

**UNIVERZITET U BEOGRADU
MEDICINSKI FAKULTET**

Dr Srđan T. Marković

**ZNAČAJ ODREĐIVANJA
MIKROSATELITNE NESTABILNOSTI KAO
GENETSKOG MARKERA U
KOLOREKTALNOM KARCINOMU**

Doktorska disertacija

Beograd, 2013

UNIVERSITY OF BELGRADE

MEDICAL FACULTY

Srdjan T. Markovic

**IMPORTANCE OF MICROSATELLITE
INSTABILITY DETERMINATION
AS GENETIC MARKER
IN COLORECTAL CANCER**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2013

Mentor: Prof. Dr Zoran Krivokapić, Medicinski Fakultet Univerziteta u Beogradu

Komentor: Prof. Dr Svetislav Tatić, Medicinski Fakultet Univerziteta u Beogradu

Članovi komisije za ocenu završene doktorske disertacije:

- 1. Prof. Dr Svetozar Damjanović, Medicinski Fakultet Univerziteta u Beogradu**
- 2. Prof. Dr Zorica Stojšić, Medicinski Fakultet Univerziteta u Beogradu**
- 3. Prof. Dr Njegica Jojić, Stomatološki Fakultet Univerziteta u Beogradu**

Zahvaljujem se:

- Prof. Dr Zoranu Krivokapiću, mentoru, na podršci, sugestijama i oblikovanju konačne verzije doktorata
- Prof. Dr Svetislavu Tatiću, komentoru, na vrednim sugestijama tokom izrade doktorata
- Prof. Dr Svetozeru Damjanoviću, na savetima i uspešnoj saradnji vezanoj za genetiku kolorektalnog karcinoma i izradu ove doktorske teze
- Prof. Dr Njegici Jojić, načelnici Kliničkog odeljenja za gastroenterologiju i hepatologiju, KBC "Zvezdara" na bezrezervnoj podršci u ostvarivanju mojih naučnih ideja
- Prof. Dr Branki Dapčević, bivšem načelniku Kliničkog odeljenja za gastroenterologiju i hepatologiju, KBC "Zvezdara", jer mi je pomogla da doktorske studije nastavim u dobrom smeru i prepoznala moj entuzijazam
- Doktorima, hirurzima III odeljenja, Prve hirurške klinike, Kliničkog Centra Srbije, na odgovornom skupljanju uzoraka kolorektalnog karcinoma operisanih bolesnika
- Svim sestrama III odeljenja, Prve hirurške klinike, naročito glavnoj sestri Živki Madžić i sestri Lučić Vesni, na odgovornom sakupljanju i slanju uzoraka, pronalaženju istorija bolesti, patohistoloških nalaza.
- Svim zaposlenima u Laboratoriji za genetsko ispitivanje, Klinike za endokrinologiju, dijabetes i bolesti metablizma, Kliničkog Centra Srbije, posebno, mr sc. Jadranki Antić za kolegijalnost i ogroman trud za utemeljenje novog metoda određivanja genetskog markera kao i za tumačenje dobijenih nalaza

**Posebnu zahvalnost, van svake konkurencije, dugujem svojim roditeljima, Ljubici i Tomislavu Marković, koji su me uvek podržavali, pomagali i omogućili da budem ono što jesam.*

***Rad posvećujem Mariji i Sari, koje mi daju snagu, podršku i koje najviše volim.*

Značaj određivanja mikrosatelitne nestabilnosti kao genetskog markera u kolorektalnom karcinomu

Rezime

UVOD: Nastanak i klinički tok kolorektalnog karcinoma (CRC) rezultat je mnogobrojnih genetskih faktora i faktora sredine, i njihovih interakcija. Mikrosatelitna nestabilnost (MSI) je genetski marker koji se koristi u dijagnostici Lynch sindroma. U sporadičnim formama CRC proučava se prognostički značaj ovog molekularnog fenomena.

CILJ: Ispitivanje prognostičkog značaja mikrosatelitne nestabilnosti kao genetskog markera u CRC, kliničkih i patohistoloških parametara koji ukazuju na MSI u CRC.

METOD: U istraživanje je uključeno 150 pacijenata muškog i ženskog pola sa kolorektalnim karcinomom koji su hospitalizovani radi operativnog lečenja na Klinici za digestivnu hirurgiju, Kliničkog Centra Srbije od 2006. do 2010. godine. U operativnom uzorku testirana je MSI, Pentaplex PCR metodom sa pet obeleženih mononukleotidnih markera (BAT25, BAT26, NR-21, NR-22 i NR-24). Grupu je podeljena na osnovu MSI statusa: MSI-H grupa (nestabilnost u više od tri markera) i MSS/L grupa (nestabilnost u manje od tri markera). Klinički i patohistološki parametri korelisani su između grupa. Pacijenti su praćeni u smislu pojave lokalnog ili udaljenog recidiva ili do smrtnog ishoda do septembra 2012. godine.

REZULTATI: U MSI-H grupi bilo je 18 pacijenata, dok je u MSS/L grupi bilo 132 pacijenta. Uni i multivarijanti logistički regresioni modeli su pokazali da tumori lokalizovani u desnom kolonu sa izraženijom mucinskom produkcijom, slaba diferentovanost i ispunjenost bar jednog revidiranog Bethesda kriterijuma predstavljaju najznačajnije prediktivne parametre za MSI. Postoji značajna statistička razlika u DFS (period bez znakova recidiva bolesti; engl. disease free survival) između MSI-H i MSS/L grupa (Kaplan Meir test; $p=0,048$, log rank). Nije bilo statistički značajne razlike u celokupnom i bolest-specifičnom preživljavanju između grupa.

ZAKLJUČAK: Mikrosatelitna nestabilnost je detektovana u 12% bolesnika sa kolorektalnim karcinomom. Kliničke i patohistološke karakteristike tumora koje ukazuju na MSI-H fenotip su lokalizacija u desnom kolonu, mucinska produkcija, slabija diferentovanost. Mikrosatelitna nestabilnost predstavlja prognostički faktor koji je povezan sa manjom stopom pojave recidiva (lokalnih ili udaljenih metastaza) kod pacijenata sa kolorektalnih karcinoma u I, II i III stadijumu bolesti, ali ne utiče na bolest-specifično i celokupno preživljavanje pacijenata sa CRC.

Ključne reči: kolorektalni karcinom, mikrosatelitna nestabilnost, genetski marker, preživljavanje, PCR.

Naučna oblast: Molekularna medicina

Uža naučna oblast: Genetika, gastroenterologija

UDK broj:

Microsatellite instability as genetic marker, importance of determination in colorectal cancer

Abstract

INTRODUCTION: Colorectal cancer (CRC) is the result of interaction between numerous genetic and environmental factors. Microsatellite instability (MSI) is a genetic marker that can be useful in the diagnosis of Lynch syndrome and may have a prognostic significance in sporadic colorectal cancer.

OBJECTIVE: The aim of present study was to test the prognostic significance of microsatellite instability as genetic marker in CRC, to examine the clinical and histological parameters that indicate on MSI in CRC.

METHOD: The study included 150 patients with colorectal cancer, who were hospitalized for surgical treatment at the Department of Digestive Surgery, Clinical Center of Serbia since 2006. to 2010. CRC samples were tested for MSI by Pentaplex PCR with five mononucleotide, microsatellite markers (BAT25, BAT26, NR-21, NR-22 and NR-24). The group was divided according to the MSI status: MSI-H group (instability in more than three markers) and MSS/L group (instability in less than three markers). Clinical and histopathological parameters were correlated between the groups. Patients were followed up for possible local or distant disease recurrence or up to death to September 2012.

RESULTS: 18 patients had MSI-H CRC, and they represented MSI-H group while in the MSS/L group comprised of the remaining 132 patients. Uni and multivariate logistic regression models showed that primary lesions located in the right colon with prominent mucin production, poor differentiation, and the fulfillment of at least one of the revised Bethesda criteria were the most important predictive parameters for MSI. There was a statistically significant difference in DFS (period without any recurrence; Disease Free Survival) between MSI-H and MSS/L group (Kaplan Meir test, $p = 0.048$, log rank). There was no statistically significant difference in overall and disease-specific survival between groups.

CONCLUSION: Microsatellite instability was detected in 12% of patients with colorectal cancer. Clinical and pathological characteristics of CRC that show MSI-H phenotype are localization the right colon, prominent mucin production and poor differentiation. MSI represents a prognostic factor associated with a lower rate of recurrence (local or distant metastases) in patients with colorectal cancer in the first, second and third stage of the disease, but does not affect the disease-specific and overall survival in patients with CRC.

Key words: colorectal cancer, microsatellite instability, genetic marker, survival, PCR.

