: e2428
174. Fan CW, Wen L, Qiang ZD, Chen T, Zhou ZG, Mo XM, Hu JK. Prognostic significance of relevant markers of cancer stem cells in colorectal cancer - a meta analysis. *Hepato-gastroenterology*, 2012, 59(117):1421-1427
175. Yeung TM, Gandhi SC, Wilding JL, Muschel R, Bodmer WF. Cancer stem cells from colorectal cancer-derived cell lines. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107: 3722-3727
176. Du L, Wang H, He L, Zhang J, Ni B, Wang X, Jin H, Cahuzac N, Mehrpour M, Lu Y, Chen Q. CD44 is of functional importance for colorectal cancer stem cells. *Clin Cancer Res* 2008;14: 6751-6760
177. Hadjimichael C, Chanoumidou K, Papadopoulou N, et al. Common stemness regulators of embryonic and cancer stem cells. *World J Stem Cells* 2015;7:1150–84
178. Ibrahim EE, Babaei-Jadidi R, Saadeddin A, et al. Embryonic NANOG activity defines colorectal cancer stem cells and modulates through AP1- and TCF-dependent mechanisms. *Stem Cells* 2012;30:2076–87.

179. Wang X, Xia B, Liang Y, et al. Membranous ABCG2 expression in colorectal cancer independently correlates with shortened patient survival. *Cancer Biomark* 2013;13:81–8
180. Xu X, Chai S, Wang P, et al. Aldehyde dehydrogenases and cancer stem cells. *Cancer Lett* 2015;369:50–7.
181. Schepers AG, Snippert HJ, Stange DE, et al. Lineage tracing reveals Lgr5+ stem cell activity in mouse intestinal adenomas. *Science* 2012;337:730–5
182. Chen Q, Zhang X, Li W, Ji Y, Cao H, Zheng P. Prognostic Value of LGR5 in Colorectal Cancer: A Meta-Analysis. *PLoS ONE*. 2014;9(9):e107013.
183. Zhou Y, Xia L, Wang H, Oyang L, Su M, Liu Q et al. Cancer stem cells in progression of colorectal cancer. *Oncotarget*. 2017;9(70).
184. Jiang Y, Li W, He X, Zhang H, Jiang F, Chen Z. Lgr5 expression is a valuable prognostic factor for colorectal cancer: evidence from a meta-analysis. *BMC Cancer*. 2015;15(1).
185. Whitehead RH, Demmler K, Rockman SP, Watson NK. Clonogenic growth of epithelial cells from normal colonic mucosa from both mice and humans. *Gastroenterology*. 1999;117:858–865.
186. Merlos-Suárez, Anna, Francisco M. Barriga, Peter Jung, Mar Iglesias, María Virtudes Céspedes, David Rossell, Marta Sevillano, Xavier Hernando-Momblona, Victoria Da Silva-Diz, Purificación Muñoz, Hans Clevers, Elena Sancho, Ramón Mangués, and Eduard Batlle. The Intestinal Stem Cell Signature Identifies Colorectal Cancer Stem Cells and Predicts Disease Relapse. *Cell Stem Cell*. 2011; 511-24.
187. Lugli A, Iezzi G, Hostettler I, Muraro MG, Mele V, Tornillo L, Carafa V, Spagnoli G, Terracciano L, Zlobec I. Prognostic impact of the expression of putative cancer stem cell markers CD133, CD166, CD44s, EpCAM, and ALDH1 in colorectal cancer. *Br J Cancer* 2010; 103: 382-390
188. Potten CS, Kellett M, Roberts SA, et al. Measurement of in vivo proliferation in human colorectal mucosa using bromodeoxyuridine. *Gut*. 1992. 33:71-78.
189. Wahab S, Islam F, Gopalan V, Lam A. The Identifications and Clinical Implications of Cancer Stem Cells in Colorectal Cancer. *Clinical Colorectal Cancer*. 2017;16(2):93-102.
190. Choi D, Lee H, Hur K, Kim J, Park G, Jang S et al. Cancer stem cell markers CD133 and CD24 correlate with invasiveness and differentiation in colorectal adenocarcinoma. *World Journal of Gastroenterology*. 2009;15(18):2258.
191. De Angelis M, Zeuner A, Policicchio E, Russo G, Bruselles A, Signore M et al. Cancer Stem Cell-Based Models of Colorectal Cancer Reveal Molecular Determinants of Therapy Resistance. *STEM CELLS Translational Medicine*. 2016;5(4):511-523.
192. Giammona A, Mangiapane L, Di Franco S, Benfante A, Todaro M, Stassi G.