SADRŽAJ

1. UVOD.....	5
1.1. Epidemiologija kolorektalnog karcinoma.....	5
1.2. Faktori rizika za nastanak kolorektalnog karcinoma.....	6
1.3. Klasifikacija kolorektalnog karcinoma.....	9
1.3.1. Sporadični kolorektalni karcinom.....	9
1.3.2. Familijarna forma kolorektalnog karcinoma.....	9
1.3.3. Hereditarne forme kolorektalnog karcinoma.....	10
1.4. Dijagnostika kolorektalnog karcinoma.....	12
1.4.1. Patohistološke karakteristike kolorektalnog karcinoma.....	12
1.4.2. Staging sistemi kolorektalnog karcinoma.....	13
1.5. Kriterijumi u dijagnostici hereditarnog nepolipoznog karcinoma kolona.....	16
1.6. Molekularna osnova kolorektalnog karcinoma.....	18
1.6.1. Hereditarni kolorektalni karcinom – Lynch sindrom.....	18
1.6.2. Hereditarni kolorektalni karcinom – familijarna adenomatozna polipoza.....	19
1.6.3. Genetska osnova drugih hereditarnih kolorektalnih kancerskih sindroma.....	20
1.6.4. Sporadični karcinomi kolona i rektuma.....	22
1.6.5. Hromozomska nestabilnost.....	22
1.6.6. Mikrosatelitna nestabilnost.....	24
1.6.7. Epigenetski mehanizmi u kancerogenezi kolorektalnog karcinoma.....	24
1.7. Mikrosatelitna nestabilnost kao genetski marker.....	27
1.7.1. Mikrosatelitna nestabilnost – dijagnostički značaj.....	28
1.7.2. Mikrosatelitni markeri – mononukleotidni i dinukleotidni.....	30
1.7.3. „Target“ geni za mikrosatelitnu nestabilnost.....	32
1.8. Patohistološki prediktori mikrosatelitne nestabilnosti.....	33
1.9. Ostali genetski markeri u kolorektalnom karcinomu.....	34
2. HIPOTEZA I CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....	36
3. MATERIJAL I METOD.....	37

3.1.	Pacijenti.....	37
3.2.	Dizajn studije.....	38
3.3.	Patohistološke karakteristike tumora.....	39
3.4.	Određivanje mikrosatelitne nestabilnosti.....	40
3.5.	Analiza kliničko-patohistoloških karakteristika kolorektalnih karcinoma u odnosu na MSI status.....	43
3.6.	Analiza metilacionog statusa hMLH1 gena u MSI-H grupi.....	44
3.7.	Studija preživljavanja.....	46
3.8.	Statistička analiza.....	47
4.	REZULTATI.....	48
4.1.	Kliničke i patohistološke karakteristike pacijenata i mikrosatelitni status tumora.....	48
4.1.1.	Starosna i polna distribucija.....	48
4.1.2.	Lokalizacija primarnog procesa.....	50
4.1.3.	Patohistološke karakteristike tumora.....	52
4.1.4.	Revidirani Bethesda kriterijumi.....	56
4.1.5.	Prediktivna vrednost kliničkih i patohistoloških karakteristika za mikrosatelitni status tumora.....	57
4.2.	Analiza mikrosatelitne nestabilnosti i mikrosatelitni markeri.....	61
4.2.1.	Polimorfizmi u mikrosatelitnim markerima.....	65
4.3.	Metilacioni status promotorskog regiona hMLH-1 gena u MSI-H tumorima.....	68
4.4.	Studija preživljavanja.....	70
5.	DISKUSIJA.....	77
5.1.	Diskusija vezana za kliničko-patohistološke karakteristike pacijenata i MSI status.....	78
5.2.	Diskusija vezana za tehniku određivanja MSI i mikrosatelitne markere.....	87
5.3.	Diskusija vezana za preživljavanje i tok bolesti u odnosu na MSI status.....	91
6.	ZAKLJUČAK.....	95
7.	LITERATURA.....	96

1. UVOD

1.1. Epidemiologija kolorektalnog karcinoma

Kolorektalni karcinom (engl. CRC) je veliki globalni zdravstveni problem sa oko milion novodijagnostikovanih slučajeva godišnje. Treći je karcinom po učestalosti kod muškaraca (663 000 slučajeva, 10.0% od svih neoplazmi) i drugi kod žena (571 000 slučajeva, 9.4% od svih neoplazmi). Drugi je vodeći uzrok smrti od karcinoma u mnogim zemljama širom sveta (1). U proseku 60% slučajeva vezano je za razvijene zemlje. Stopa incidencije varira širom sveta, čak i do 10 puta kod oba pola. Najveća standardizovana stopa incidencije (na 100.000 stanovnika) za kolorektalni karcinom je u Australiji/Novom Zelandu (muškarci - 45,7; žene - 33) i Zapadnoj Evropi (muškarci – 41,3; žene – 26,3), dok je najniža u Severnoj Africi (muškarci – 7,0; žene – 5,8) i Južnoj i Centralnoj Aziji (muškarci – 3,7; žene – 10,7). Stopa incidencije je viša kod muškaraca u odnosu na žene (1,4:1) (1). Rizik razvoja kolorektalnog karcinoma raste sa starenjem populacije u razvijenim zemljama dok se porast incidencije kolorektalnog karcinoma u nerazvijenim zemljama pripisuje promeni načina života i ishrane koji su sve sličniji navikama u zapadnim zemljama (2).

Oko 609 000 smrtnih slučajeva zbog CRC, predstavlja 7,1% svih smrtnih slučajeva usled kancera (3). Stoga se CRC nalazi na četvrtom mestu, po smrtnosti na skali svih neoplastičnih bolesti. Najveći mortalitet kod oba pola beleži se u Centralnoj i Istočnoj Evropi gde standardizovana stopa mortaliteta (na 100.000 stanovnika) iznosi 20.1 za muškarce i 12.2 za žene. Najniži mortalitet je u Srednjoj Africi i iznosi 3.5 i 2.7, za muški odnosno ženski pol (1).

U odnosu na ostale evropske zemlje, prema podacima Globocan-a, Srbija se nalazi na devetnaestom mestu po incidenciji kolorektalnog karcinoma kod muškaraca gde standardizovana stopa incidencije iznosi 33.5. U ženskoj populaciji Srbija se nalazi na dvadesetom mestu po standardizovanoj stopi incidencije koja iznosi 21,6. Trendovi koji proizlaze iz navedenih podataka su skladni trendovima u istočnoevropskim zemljama gde je i dalje prisutan porast incidencije i mortaliteta (1). Prema podacima registra za rak u periodu 1999-2009. godine u Centralnoj Srbiji značajno raste trend oboljevanja od karcinoma kolona kod oba pola i karcinoma rektuma kod muškaraca (4). Incidencija je

porasla gotovo tri puta u muškoj populaciji, i nešto više od dva puta u ženskoj. Stopa incidencije u našoj zemlji raste sa godinama starosti, kod muškaraca 70-74 godine, kod žena posle 75. godine. U poslednje vreme se uočava porast broja obolelih od ove neoplazme u Srbiji i u svetu kod osoba mlađih od 40 godina (4,6). Procenjuje se da godišnje u Republici Srbiji približno oboli od kolorektalnog karcinoma 3800 ljudi, a umre 2300 ljudi. U Srbiji je kolorektalni karcinom drugi vodeći uzrok smrtnosti (posle karcinoma pluća) u muškoj, a treći (posle karcinoma dojke i grlića materice) u ženskoj populaciji (5). Prema podacima Globocan-a (1), Srbija se nalazi na šestom mestu po standardizovanoj stopi mortaliteta u oba pola (muškarci – 21,1; žene 12,9). Postoji kontinuirani trend porasta incidencije u muškoj populaciji kao i mortaliteta. U ženskoj populaciji obolelih isti uzlazni trend nije toliko izražen (2).

1.2. Faktori rizika za nastanak kolorektalnog karcinoma

Faktori rizika za nastanak CRC mogu se podeliti na nepromenjive i one podložne prevenciji tj. potencijalno promenjive. U nepromenjive faktore rizika spadaju starosna dob, lična anamneza pozitivna na polipe kolona i rektuma, inflamatorne bolesti creva (ulcerozni kolitis, Kronovu bolest), prethodni karcinom kolona i rektuma. U ovu grupu faktora rizika spada i pozitivna porodična anamneza za hereditarne forme CRC (familijarna adenomatozna polipoza kolona, Lynch sindrom) i sporadični CRC.

1.2.1. Nepromenjivi faktori rizika za nastanak kolorektalnog karcinoma

Osobe preko 50 godina starosti češće oboljevaju od ovog maligniteta i smatra se da je incidencija CRC u ovoj grupi 14 puta veća nego u osoba mlađih od 50 godina (7). Pacijent sa dijagnostikovanim polipima u kolonu i/ili rektumu podleže skriningu zbog verovatnoće alteracije, naročito kod polipa preko 1cm i sa višim stepenom displazije (8). Osobe operisane zbog CRC imaju 4 puta veći rizik od pojave novog primarnog tumora kolorektuma u narednom periodu (metahroni kolorektalni karcinomi), te i oni podležu endoskopskom skriningu – kolonoskopskim pregledima (5).

Inflamatorne bolesti creva (IBC), ulcerozni kolitis i Kronova bolest kolona, su potencijalne prekancerozne bolesti, naročito u slučaju dugog trajanja bolesti (9).

Pacijentima sa ekstenzivnim ulceroznim kolitisom nakon 10 godina trajanja bolesti savetuju se skrining kolonoskopije sa multiplim biopsijama u cilju ranog otkrivanja CRC, obzirom da ova bolest nosi 2,75 puta veći rizik za nastanak CRC u odnosu na opštu populaciju (10). U svakom slučaju rizik od pojave CRC na terenu IBC zavisi od dužine trajanja bolesti (11, 12) kao i od stepena inflamacije (12).

Pozitivna porodična anamneza na kolorektalni karcinom predstavlja nepromenjivi faktor rizika za pojavu ovog maligniteta, obzirom na poznate nasledne i familijarne forme o kojima će biti reči u daljem tekstu. Osobe imaju 3-6 puta veći rizik da obole od CRC ukoliko imaju rođaka koji je oboleo u mlađim godinama. Smatra se da oko 20% osoba sa ovim oboljenjem ima pozitivnu porodičnu anamnezu na CRC (13). Veći rizik za kolorektalni karcinom imaju osobe sa naslednim formama CRC (familijarna polipoza kolona i Lynch sindrom) o kojima će biti reči u kasnijem tekstu.

1.2.2. Potencijalno promenjivi faktori rizika za nastanak kolorektalnog karcinoma

U faktore rizika za nastanak CRC koji su potencijalno promenjivi spadaju: ishrana, gojaznost, dijabetes, alkohol i pušenje. Ishrana bogata mastima utiče na nastanak kolorektalnog karcinoma dvojako: prvo, pojedine masti direktnim, citotoksičnim dejstvom na sluznicu kolona, drugo indirektno, putem enterohepatične cirkulacije žučnih kiselina koje direktno ili putem protein-kinaze C indukuju hiperproliferaciju kolonocita (14,15). Prekomerna upotreba crvenog mesa u ishrani takođe povećava rizik od nastanka CRC, svojim direktnim i/ili indirektnim dejstvom putem nitrata i nitrita koji se dodaju mesu kao konzervansi (16). Važno je napomenuti da askorbinska kiselina i tokoferol inhibišu endogeno formiranje kancerogenih N-nitrozo jedinjenja iz nitrata i nitrita. Mleko, mlečni proizvodi, ishrana bogata voćem i povrćem kao i dijetetskim vlaknima može smanjiti rizik od pojave kolorektalnog karcinoma (17).

U mnogim studijama je uočeno da prekomerna telesna težina, gojaznost i dijabetes melitus predstavljaju faktore rizika za nastanak CRC kod oba pola, ali je veza konzistentnija kod muškaraca nego kod žena. Abdominalna gojaznost je bolji prediktor rizika za ovaj malignitet nego ukupna gojaznost. Sa druge strane, dijabetes i kolorektalni karcinom imaju slične faktore rizika, uključujući fizičku neaktivnost i gojaznost (18,19).

Osobe koje konzumiraju 2-4 alkoholna pića dnevno imaju 23% veći rizik za nastanak CRC u odnosu na one koji piju manje od 1 pića dnevno (20). Novije studije japanskih autora sugeriraju povezanost konzumiranja alkohola i pojave karcinoma levog kolona i rektuma (21). Nema dovoljno dokaza o pušenju kao faktoru rizika za ovaj malignitet. Pokazana je jača veza između pušenja i nastanka karcinoma rektuma, u odnosu na pojavu karcinoma kolona (22).

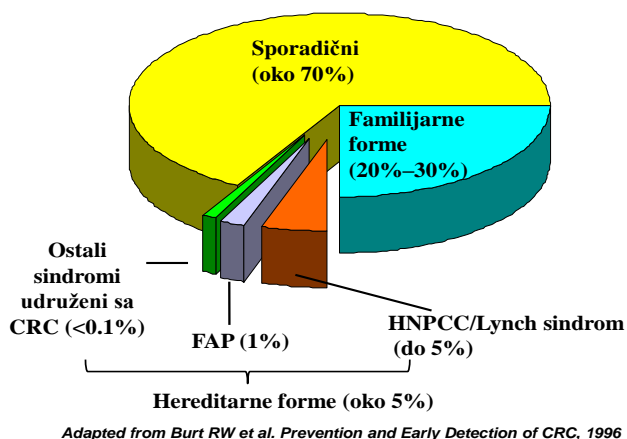
Tabela 1. Faktori rizika za nastanak kolorektalnog karcinoma

Nepromenjivi faktori rizika
<ul style="list-style-type: none"> ✓ Uzrast: više od 50 godina ✓ Lična anamneza za hereditarne forme CRC ✓ Lična anamneza za kolorektalni karcinom ✓ Lična anamneza za inflamatorne bolesti creva ✓ Porodična anamneza za kolorektalni karcinom ✓ Porodična anamneza za hereditarne forme CRC
Potencijalno promenjivi faktori rizika
<ul style="list-style-type: none"> ✓ Neadekvatna ishrana ✓ Gojaznost ✓ Dijabetes ✓ Pušenje ✓ Alkohol

Nesteroidni antiinflamatorni lekovi (NSAIL) i aspirin mogu delovati supresivno na rast adenoma kako u kolonu, tako i u gornjim partijama digestivnog trakta. Za sada nije poznat mehanizam ovog specifičnog dejstva. Pretpostavlja se da imaju pored antiinflamatornog dejstva i antioksidativni efekat, te eliminišu slobodne radikale koji nastaju prilikom metaboličkih procesa. Pokazano je da specifični COX-2 (Cyclooxygenase-2) inhibitori imaju slično dejstvo, ali se zbog opisanih neželjenih efekata na kardiovaskularni sistem, ovi lekovi mogu upotrebiti u specifičnim situacijama (23,24).

1.3. Klasifikacija kolorektalnog karcinoma

Kolorektalni karcinomi se klasifikuju u sporadičnu, familijarnu i hereditarnu formu.



Slika 1. Klasifikacija kolorektalnog karcinoma

1.3.1. Sporadični kolorektalni karcinom

Sporadični karcinomi kolona su najčešći i obuhvataju oko 70% svih CRC (25). Sporadični slučajevi CRC nastaju kod pacijenta koji u porodici nemaju članove obolele od ovog maligniteta.

1.3.2. Familijarna forma kolorektalnog karcinoma

Kod familijarnih karcinoma kolona postoji pozitivna porodična anamneza za CRC, ali bolest se ne može okarakterisati kao hereditarna, jer nema poznate genetske osnove. Familijarne forme CRC su na drugom mestu po učestalosti. Incidencija familijarnih i hereditarnih formi se procenjuje na oko 20-30%, ali samo 5% ovih tumora imaju germinativnu (urođenu) mutaciju, detektabilnu u svim ćelijama u organizmu (25).

1.3.3. Hereditarne forme kolorektalnog karcinoma

Hereditarni sindromi u okviru kojih se javlja CRC su hereditarni nepolipozni karcinom kolona (Lynch sindromi i familijarni sindrom X), familijarna adenomatozna polipoza (FAP) i ostale retke forme kancerskih sindroma (Muir Torre sindrom, Gardnerov sindrom, MYH-udružena polipoza kolona, Peutz-Jeghersov sindrom). Hereditarne forme CRC imaju najmanju učestalost (do 5%) (slika 1).

Definicija hereditarnih nepolipoznih karcinoma kolona (engl. Hereditary NonPolyposis Colorectal Cancer, HNPCC) je sadržana u samom nazivu. Ovi karcinomi ne nastaju na terenu polipoze i razlikuju se od familijarne adenomatozne polipoze (FAP). HNPCC imaju učestalost od 5-8%, FAP svega 1% (25). HNPCC imaju naslednu predispoziciju za nastanak CRC, ali je termin od strane mnogih autora poistovećivan sa Lynch sindromom, iako u sebi sadrži dva entiteta: Lynch sindrom (LS) i familijarnu formu X CRC. Familijarnu formu X CRC imaju pojedinci sa CRC koji ispunjavaju Amsterdamske kriterijume I (videti u daljem tekstu), ali nema dokazanu genetsku osnovu Lynch sindroma. Sam naziv „Hereditarni nepolipozni kolorektalni karcinom“ uključuje reč „kolorektalni“, dok se LS odnosi npr. i na karcinom endometrijuma, što dalje upućuje da ove termine ne bi trebalo poistovećivati (26). Stoga, LS i HNPCC nisu sinonimi. LS se karakterišu germinativnom mutacijom nekog od gena koji učestvuju u mehanizmima reparacije DNK (MMR geni), i njegova prevalencija nije poznata, iako je Lynch 2004. godine publikovao da „iznosi od 2 do 7% svih formi CRC“ (27). A.Wartin je 1913. godine prvi opisao naslednu predispoziciju za razvoj karcinoma kolona i endometrijuma u porodici koju je označio „G“ (28). 1960. godine Lynch i saradnici su proučavali jos dve velike porodice („N“ i „M“), sa ranim CRC kao i endometrijalnim i ovarijalnim karcinomima (29). Ove činjenice su dovele do definisanja sindroma, Lynch I sindrom koji označava predispoziciju za razvoj CRC, i Lynch II sindrom koji označava predispoziciju za razvoj CRC, kao i karcinoma drugih lokalizacija: endometrijum, ovarijum, želudac, urinarni trakt, bilijarni trakt, pankreas, tanko crevo, mozak, koža (tumori udruženi sa LS) (30). Pacijenti sa LS imaju predispoziciju za razvoj više karcinoma tokom života (metahroni karcinomi) i razvoj više neoplazmi istovremeno (sinhroni karcinomi). Klinička i molekularna istraživanja su omogućila dodatna saznanja u vezi LS. Formirani su klinički

kriterijumi, prvo Amsterdamski, potom i Bethesda kriterijumi radi efikasnije identifikacije HNPCC pacijenata.

Familijarna adenomatozna polipoza (FAP) predstavlja hereditarno oboljenje koje nosi 100% rizika za razvoj kolorektalnog karcinoma. Nasleđuje se autozomno dominantno i smatra se da se javlja aproksimativno na 1 od 8000 neonatusa u svetu (31). Najveći broj obolelih razvija stotine polipa do 16. godine. Kod nelečenih se u proseku do 39. godine (prema nekim studijama i ranije oko 25. godine) razvija CRC sa smrtnim ishodom oko 42. godine (32). Preko 90% pacijenata sa FAP se dijagnostikuje oko 40. godine (25). FAP se karakteriše brojnim ekstrakolonskim manifestacijama: intraabdominalni dezmoidni tumori, epidermoidne ciste, osteomi, kožni fibromi, CNS tumori, osteodistrofija, kongenitalna hipertrofija retinalnog pigmenta (engl. Congenital Hyperplasia of Rethinal Pigment Epithelium - CHRPE). Mogu se javiti gastrični polipi, duodenalni, periampularne lokalizacije, kao i karcinomi žučne kese i bilijarnog trakta. Muir Torre sindrom je fenotipska varijanta Lynch sindroma koji se klinički dijagnostikuje postojanjem metahronih i sinhronih sebacealnih neoplazmi sa ili bez keratoakantoma, uz pojavu digestivnih neoplazmi, u najvećem broju slučajeva CRC (33). Muir Torre sindrom, Turctov sindrom kao i sindrom konstitucionalnog deficita gena za reparaciju DNK nakon replikacije, novi entitet - Lynch sindrom III (34), predstavljaju neobične fenotipske varijante LS.