- Innovative Therapeutic Strategies Targeting Colorectal Cancer Stem Cells. *Current Colorectal Cancer Reports*. 2017;13(2):91-100.
193. Longley DB, Johnston PG. Molecular mechanisms of drug resistance. *J Pathol*. 2005;205(2):275–92
194. Thiery JP, Acloque H, Huang RY, Nieto MA. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell*. 2009;139(5):871–90.
195. Du L, Wang H, He L, Zhang J, Ni B, Wang X, Jin H, Cahuzac N, Mehrpour M, Lu Y, Chen Q. CD44 is of functional importance for colorectal cancer stem cells. *Clin Cancer Res* 2008;14: 6751-6760
196. Nagano O, Saya H. Mechanism and biological significance of CD44 cleavage. *Cancer Sci* 2004; 95: 930-935
197. Dallas MR, Liu G, Chen WC, Thomas SN, Wirtz D, Huso DL, Konstantopoulos K. Divergent roles of CD44 and carcinoembryonic antigen in colon cancer metastasis. *FASEB J* 2012; 26: 2648-2656
198. Ylagan LR, Scholes J, Demopoulos R. Cd44: a marker of squamous differentiation in adenosquamous neoplasms. *Arch Pathol Lab Med* 2000; 124: 212-215
199. Fernández JC, Vizoso FJ, Corte MD, Gava RR, Corte MG, Suárez JP, García-Muñiz JL, García-Morán M. CD44s expression in resectable colorectal carcinomas and surrounding mucosa. *Cancer Invest* 2004; 22: 878-885
200. Han S, Yang W, Zong S, Li H, Liu S, Li W et al. Clinicopathological, prognostic and predictive value of CD166 expression in colorectal cancer: a meta-analysis. *Oncotarget*. 2017;8(38).
201. [Shahriar Shafaei](#), [Majid Sharbatdaran](#), [Ghodsieh Kamrani](#), [Soraya Khafri](#) The association between CD166 detection rate and clinicopathologic parameters of patients with colorectal cancer. *Caspian J Intern Med*. 2013; 4(4): 768–772.
202. Tachezy M, Zander H, Gebauer F, Marx A, Kaifi J, Izbicki J et al. Activated leukocyte cell adhesion molecule (CD166)—Its prognostic power for colorectal cancer patients. *Journal of Surgical Research*. 2012;177(1):e15-e20.
203. Topdagi O, Timuroglu A. Eighteen Years' Retrospective Review of Colorectal Cancer Cases in Eastern Population. *The Eurasian Journal of Medicine*. 2018;50(1):19-22.
204. Gaitonde S, Nissan A, Protić M, Stojadinovic A, Wainberg Z, Chen D et al. Sex-Specific Differences in Colon Cancer when Quality Measures Are Adhered to: Results from International, Prospective, Multicenter Clinical Trials. *Journal of the American College of Surgeons*. 2017;225(1):85-92.
205. Medical Subject Headings - Home Page [Internet]. U.S. National Library of Medicine. National Institutes of Health; [cited 2020Jan6]. Available from: <https://www.nlm.nih.gov/mesh/meshhome.html>
206. Alexander M, Lin J, Shriver C, McGlynn K, Zhu K. Age and Lymph Node