Gardnerov sindrom i MYH-udružena polipoza kolona polipoza su podvarijante familijarne adenomatozne polipoze obzirom na genetsku osnovu i kliničke karakteristike sindroma.

U hereditarne forme se ubraja i CRC na terenu hamartomatoznih polipa u sklopu Peutz-Jegersovog sindroma. Peutz-Jeghersov sindrom (PJS) predstavlja polipozu gastrointestinalnog trakta sa melaninskom hiperpigmentacijom usana, sluznice usne šupljine i kože. Nasleđuje se autozomno-dominantno. U ostalih članova porodice bolest se pojavljuje u 45%, bilo samo delimično (pigmentacija ili polipi), bilo potpuno. Polipi su hamartomi, sastoje se od glatkih mišićnih vlakana koja izlaze iz tunike muskularis mukoze. Polipi se mogu pojavljivati od jednjaka do anusa, a uvek su prisutni u tankom crevu. U kolonu su češći kod dece, u odnosu na odrasle osobe (35).

1.4. Dijagnostika kolorektalnog karcinoma

Ukoliko se gastroenterološkom obradom postavi sumnja na kolorektalni karcinom, ista bi se trebala potvrditi kolonoskopijom i biopsijom lezije.

Kolonoskopija je "zlatni standard" dijagnostike CRC-a zato što sem otkrivanja i malih promena - tumora, i uzimanja biopsije postoji mogućnost i uklanjanja polipa i time sprečavanja njihovog razvoja u malignu bolest.

CT abdomena odnosno ehosonografski pregled abdomena, ukoliko CT nije dostupan, daje nam preoperativne podatke o proširenosti bolesti. Za karcinom rektuma potpunija procena stadijuma dobija se magnetnom rezonancom male karlice, budući da je puno osetljivija za prikaz mekih tkiva i time lokalnu proširenost bolesti (5). Kod lezija koje su ograničene na sluznicu i ne probijaju mišićni sloj, nalaz se može potvrditi endorektalnim ehosonografijom (5).

Tumorski markeri koji nam daju informaciju o aktivnosti bolesti povišeni su u tek oko 30% pacijenata, no dobar su pokazatelj recidiva bolesti kada njihov rast može prethoditi vidljivoj leziji na nekoj od radioloških pretraga. Rutinski se uzimaju karcinoembriogeni antigen (CEA) i CA 19-9 kako bi nam dali bazične vrednosti za dalje praćenje dinamike bolesti. To su biohemijske analize krvi kojima se dokazuju specifični proteini. Ovaj test nije strogo specifičan za kolorektalni karcinom, jer se povišene vrednosti mogu naći i kod drugih malignih bolesti kao što su karcinom dojke, pluća, želuca, kao i kod bolesnika sa čirom želuca i cirozom jetre. CEA je povišen samo u oko 40% pacijenata sa CRC, te se ne savetuje upotreba u skriningu CRC. Njihov značaj je u postoperativnom praćenju obolelih u smislu ponovnog javljanja tumora nakon sprovedenog lečenja (recidiv bolesti) (36).

1.4.1. Patohistološke karakteristike kolorektalnog karcinoma

Najveći broj karcinoma lokalizovan je u rektumu i sigmoidnom kolonu (75%), zatim u cekumu i ascendentnom kolonu (16%) (37). Većina karcinoma su adenokarcinomi koji nastaju iz prethodnih adenoma, a proces transformacije adenoma u karcinom poznat je kao „adenom–displazija-karcinom sekvenca“. Mali procenat kolorektalnih karcinoma nastaje *de novo* (38). Specifični slučajevi karcinoma nastaju kod osoba sa inflamatornim bolestima creva i oni imaju različitu genetsku osnovu. U oko 90% slučajeva neoplazma

kolona i rektuma odgovara adenokarcinomu. Pokazuje različite stepene diferentovanosti (gradus I, II, III). Uglavnom dominiraju srednje i dobro diferentovani tumori. Koloidni karcinom predstavlja posebnu varijantu adenokarcinoma sa ekstracelularnim mucinom. Po definiciji, mucinozni adenokarcinomi moraju imati najmanje 50% mucinozne komponentne (39). Kod dobro i srednje diferentovanih tumora mucin je intracelularno smešten, za razliku od slabodiferentovanih mucinoznih karcinoma gde se nalazi ekstracelularno, u intersticijumu oko pojedinačnih tumorskih ćelija. Mucinozna diferencijacija može biti prisutna kod sporadičnih CRC koji nastaju na terenu viloznih adenoma, kao i u karcinomima u sklopu Lynch sindroma (39). U sklopu mucinoznih karcinoma mogu biti prisutne ćelije sa pečatnim prstenom (engl. "Signet ring" ćelije) (40). Signet ring cell karcinom se uglavnom javlja u sporadičnoj formi u sigmoidnom kolonu i rektumu kao infiltrišući, agresivni tumor i predstavlja retku histološku formu CRC. Kolorektalni karcinom u sklopu Lynch sindroma može biti signet ring cell karcinom, ali u ovom slučaju ima bolju prognozu (41). Drugi histološki tipovi CRC su skvamocelularni, adenoskvamozni, medularni, neuroendokrini tumori, koji su znatno ređi u odnosu na adenokarcinome.

Intraepitelijalni limfociti označeni kao tumor-infiltrišući limfociti (TILs) inicijalno su povezani sa nediferentovanim ili medularnim tipovima CRC. Obzirom da se TILs mogu izbrojati na histološkom preparatu, razmatrani su kao biomarker za sve tipove kolorektalnog karcinoma. Prisutni TILs su povezani sa kolorektalnim karcinomom sa MSI-H fenotipom i u pojedinim studijama su korelisali sa boljom prognozom bolesnika (42). Utvrđen je granični broj limfocita (cut-off) izbrojanih na Hematoxilin&Eozin prepratima. Nalaz najmanje 5 limfocita/10 polja velikog uveličanja razmatra se kao granična (cut-off) vrednost (41).

1.4.2. Staging sistemi kolorektalnog karcinoma

Dijagnoza kolorektalnog karcinoma se postavlja preoperativno, multiplim endoskopskim biopsijama. Posle hirurškog odstranjivanja tumora i histološkog pregleda čitavog tumora sa limfnim nodusima određuju se stepen maligniteta i stadijum bolesti (staging). Za procenu stadijuma bolesti određuju se sledeći parametri: dubina invazije, zahvaćenost limfnih nodusa, neurovaskularna invazija, udaljene metastaze. Za određivanje

stadijuma primenjuju se Dukes, Astler-Coller, TNM klasifikacija Svetske zdravstvene organizacije. U Dukes A grupu spadaju tumori koji infiltrišu sluznicu i submukozu do mišićnog omotača, ali bez metastaza u regionalnim limfnim nodusima (RLN). U Dukes B grupi, tumori infiltrišu zid creva u potpunosti, eventualno i perikolično masno tkivo, ali bez metastaza u RLN. Petogodišnje preživljavanje u ovom stadijumu se procenjuje na 70%. U Dukes C grupu spadaju tumori sa metastazama u RLN (C1), odnosno u udaljenim organima (C2 ili D). Petogodišnje preživljavanje u ovoj grupi je manje od 30%. Astler-Coller staging sistem koreliše sa Dukes klasifikacijom i dat je u tabeli. Najčešće korišćeni staging sistem za kolorektalni karcinom je predložen od strane American Joint Committee on Cancer (AJCC), poznat je kao TNM klasifikacioni sistem (43-45).

Oznaka **T** opisuje stepen infiltracije zida creva od strane primarnog tumora. Zid kolona i rektuma sastoji se od mukoze, tankog mišićnog omotača (lamina muscularis mucosae), submukoze (fibrozno tkivo), tankog mišićnog sloja (muscularis propria) koji ima ulogu u crevnoj peristaltici, tankog sloja subseroznog i seroznog omotača koji pokriva najveći deo kolona, ali ne i rektum.

Tis: Karcinom u najranijem stadijumu (in situ), nalazi se u mukozi.

T1: Karcinom je infiltrisao unutrašnji mišićni omotač i proširio se do submukoznog sloja.

T2: Karcinom se proširio na spoljašnji mišićni omotač (muscularis propria).

T3: Karcinom je porastao do seroznog omotača, ali ga nije probio, nije u kontaktu sa susednim organima.

T4a: Tumor je probio serozni omotač tj. visceralni peritoneum.

T4b: Označava invaziju okolnih organa.

Oznaka **N** opisuje limfonodalni status, tj. da li se tumor proširio do regionalnih limfnih nodusa, i koji broj RLN je zahvaćen. Preporuka od strane American Joint Committee on Cancer i Nacionalnog Cancer Instituta (NCI) je da se najmanje 12 RLN analizira prilikom staging-a CRC (45).

N0: Nema širenja tumora u RLN

N1: Kancerske ćelije su viđene u 1-3 RLN

N1a: Invazija jednog RLN

N1b: Invazija 2 ili 3 RLN

N1c: Mali depoziti kancerskih ćelija viđeni u masnom tkivu oko RLN, ali ne u njima.

N2: Invazija 4 ili više RLN

N2a: Zahvaćena 4-6 RLN

N2b: Zahvaćeno 7 i više RLN

M se odnosi na udaljene metastaze (najčešća mesta sekundarnih depozita kod kolorektalnog karcinoma su jetra i pluća, ali i udaljene limfne žlezde, mada se može proširiti i na sve druge organe).

M0: Bez udaljenih metastaza

M1a: Postoji metastaza u jednom udaljenom organu ili udaljenim limfnim žlezdama.

M1b: Postoje metastaze u više od jednom udaljenom organu.

Stadijum tumora određuje se na osnovu T, N i M kategorije. Stadijumi se označavaju rimskim brojem od I (rani karcinom) do IV (uznapredovala bolest) sa slovnim oznakom substadijuma (45). Prikaz staging-a kolorektalnog karcinoma prikazan je u Tabeli 2.

Tabela 2. TNM, Dukes, Astler-Coller klasifikacioni staging sistem kolorektalnog karcinoma

Stage	T	N	M	Dukes	Astler-Coller
0	Tis	N0	M0	-	-
I	T1	N0	M0	A	A
	T2	N0	M0	A	B1
IIA	T3	N0	M0	B	B2
IIB	T4a	N0	M0	B	B2
IIC	T4b	N0	M0	B	B3
IIIA	T1-T2	N1/N1c	M0	C	C1
	T1	N2a	M0	C	C1
IIIB	T3-T4a	N1/N1c	M0	C	C2
	T2-T3	N2a	M0	C	C1/C2
IIIC	T1-T2	N2b	M0	C	C1
	T4a	N2a	M0	C	C2
	T3-T4a	N2b	M0	C	C2
	T4b	N1-N2	M0	C	C3
IVA	bilo koji T	bilo koji N	M1a	D	-
IVB	bilo koji T	bilo koji N	M1b	D	-

1.5. Kriterijumi u dijagnostici hereditarnog nepolipoznog karcinoma kolona

Prvi klinički kriterijumi radi definisanja HNPCC publikovani su 1991. godine i nazvani Amsterdamski kriterijumi (46). Sastoje se od tri kriterijuma i svi moraju biti ispunjeni: 3 rođaka sa CRC od kojih je jedan od njih u srodstvu prvog stepena sa druga dva; CRC u najmanje dve uzastopne generacije; jedan pacijent sa CRC pre 50. godine. Inicijalno su se ovi kriterijumi odnosili samo na CRC, i bili su revidirani 1998. godine; nazvani su Amsterdamski II kriterijumi (47), u kojima su bili uključeni i ekstrakolonni karcinomi. Amsterdamski kriterijumi su specifični za LS, ali nedovoljno senzitivni, obzirom da je brojnim istraživanjima utvrđeno da samo oko 46% pacijenata koji ispunjavaju Amsterdamske kriterijume imaju germinativnu mutaciju MMR gena (48).

Amsterdam II kriterijumi (47) (svaki od navedenih kriterijuma mora biti ispunjen):

1. Tri ili više rođaka sa CRC i/ili tumorima udruženim sa LS
2. Prisustvo tumora u najmanje dve uzastopne generacije
3. Jedan ili više rođaka sa CRC dijagnostikovanim pre 50. godine
4. Neophodno je da postoji prvi stepen srodstva najmanje između dva obolela člana
5. Isključena familijarna adenomatozna polipoza
6. CRC je neophodno patohistološki potvrditi

Bethesda kriterijumi (48) su objavljeni 1997. godine, a potom su revidirani 2004. godine (49). Bethesda vodič za identifikaciju pacijenata sa mogućim LS, ima 7 kriterijuma, dok revidirani Bethesda vodič ima pet (kriterijumi dati u daljem tekstu). Ovi kriterijumi su senzitivniji, ali je pokazano da svi pacijenti sa LS nisu ispunjavali Bethesda kriterijume. Neophodno je ispuniti bar jedan od navedenih kriterijuma, da bi se postavila klinička sumnja da se radi o LS i preduzele dalje genetske analize tj. testiranje mikrosatelitne nestabilnosti (videti u daljem tekstu).

Bethesda kriterijumi (48):

1. Pacijenti sa CRC u porodicama koje ispunjavaju Amsterdamske kriterijume
2. Pacijenti sa dva tumora koji su udruženi sa LS, uključujući sinhronu ili metahronu kolorektalnu karcinomu ili udruženu ekstrakolonnu karcinomu
3. Pacijenti sa CRC koji imaju rođaka prvog stepena sa CRC i/ili tumor udružen sa LS ekstrakolonnu lokalizacije i/ili kolorektalnim adenomima; CRC dijagnostikovano do 45. godine života, adenomi kolona dijagnostikovani do 40. godine života.
4. Pacijent starosti do 45 godina, sa CRC ili endometrijalnim karcinomom
5. Pacijenti starosti do 45. godina, sa slabo-diferentovanim karcinomom desnog kolona
6. Pacijenti sa signet-ring cell tipom CRC dijagnostikovano do 45. godine
7. Pacijenti sa adenomima kolona dijagnostikovanim do 40. godine

Revidirani Bethesda kriterijumi (49):

1. Pacijenti mlađi od 50 godina sa CRC
2. Prisustvo sinhronih ili metahronih CRC ili tumora udruženih sa LS (želudac, mokraćna bešika, ureter, bubreg, bilijarni trakt, glioblastom mozga, sebacealni adenomi, tumori tankog creva) bez obzira na uzrast
3. CRC dijagnostikovani pre 60. godine sa patohistološkim karakteristikama sugestivnim za mikrosatelitnu nestabilnost: (prisutni tumor infiltrišući limfociti, "Crohn-like" limfocitna reakcija, mucinozna ili "signet ring" diferencijacija)
4. CRC kod pacijenata sa jednim ili više rođaka prvog stepena srodstva sa CRC ili tumorima udruženim sa LS (dijagnostikovani pre 50. godine ili pre 40. godine kada je reč o adenomima)
5. CRC kod pacijenata sa dva ili više rođaka sa CRC ili drugim karcinomima koji se mogu javiti u sklopu LS, bez obzira na godine starosti

1.6. Molekularna osnova kolorektalnog karcinoma

U proteklih nekoliko godina, inovacije u molekularnoj biologiji i genetici CRC nisu proširili samo naše razumevanje bolesti, nego su omogućili i shvatanje patogeneze sporadičnog i naslednih sindroma CRC. Razvojem tehnologije zadnjih godina omogućeno je prikupljanje podataka o nizu genetičkih faktora, koji su značajno unapredili razumevanje molekularnih mehanizama u podlozi ove bolesti. Nastanak i klinički tok kolorektalnog karcinoma rezultat je mnogobrojnih genetskih faktora i faktora sredine, te njihovih interakcija. Izazov je razumeti molekularnu osnovu koja će oblikovati individualnu predispoziciju za nastanak kolorektalnog karcinoma, progresiju bolesti i odgovor na različite vrste hemoterapije.

Prema sadašnjem konceptu, kolorektalni karcinom nastaje u sklopu hereditarnih kancerskih sindroma, sporadično i na terenu inflamatornih crevnih bolesti.

1.6.1. Hereditarni kolorektalni karcinom – Lynch sindrom

Hereditarni karcinomi imaju germinativne mutacije u specifičnim genima. Tipovi hereditarnog kolorektalnog karcinoma su pomenuti u ranijem poglavlju, u klasifikaciji kolorektalnog karcinoma, ovde će biti reči o njihovoj molekularnoj osnovi.

Lynch sindrom je autozomno-dominantni sindrom sa predispozicijom za nastanak karcinoma. U ranim devedesetim godinama prošlog veka identifikovana je genetska osnova Lynch sindroma (LS), germinativna mutacija nekog od gena koji učestvuju u mehanizmu reparacije DNK (MMR geni) (27, 30). Kao posledica mutacije nekog od MMR gena nastaje mikrosatelitna nestabilnost (engl. microsatellite instability – MSI). Otkriće mikrosatelitne nestabilnosti i njena povezanost sa etiopatogenezom CRC otvorilo je novo poglavlje u proučavanju biološke osnove CRC (50). Greška u MMR ćelijskom sistemu uzrokuje akumulaciju grešaka tj. mutacija u mnogim genima, posebno dobijaju na važnosti mutacije u genima zaduženi za rast i proliferaciju ćelija. Ove mutacije su najčešće u mikrosatelitnim sekvencama ovih gena. Mikrosatelitna nestabilnost prouzrokuje nestabilnost čitavog genoma, obzirom na rasprostanjenost mikrosatelitnih sekvenci. Mnogi geni sa nestabilnim mikrosatelitnim sekvencama su obično tumor-supresorni geni, geni koji kodiraju MMR proteine, geni Wnt/ β katenin signalnog puta i apoptoze. Postoje četiri

gena koji su zaduženi za reparaciju DNK nakon procesa replikacije: hMLH1, hMSH2, hMSH6 i PMS2 gen. Pacijenti sa LS i germinativnim mutacijama nekog od MMR gena imaju rizik za nastanak CRC koji iznosi 69% kod muškaraca i 52% kod žena (51). Kumulativni rizik za nastanak endometrijalnog karcinoma tokom života je isti ili čak i veći nego za nastanak CRC (51,52). Specifični rizik za nastanak CRC kod pacijenata sa LS zavisi od mutacije specifičnog MMR gena. Muškarci sa mutacijom hMLH1 gena, imaju veći rizik za nastanak CRC, u odnosu na osobe ženskog pola, dok je rizik sličan kod nosioca MSH2 mutacija u oba pola (53). Nosioci hMLH1 mutacija imaju veći rizik od nastanka CRC u mlađem životnom dobu, u odnosu na nosioce MSH2 mutacija. Sa druge strane, nosioci MSH2 mutacija, imaju veću incidenciju karcinoma urotrakta (54,55).

Nosioci germinativnih mutacija MSH6 i PMS2 imaju različiti klinički fenotip. Nosioci MSH6 mutacija imaju manji rizik za nastanak CRC, i kasniji početak bolesti (55). Baglietto i saradnici (56) su publikovali seriju od 113 porodica sa mutacijama MSH6 gena i ukazali da relativni rizik za CRC iznosi 22% kod muškaraca i 10% kod žena, dok rizik od nastanka endometrijalnog karcinoma iznosi 26%. Poredeći sa opštom populacijom pojava endometrijalnog karcinoma je 25 puta češća kod nosioca MSH6 mutacija. Nosioci PMS2 mutacija imaju blažu kliničku formu bolesti. CRC se obično javlja nakon 50 godine života i generalno postoji manji rizik od nastanka karcinoma udruženih sa LS u odnosu na nosioce mutacija ostalih MMR gena (57).