- Positivity in Patients With Colon and Rectal Cancer in the US Military Health System. *Diseases of the Colon & Rectum*. 2019;:1.
207. Kaplan M, Ozaydin S, Yerlikaya H, Karaagac M, Gumus M, Cil T et al. Clinicopathologic and Prognostic Differences between Three Different Age Groups (Child/Adolescent, Young Adults, and Adults) of Colorectal Cancer Patients: A Multicentre Study. *Oncology Research and Treatment*. 2019;42(10):516-522.
208. Robinson J, Newcomb P, Hardikar S, Cohen S, Phipps A. Stage IV colorectal cancer primary site and patterns of distant metastasis. *Cancer Epidemiology*. 2017;48:92-95.
209. Wong S, Jalaludin B, Henderson C, Morgan M, Berthelsen A, Issac M et al. Direct Tumor Invasion in Colon Cancer: Correlation with Tumor Spread and Survival. *Diseases of the Colon & Rectum*. 2008;51(9):1331-1338.
210. Baxter N, Virnig D, Rothenberger D, Morris A, Jessurun J, Virnig B. Lymph Node Evaluation in Colorectal Cancer Patients: A Population-Based Study. *JNCI Journal of the National Cancer Institute*. 2005;97(3):219-225.
211. Ueno H, Kajiwara Y, Shimazaki H, Shinto E, Hashiguchi Y, Nakanishi K et al. New Criteria for Histologic Grading of Colorectal Cancer. *The American Journal of Surgical Pathology*. 2012;36(2):193-201.
212. Schrag D, Weng S, Brooks G, Meyerhardt J, Venook A. The relationship between primary tumor sidedness and prognosis in colorectal cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 2016;34(15\_suppl):3505-3505.
213. Li X, Ma X, Chen L, Gu L, Zhang Y, Zhang F et al. Prognostic value of CD44 expression in renal cell carcinoma: a systematic review and meta-analysis. *Scientific Reports*. 2015;5(1).
214. Luo Y, Tan Y. Prognostic value of CD44 expression in patients with hepatocellular carcinoma: meta-analysis. *Cancer Cell International*. 2016;16(1).

## План третмана података

<b>Назив пројекта/истраживања</b>
Клинички значај идентификације туморских матичних ћелија у ткиву аденокарцинома колоне
<b>Назив институције/институција у оквиру којих се спроводи истраживање</b>
а) Медицински факултет Нови Сад б) Институт за онкологију Војводине в) Клиника за оперативну онкологију г) Служба за патолошко – анатомску и лабораторијску дијагностику
<b>Назив програма у оквиру ког се реализује истраживање</b>
Пројекат финансиран од стране Покрајинског секретаријата за високо образовање и научноистраживачку делатност:  „Дистрибуција и клинички значај канцерских матичних ћелија код карцинома дебелог црева“  Број решења: 1114-451-690/2016-01  Једногодишњи пројекат, 2016. година
<b>1. Опис података</b>
<b>1.1 Врста студије</b>
<i>Укратко описати тип студије у оквиру које се подаци прикупљају</i>
<u>докторска дисертација</u>
<b>1.2 Врсте података</b>
а) квантитативни
б) квалитативни

## 1.3. Начин прикупљања података

- a) анкете, упитници, тестови
- б) клиничке процене, медицински записи, електронски здравствени записи
- в) генотипови: навести врсту \_\_\_\_\_
- г) административни подаци: навести врсту \_\_\_\_\_
- д) узорци ткива: ресецирани аденокарцином дебелог црева
- ђ) снимци, фотографије: фотографије парафинских пресека тумора дебелог црева бојених стандарном хематоксилин-еозин методом у Служби за патолошко – анатомску и лабораторијску дијагностику Института за Онкологију Војводине
- е) текст, навести врсту \_\_\_\_\_ литература \_\_\_\_\_
- ж) мапа, навести врсту \_\_\_\_\_
- з) остало: описати \_\_\_\_\_ експериментални подаци \_\_\_\_\_