1.6.2. Hereditarni kolorektalni karcinom – familijarna adenomatozna polipoza

Germinativna mutacija *adenomatosis polyposis coli* (APC) gena koji je lokalizovan na dugom kraku hromozoma 5 u poziciji 5q21 predstavlja genetsku osnovu FAP. APC gen je tumor supresorni gen. Sadrži 15 egzona (2844 kodona, 8532 nukleotida). Produkt ovog gena, APC protein (300 kDa) kontroliše učestalost deobe ćelije, odnos sa ostalim ćelijama u tkivu, adheziju i migraciju ćelija i čak apoptozu kolonocita (58). Ovaj protein utiče na stabilnost hromozoma u toku ćelijske deobe. U direktnom je odnosu sa ostalim proteinima koji su uključeni u signalnim putevima. Lokalizacija APC proteina je na bazolateralnim stranama ćelija sluznice kolona. Postoji veća ekspresija APC gena kod ćelija gornjih slojeva epitela, zbog čega postoji indicija da produkt ovog gena promovise apoptozu

epitelnih ćelija. Najveći broj mutacija koje se mogu javiti u APC genu lokalizovane su blizu 5' kraja gena. Mutacije u blizini 3' kraja su retke. 20% svih mutacija se javljaju u 15. egzonu. Lokalizacija mutacije koreliše sa stepenom polipoze. Mesto mutacije između 450-1600 kodona (bliže određeno između 1250-1330) povezano je sa pojavom više od 100 polipa (adenoma) (58). Mutacije na proksimalnom kraju do 158. kodona ili na distalnom kraju do 1900. kodona su povezane sa blažom, atenuiranom varijantom FAP (engl. attenuated adenomatous polyposis coli - AAPC). Za AAPC karakteristična je i lokalizacija mutacija u egzonu 6. Za mutacije u regionu gena između 157. i 168. kodona u egzonu 4 se smatra da su ključne za pojavu AAPC ili klasične varijante FAP. Ovaj region je poznat kao granica između dva fenotipa. Mutacije u egzonu 15 (kodon 1309) su povezane sa ranijom pojavom kolorektalnih adenoma i deset godina manjim preživljavanjem pacijenata. Mutacije između 1445. i 1578. kodona APC gena su povezane sa pojavom dezmoidnih tumora, osteoma, epidermoidnih cisti (ekstradigestivnih manifestacija FAP) i polipa proksimalnih delova digestivnog trakta (59). Kod 20-50 % pacijenata postoji nemogućnost detekcije APC mutacije (APC negativni FAP) koji imaju blaži fenotip u odnosu na APC pozitivne pacijente (60).

1.6.3. Genetska osnova drugih hereditarnih kolorektalnih kancerskih sindroma

Druge, neobične varijante Lynch sindroma koje za molekularnu osnovu imaju, takođe, germinativnu mutaciju nekog od MMR gena, obuhvataju Muir Torre sindrom, Turctov sindrom i Sindrom konstitucionalnog deficita u MMR sistemu.

Germinativne mutacije MSH2 i MSH6 gena su uzrok Muir Torre sindroma u 90% slučajeva, dok u ostalim slučajevima postoji mutacija hMLH1 gena (61). Kutane neoplazme predstavljaju markere digestivnog maligniteta u ovom sindromu. Najčešći je sebacealni adenom koji se prezentuje žučkastim papulama ili nodulusima, često u regionu glave i vrata kod bolesnika mlađih od 50 godina. Inicijalni dijagnostički test jeste imunohistohemija u cilju određivanja deficita nekog od MMR proteina u kožnim promenama i određivanje mikrosatelitnog statusa, uz kliničku obradu bolesnika.

Turctov sindrom (TS) se klinički karakteriše pojavom primarnih tumora mozga i CRC (62). TS je najčešće uzrokovan germinativnom mutacijom APC gena i tada je

udružen sa FAP, ali su opisane mutacije hMLH1, hMSH6 i PMS2 gena u osnovi ovog sindroma. Tip tumora mozga direktno zavisi od genetskog defekta. APC mutacije su povezane sa nastankom meduloblastoma, dok mutacije MMR gena sa nastankom glioblastoma (63). Mutacije MMR gena u oba alela su opisane u porodicama sa MSI pozitivnim tumorima mozga, tako da ostaje nejasno da li se ovaj sindrom javlja kao fenotipska varijanta LS ili je u sklopu sindromu konstitucionalnog deficita u MMR sistemu (64,65,66) (engl. Constitutional mismatch repair-deficiency syndrome – CMMR-D).

Sindrom konstitucionalnog deficita u MMR sistemu (engl. CMMR-D) prezentuje se još u detinjstvu, sa različitim brojem tipično hematoloških maligniteta, tumora mozga, kao i neoplazmi koje su udružene sa LS. Predloženo je da se ovaj sindrom nazove Lynch III sindrom (34, 64), obzirom na specifičnu fenotipsku prezentaciju. U osnovi ovog sindroma su mutacije MMR gena u oba alela, u najvećem broju slučajeva mutacija PMS2 gena (67). Na koži je karakterističan znak mrlji bele kafe (café au lait spot – CLS) koji podseća na neurofibromatozu (NF). Ove promene nisu patognomonične za NF, ali se diferencijalni dijagnostički mora razmotriti. Za NF kožne promene se karakterišu različitim stepenom pigmentacije i iregularnim ivicama. Osim CLS za CMMRD sindrom su karakteristična i polja hipopigmentacije na koži, koje mogu uputiti na ovaj sindrom uz pojavu neoplazme u detinjstvu i bez jasno pozitivne porodične anamneze (64).

Fenotipske varijacije FAP su MYH-udružena polipoza (MAP) i Gardnerov sindrom. MAP je autozomno-recesivni, hereditarni sindrom polipoze kolona. MYH gen je prvi put identifikovan, 2002. godine, kod trojki sa multiplim polipima u kolonu, kolorektalnim karcinomom i bez APC mutacije (68). Oko 1-2% opšte populacije su zdravi, heterozigotni nosioci mutacije ovog gena. Rizik za pojavu CRC kod heterozigotnih nosioca jednak je riziku koji ima rođak prvog stepena srodstva sa obolelim od sporadičnog CRC (69). MAP ima širok klinički spektar. Najčešće klinički podseća na atenuirani FAP, ali se neretko ispoljava fenotipom FAP i LS (70). Geni koji učestvuju u mehanizmima reparacije DNK nakon replikacije (MMR geni) mogu interagovati sa MYH genom i povećati rizik za nastanak CRC. Opisana je povezanost između MYH gena i MSH6. Oba proteina imaju ulogu u mehanizmima reparacije DNK. Kod nosioca mutacije MYH gena u jednom alelu, signifikantno je povećana stopa MSH6 mutacija, u poređenju sa zdravim kontrolama (11.5% vs. 0%; $P = 0.037$) (71).

Uzrok Gardnerovog sindroma je mutacija *APC* gena, lokalizovana između kodona 1403 i 1578, za razliku od klasičnog FAP gde se mutacija javlja između 169. i 1600. kodona i atenuiranog FAP gde su mutacije blizu terminalnog amino kraja do 157. kodona (72). Još uvek nije jasno zašto pojedini pacijenti sa istim mutacijama mogu imati različitu fenotipsku ekspresiju (72).

Uzrok Peutz-Jeghersov sindroma (PJS) u najvećem broju slučajeva je germinativna mutacija *STK11/LKB1* (serin/treonin kinaza 11), tumor supresornog gena, koji je lociran na hromozomu 19, na poziciji p13.3. Gen ima varijabilnu penetraciju, što je razlog različitih fenotipskim manifestacija među pacijentima sa PJS (73,74,75). U kancerogenezi, se inaktivacija *STK11* dešava rano i verovatno je praćena prekidima u signalnim putevima u kojima su uključeni *APC* gen/ β -katenin i p53 signalni put, ali do sada nije razjašnjeno u potpunosti.

1.6.4. Sporadični karcinomi kolona i rektuma

Sporadični kolorektalni karcinomi nastaju stečenim somatskim mutacijama u protoonkogenima i tumor-supresornih gena od kojih su neki uključeni i u hereditarne sindrome. Za kancerogenezu sporadičnog CRC neophodno je da dođe do destabilizacije genoma (76). Postoje tri molekularna mehanizma koji predstavljaju molekularnu osnovu sporadičnog CRC: hromozomska nestabilnost (CIN, engl. Chromosomal INstability), mikrosatelitna nestabilnost (MSI, engl. MicroSatellite Instability) i kancerogeneza epigenetskim mehanizmima.

1.6.5. Hromozomska nestabilnost

Fearon i Vogelstein, su 1990. godine, predložili koncept da adenokarcinomi kolona i rektuma nastaju iz intramukoznih, adenomatoznih polipa, progresivnom akumulacijom različitih genetskih poremećaja preko tzv. adenom-karcinom progresije (77). Pokazano je patogeneza svih sporadičnih kolorektalnih karcinoma nije ista, već postoje nekoliko alternativnih molekularnih puteva od kojih svaki podrazumeva specifične somatske mutacije uključujući tačkaste mutacije, amplifikacije, delecije i rearanžmane specifičnih gena. Ovim putem dolazi do gubitka sekvenci u jednom od roditeljskih hromozoma što

rezultira stanjem koje se označava kao gubitak heterozigotnosti (LOH, engl. Loss of heterozygosity). Većina sporadičnih kolorektalnih karcinoma (85%) nastaje putem hromozomske nestabilnosti (Slika 2), koja uključuje somatske mutacije tumor-supresornih gena i protoonkogeni. U oko 70% pacijenata sa CRC postoji LOH na delu hromozoma 18 (78). Ovo je povezano sa lošijom prognozom, obzirom da su u ovom segmentu smešteni tumor-supresorni geni. SMAD4 i DCC (engl. Deleted in Colorectal Cancer) su dva tumor-supresorna gena koji su smešteni u ovom regionu (79). Ostali tumor supresorni geni su: APC (opis dat u prethodnom poglavlju) i TP53 (tumor-p53). Mutacija ili delecija TP53 gena na hromozomu 17 je jedan od ključnih koraka u kolorektalnoj kancerogenezi putem CIN. Funkcije ovog tumor-supresornog gena su vezane za stimulaciju ekspresije čitavog niza gena koji su uključeni u ćelijski ciklus i apoptozu. Nakon niza eventualnih oštećenja ćelijske DNK, normalna p53-indukovana ekspresija rezultira ili zaustavljanjem ćelijskog ciklusa (da bi se oštećenje popravilo) ili ćeliju vodi u apoptozu. U većini tumora dva alela TP53 su inaktivisana, obično kombinacijom misens mutacije i delecijom dela kratkog kraka p, hromozoma 17. Gubitak funkcije TP53 gena je kasniji događaj u predloženoj kancerogenezi od adenoma do karcinoma (80, 81). Mutacija TP53 dovodi do povećane ekspresije p53 proteina i povećanja poluživota ovog proteina što se može imunohistohemijski dokazati (82).

Kirsten-ras (KRAS) je važan protoonkogen čija mutacija nastaju u sklopu kolorektalne kancerogeneze putem hromozomske nestabilnosti. KRAS mutacije su prisutne u oko 40% svih CRC (78). KRAS je nishodni medijator signalnog puta receptora za epidermalni faktor rasta (EGFR, engl. Epidermal Growth Factor Receptor). Mutacija ovog onkogeni je rani događaj u kolorektalnoj kancerogenezi putem CIN (78). Mutacija KRAS gena dovodi do nekontrolisane aktivnosti KRAS proteina nezavisno od aktivacije od strane EGFR. Mutacije se najčešće dešavaju u egzonu 2, kodon 12 i 13. Evropski komitet za zdravlje je preporučio određivanje mutacionog statusa KRAS kod metastatskih CRC pre primene biološke terapije, monoklonskim antitelom na EGFR (83).

Kolorektalni karcinomi koji nastaju putem CIN su obično aneuploidni i imaju lošiju prognozu u poređenju sa tumorima koji nastaju putem mikrosatelitne nestabilnosti (78).

1.6.6. Mikrosatelitna nestabilnost

Drugi model nastanka kolorektalnih karcinoma podrazumeva kancerogenezu putem mikrosatelitne nestabilnosti (Slika 2). MSI nastaje kao posledica inaktivacije nekog od gena uključenih u mehanizme reparacije DNK nakon replikacije. Inaktivacija ovih gena može nastati na dva načina: nasledna kao kod Lynch sindroma (LS) ili stečena, sporadični slučajevi CRC.

Mikrosatelitna nestabilnost u sporadičnim tumorima nastaje zbog epigenetskog fenomena tj. metilacije promotorskog regiona hMLH1 što dovodi do utišavanja ovog gena i nastanka većeg broja grešaka u genomu nakon replikacije.

Mutacije BRAF gena se nalaze u 8-10% svih kolorektalnih tumora koji nastaju kancerogenezom putem mikrosatelitne nestabilnosti (84). BRAF je serin-treonin specifična kinaza i deo je signalnog puta RAS/RAF/MAPK. Mutiran gen dovodi do povišene aktivnosti ove kinaze, što za posledicu ima hiperproliferaciju ćelija i inhibiciju apoptoze. U 80% nastaje mutacija u 15 egzonu, aminokiselinska supstitucija, V600E (85). Ispitivanja su pokazala da pacijenti sa tumorima koji imaju nemutirani (wild type) KRAS gen i dobijaju pomenutu biološku terapiju imaju bolju prognozu ukoliko je i BRAF nemutiran (86). Drugi značaj ovog gena jeste u dijagnostici Lynch sindroma, jer prisustvo BRAF mutacije u mikrosatelitno nestabilnom tumoru, isključuje ovaj sindrom (87).

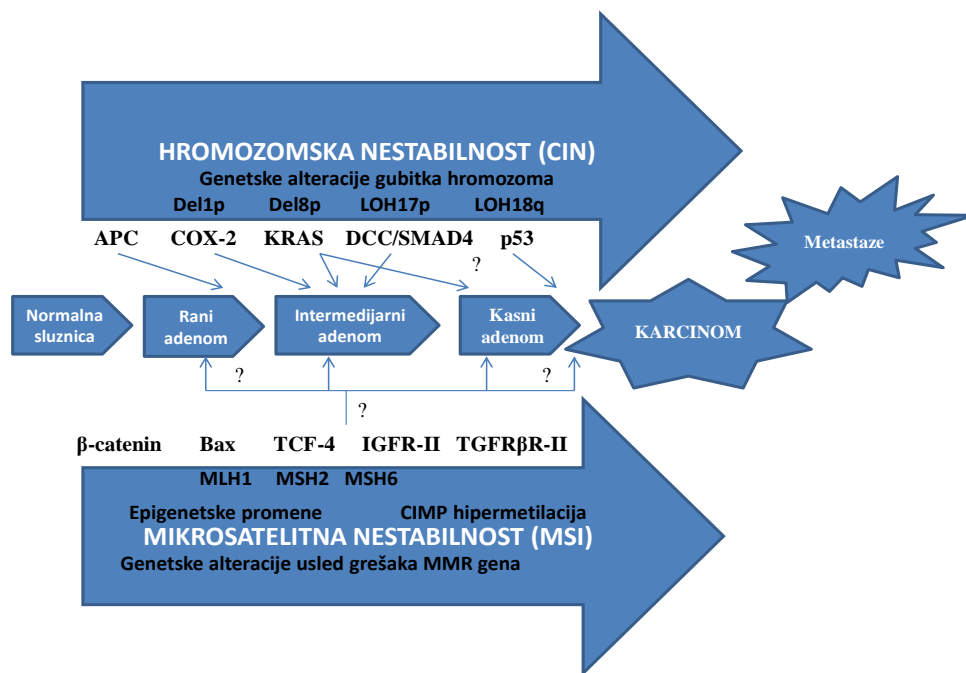
1.6.7. Epigenetski mehanizmi u kancerogenezi kolorektalnog karcinoma

Osim kancerogeneze putem hromozomske i mikrosatelitne nestabilnosti (Slika 2), otkriven je treći put nastanka CRC koji se odvija epigenetskim događajima koji dovode do utišavanja gena. Najčešće se radi o metilaciji u promotorskom regionu tumor supresornih gena kao epigenetskom događaju.

CpG (Citozin i Guanin, p označava fosfodietersku vezu između ova dva nukleotida) ponovci čine oko 40% promotorskih regiona mnogih gena kod čoveka (88). Inaktivacija tokom transkripcije citozinskom metilacijom CpG ponovaka unutar promotorskog regiona tumor-supresornih gena je važan mehanizam u humanoju kancerogenezi. Veliki broj tumor-supresornih gena se inaktivira na ovaj način. Određen broj CRC nastaje na ovaj način, i ovakav fenotip je označen kao CpG metilacioni fenotip

ili engl. CIMP (CpG Island Methylation Phenotype) (89). CIMP se nametnuo kao jedinstveni epigenetski fenomen i poseban fenotip kolorektalnog kancera. Stepem metilacije može biti visok i nizak i shodno tome se metilacioni fenotipovi označavaju sa CIMP pozitivni i CIMP negativni. CIMP pozitivni kolorektalni karcinomi imaju različit klinički, patohistološki i molekularni profil. Osoba ženskog pola sa sporadičnim CRC u desnom kolonu koji je najčešće mikrosatelitno nestabilan uz BRAF mutaciju, ređe mutaciju P53 gena, ima CIMP pozitivan tumor. Unutar grupe tumora koji nastaju putem mikrosatelitne nestabilnosti, CIMP fenotip je udružen sa mutacijom TGF β 2, receptor za transformišući faktor rasta β (91) koji je opisan u daljem tekstu. Metod za određivanje stepena metilacije u tumorima pomoću markera, do danas nije standardizovan, ali se sve češće koristi panel od 4 do 8 markera za CpG ponovke unutar sledećih gena CACNA1G, CDKN2A, CRABP1, IGF2, hMLH1, NEUROG1, RUNX3, SOCS1At, koristeći PCR reakciju specifičnu za metilaciju (Methylation-specific PCR) (90-92).

MSI fenomen u sporadičnim CRC nastaje usled metilacije hMLH1 gena u sklopu CIMP, mada može postojati i tip sporadičnih mikrosatelitno nestabilnih CRC, ali CIMP negativnih tumora (93). Populacione studije ukazale su da je frekvencija MSI-H, CIMP negativnih tumora oko 5%, stoga je verovatno da više od polovine ovih tumora ne spada u Lynch sindrom obzirom da na njegovu učestalost do 3% (94).



Slika 2. Genetska nestabilnost u kolorektalnom karcinomu

(Različiti geni koji igraju ulogu u kolorektalnoj kancerogenezi: APC, adenomatous polyposis coli; BAX, Bcl-2-associated X protein; COX, cyclo-oxygenase; DCC, deleted in colorectal cancer; IGF-IIR, insulin-like growth factor II receptor; TCF, T cell factor, TGF-βR, transforming growth factor β receptor; MLH, MutL homologue; MSH, MutB homologue; Smad, mothers against decapentaplegic homologue (Drosophila). Ostale skraćenice: CIMP, CpG island methylator phenotype; LOH, loss of heterozygosity; Smad, mothers against decapentaplegic homologue (Drosophila). Slika je napravljena na osnovu publikacije Soreide i saradnika.