## 1.3 Формат података, употребљене скале, количина података

## 1.3.1 Употребљени софтвер и формат датотеке:

- a) Excel фајл, датотека \_\_\_\_\_ .xlsx, .csv \_\_\_\_\_
- б) SPSS фајл, датотека \_\_\_\_\_ .spv, .sav \_\_\_\_\_
- в) PDF фајл, датотека \_\_\_\_\_ .pdf \_\_\_\_\_
- г) Текст фајл, датотека \_\_\_\_\_ .docx \_\_\_\_\_
- д) JPG фајл, датотека \_\_\_\_\_ jpg, .jpeg, .png, .tif \_\_\_\_\_
- е) Остало, датотека \_\_\_\_\_

## 1.3.2. Број записа (код квантитативних података)

- a) број варијабли \_\_\_\_\_ 42 \_\_\_\_\_
- б) број мерења (испитаника, процена, снимака и сл.) \_\_\_\_\_ 112 \_\_\_\_\_

## 1.3.3. Поновљена мерења

а) да

б) не

Уколико је одговор да, одговорити на следећа питања:

а) временски размак измедју поновљених мера је 3 месеца

б) варијабле које се више пута мере односе се на релапс болести

в) нове верзије фајлова који садрже поновљена мерења су именоване као Excel фајл 1, датотека - xlsx, .csv

Напомене: \_\_\_\_\_

*Да ли формати и софтвер омогућавају дељење и дугорочну валидност података?*

а) Да

б) Не

*Ако је одговор не, образложити* \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

**2. Прикупљање података**

## 2.1 Методологија за прикупљање/генерисање података

2.1.1. У оквиру ког истраживачког нацрта су подаци прикупљени?

а) експеримент, навести тип: мерење интезитета експресије туморских матичних ћелија у ресекату примарног аденокарицнома молона

б) корелационо истраживање, навести тип: регресиона анализа прикупљених експерименталних података

ц) анализа текста, навести тип прикупљање података из литературе

д) остало, навести шта \_\_\_\_\_

2.1.2 Навести врсте мерних инструмената или стандарде података специфичних за одређену научну дисциплину (ако постоје).

Узорци туморског ткива добијени хируршком ресекцијом су били фиксирани у 10% неутралном пуферисаном формалину и укалупљени у парафин, а затим сечени на пресеке дебљине 4 микрона. Парафински пресеци су бојени стандарном хематоксилин-еозин методом и анализирани од стране патолога светлосним микроскопом. Репрезентативни узорци туморског ткива, добијени на описани начин, су накнадно третирани у имуностеинеру, марке Вентана, применом моноклонских антитела на CD44 (anti-human CD44, разблажење 1:1000, rabbit anti-human, Sigma, St. Louis, USA), CD166 (anti-human CD166, разблажење 1:40, rabbit anti-human, Abcam, Cambridge, U.K.) и  $\alpha$ -Lgr5 (anti-human CD44, разблажење 1:500, rabbit anti-human, Sigma, St. Louis, USA). Време инкубације за свако антитело зависило је од фабричких препорука или установљених тзв. *in-house* инкубационих времена. Интензитет и проценат обојених туморских ћелија су анализирани семиквантитативно на светлосном микроскопу марке Олимпус.

2.2 Квалитет података и стандарди

2.2.1. Третман недостајућих података

а) Да ли матрица садржи недостајуће податке? Да (Не)

Ако је одговор да, одговорити на следећа питања:

а) Колики је број недостајућих података? \_\_\_\_\_

б) Да ли се кориснику матрице препоручује замена недостајућих података? Да Не

в) Ако је одговор да, навести сугестије за третман замене недостајућих података

2.2.2. На који начин је контролисан квалитет података? Описати

Квалитет података је контролисан применом статистичких тестова и одбацивањем екстрема и валидацијом експериментално добијеним подацима.

2.2.3. На који начин је извршена контрола уноса података у матрицу?

Контрола уноса података у матрицу је изведена поређењем добијених података са литературним подацима

**3. Третман података и пратећа документација**

## 3.1. Третман и чување података

3.1.1. Подаци ће бити депоновани у Репозиторијум докторских дисертација на Универзитету у Новом Саду

3.1.2. URL адреса <https://cris.uns.ac.rs/searchDissertations.jsf>

---

3.1.3. DOI

---

3.1.4. Да ли ће подаци бити у отвореном приступу?

а)  Да

б) Да, али после ембарга који ће трајати до \_\_\_\_\_

в) Не

Ако је одговор не, навести разлог \_\_\_\_\_

3.1.5. Подаци неће бити депоновани у репозиторијум, али ће бити чувани.

Образложење

---

---

---

## 3.2 Метаподаци и документација података

3.2.1. Који стандард за метаподатке ће бити примењен?

---

3.2.1. Навести метаподатке на основу којих су подаци депоновани у репозиторијум.

---

---

Ако је потребно, навести методе које се користе за преузимање података, аналитичке и процедуралне информације, њихово кодирање, детаљне описе варијабли, записа итд.

### 3.3 Стратегија и стандарди за чување података

3.3.1. До ког периода ће подаци бити чувани у репозиторијуму?

3.3.2. Да ли ће подаци бити депоновани под шифром?  Да  Не

3.3.3. Да ли ће шифра бити доступна одређеном кругу истраживача?  Да  Не

3.3.4. Да ли се подаци морају уклонити из отвореног приступа после извесног времена?

Да  Не

Образложити

## 4. Безбедност података и заштита поверљивих информација

Овај одељак МОРА бити попуњен ако ваши подаци укључују личне податке који се односе на учеснике у истраживању. За друга истраживања треба такође размотрити заштиту и сигурност података.

### 4.1 Формални стандарди за сигурност информација/података



Истраживачи који спроводе испитивања с људима морају да се придржавају Закона о заштити података о личности ([https://www.paragraf.rs/propisi/zakon\\_o\\_zastiti\\_podataka\\_o\\_licnosti.html](https://www.paragraf.rs/propisi/zakon_o_zastiti_podataka_o_licnosti.html)) и одговарајућег институционалног кодекса о академском интегритету.

4.1.2. Да ли је истраживање одобрено од стране етичке комисије?  Да  Не

Ако је одговор Да, навести датум и назив етичке комисије која је одобрила истраживање

Етичка комисија Института за онкологију Војводине 08.02.2017.

Етичка комисија Медицинског факултета Универзитета у Новом Саду 02.03.2017.

4.1.2. Да ли подаци укључују личне податке учесника у истраживању? Да  Не

Ако је одговор да, наведите на који начин сте осигурали поверљивост и сигурност информација везаних за испитанике:

- а) Подаци нису у отвореном приступу
  - б) Подаци су анонимизирани
  - ц) Остало, навести шта
- 
- 

## 5. Доступност података

### 5.1. Подаци ће бити

- а) јавно доступни
- б) доступни само уском кругу истраживача у одређеној научној области
- ц) затворени

Ако су подаци доступни само уском кругу истраживача, навести под којим условима могу да их користе:

Ако су подаци доступни само уском кругу истраживача, навести на који начин могу приступити подацима:

5.4. Навести лиценцу под којом ће прикупљени подаци бити архивирани.

Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима

## 6. Улоге и одговорност

6.1. Навести име и презиме и мејл адресу власника (аутора) података

Милана Кресоја Игњатовић, milanakresoja@gmail.com

6.2. Навести име и презиме и мејл адресу особе која одржава матрицу с подацима

Милана Кресоја Игњатовић, milanakresoja@gmail.com

6.3. Навести име и презиме и мејл адресу особе која омогућује приступ подацима другим истраживачима

Милана Кресоја Игњатовић, milanakresoja@gmail.com