1.7. Mikrosatelitna nestabilnost kao genetski marker

Ubrzo nakon publikacija vezanih za višestepeni model CRC kancerogeneze (adenom-karcinom sekvenca), mnogi istraživači su započeli ekstenzivne pretrage genoma u cilju pronalazjenja novih tumor-supresornih gena. Manuel Perucho je 1992. godine istraživao DNK sekvence u tkivu kolorektalnog karcinoma i upoređivao sa DNK zdravog tkiva istog pacijenta (95). Na ovaj način selektovani su regioni sa delecijama DNK u tumorskom tkivu u kojima bi se mogao nalaziti tumor-supresorni gen. Pažljivom analizom došlo se do činjenice da su u 12% tumora pojedini segmenti DNK bili kraći za nekoliko baznih parova. Sekvenciranjem ovih regiona DNK utvrđeno je da se oni sastoje od poliadeninskih lanaca i čine mikrosatelitne regione. Istovremeno su u laboratoriji Stephen Thibodeau istraživane dinukleotidne repetitivne sekvence koje su bile pogodne za gensko mapiranje i za analizu gubitka heterozigotnosti. Tada je primećena delecija u ovim regionima, [CG]_n sekvencama. Ova mutacija je prvi put nazvana „Mikrosatelitna nestabilnost“, označena kao MIN (od engl. Microsatellite INstability). Kao i Perucho i Thibodeau je prepoznao novi model kancerogeneze CRC, koji nema elemenata za gubitak heterozigotnosti i hromozomsku nestabilnost (96). Aaltonen i saradnici su istraživali mikrosatelitni marker na hromozomu 2 (D2S123) u dve familije sa LS, i testirali hipotezu o tumor supresornom genu koji je odgovoran za nasledni CRC (97). Umesto tumor-supresornog gena, naišli su na mikrosatelitnu nestabilnost u ovom regionu i nazvali su je greška u replikaciji – RER (engl. Replicative error). Utvrđeno je da pacijenti sa Lynch sindromom imaju delecije u velikom broju mikrosatelitnih sekvenci širom genoma. Takođe, je zapaženo da izvestan broj sporadičnih CRC (od 12% do 28%) ima delecije u mikrosatelitnim sekvencama. MSI je bio prvi DNK marker koji se koristi u dijagnostici naslednog CRC. U daljim istraživanjima je otkriveno da MSI nastaje kao posledica grešaka MMR sistema i identifikovano je 4 MMR gena koji su genetska osnova LS.

Boland i saradnici (50) su zabeležili da je otkriće mikrosatelitne nestabilnosti u kolorektalnom karcinomu i njena povezanost sa hereditarnim nepolipoznim karcinomima kolona (HNPCC) je otvorilo novo poglavlje u tumorskoj biologiji kao i u kliničkom vođenju pacijenta koji su skloni razvoju naslednih kancerskih sindroma, još 1993.

1.7.1. Mikrosatelitna nestabilnost – dijagnostički značaj

Kolorektalni karcinomi koji nastaju MSI mehanizmom obično se nalaze u desnom kolonu i dijagnostikuju se u ranijem stadijumu. Pretpostavlja se da ovi tumori imaju bolju prognozu, i da ne reaguju na 5-FluoroUracil (5-FU) adjuvantnu hemoterapiju. Ovo se naročito odnosi na CRC u III stadijumu, dok je II stadijum bolesti i odgovor na hemoterapiju u odnosu na MSI status tumora kontroverzan (49, 50, 96).

In vitro studije su pokazale da defekt u MMR genima rezultira rezistencijom CRC na 5-FU (98). Koliko je značajno odrediti mikrosatelitni status tumora, govori činjenica da je u poslednjoj ediciji TNM sistema klasifikacije date i preporuke i kodovi za MSI testiranje kao sastavni deo određivanja stadijuma bolesti, i u cilju da li pacijent treba da dobije adjuvantnu hemoterapiju (45).

Važna klinička implikacija MSI testiranja je u dijagnostici HNPCC/LS i predstavlja skrining test za ovaj hereditarni kolorektalni kancerski sindrom. Mikrosatelitna nestabilnost ukazuje na insuficijentan MMR sistem stoga kod ovih pacijenta treba razmotriti HNPCC/LS u skladu kliničko-patohistološkim nalazima i dostupnim molekularnim testovima.

Obzirom da se dijagnoza LS bazira na identifikaciji germinativne mutacije MMR gena, neophodno je napraviti selekciju pacijenata, na prvom mestu kliničkim i patohistološkim kriterijumima, a potom korišćenjem genetskih testova (mikrosatelitna nestabilnost, imunohistohemija MMR proteina, metilacija promotora hMLH1 gena, BRAF mutacija V600E), obzirom da sekvenciranje MMR gena skupa i zahtevna procedura. Skrining se danas sistemski radi u mnogim zemljama, određivanjem MSI u tumorskom tkivu kolorektalnog i endometrijalnog karcinoma, bilo genetskom analizom ili imunohistohemijskom analizom četiri MMR proteina (hMLH1, MSH2, MSH6, PMS2). Imunohistohemijskom analizom može se pretpostaviti koji je MMR gen mutiran, ali sa druge strane pojedine „missense“ mutacije mogu funkcionalno inaktivirati korespondentni MMR protein (što uzrokuje mikrosatelitnu nestabilnost). U ovom slučaju nema promena u ekspresiji proteina koja se detektuje imunohistohemijski (lažno negativni rezultati). U svetu se preporučuju obe metode, kao komplementarne, služeći jedna drugoj kao kontrola. MSI CRC su sporadični ili hereditarni zavisno od činjenice da li je MSI nastala kao posledica nasledne mutacije nekog od MMR gena ili kod sporadičnih CRC inaktivacijom

hMLH1 gena, metilacijom njegovog promotora (epigenetska promena). Postoje 4 mogućnosti (64) u konačnoj odluci, vezanoj za dijagnostiku LS:

- A. Nema mikrosatelitne nestabilnosti i/ili detektabilna sva 4 MMR proteina. Ovo je mikrosatelitno stabilni tumor i nije u sklopu LS. Ukoliko postoji porodično opterećenje kod ovog pacijenta u smislu CRC ili tumora povezanih sa LS, može se raditi o „fenokopiji“ ili o pacijentu sa familijarnim CRC u sklopu sindroma X.
- B. Postoji mikrosatelitna nestabilnost i detekcija svih MMR proteina imunohistohemijski. Ukazuje na MSI koja je nastala u tumoru usled missense mutacije nekog od MMR gena, koja dovodi do njegove funkcionalne inaktivacije, ali ne utiče na ekspresiju. Ovaj pacijent najverovatnije ima LS, i neophodno je sekvenciranje svih MMR gena do detekcije mutacije.
- C. Nema nestabilnosti (mikrosatelitno stabilan tumor), ali postoji deficit nekog od MMR proteina. Pacijent u ovom slučaju ima, najverovatnije, mikrosatelitno nestabilan tumor iako MSI nije detektovana. Pretpostavlja se da je lažno negativan rezultat dobijen zbog male količine tumorskih ćelija u analiziranom uzorku (27). Neophodno je ponoviti analizu MSI, u drugom uzorku nakon upotrebe mikrodisektora, da bi se potvrdio rezultat imunohistohemije. U ovom slučaju se razmatra sekvenciranje MMR gena u skladu sa kliničkim i patohistološkim karakteristikama tumora, počevši od onog gena, čiji protein nije detektovan imunohistohemijski.
- D. Postoji MSI, ali i nedostatak nekog MMR proteina imunohistohemijskom analizom. Ukoliko je odsutan MLH1 protein, neophodna je analiza metilacionog statusa hMLH1 gena. Ukoliko je promotor hMLH1 gena metilovan, tumor je sporadičan, i u 50% slučajeva tumor ima i BRAF mutaciju. U slučaju da promotor hMLH1 gena nije metilovan, verovatno se radi o LS i tada je neophodno uraditi sekvenciranje hMLH1 gena. Ukoliko su pojedinačno odsutni ostali MMR proteini, neophodno je sekvencirati adekvatne MMR gene (MSH2, PMS2 ili MSH6).

Prateći navedeni algoritam, mogu se detektovati čak i pacijenti sa LS koji ne ispunjavaju Bethesda kriterijume, čime se postiže ograničavanje metode sekvenciranja

MMR gena na izdvojene slučajeve, radi definitivne potvrde mutacije i postavljanja dijagnoze LS.

1.7.2 Mikrosatelitni markeri – mononukleotidni i dinukleotidni

Mikrosateliti su tandemski ponovci niza od jednog do četiri nukleotida koji se nalaze na različitim lokacijama duž svih hromozoma. Usled visokog stepena polimorfizma mikrosatelitnih lokusa jedna osoba može da ima različit broj ponovaka na homologom hromozomskom paru, što se označava kao heterozigotnost. Primer mikrosatelita je (CG)_n ponovaka. N može varirati između alela, što može biti uzrok pojave polimorfizma. Polimorfizam u ovim regionima se dešava češće kada je $n > 10$. Sekvenca, koja se ponavlja, sadrži od 1 do 4 nukleotida, i može biti ponavljana od 3 do 100 puta. U mikrosatelitnim regionima postoji veća stopa mutacija u odnosu na ostale regione DNK. Ova visoka stopa mutacija može se objasniti pogrešno sparenim nukleotidima (engl. mispairing) tokom replikacije DNK na jednom DNK lancu. Pojedine greške u replikaciji ispravljaju geni koji učestvuju u mehanizmima reprecije DNK nakon replikacije, ali neke i ostaju (99).

Tumorske ćelije se brže dele, te postoji mogućnost učestalijih postreplikacijskih grešaka u mikrosatelitnim regionima. Tumor koji karakteriše MSI, ima različitu dužinu repetitivnih sekvenci DNK u odnosu na normalnu, netumorsku DNK. Mnogi regioni genoma koji sadrže mikrosatelitne ponovke su istraživani sa ciljem da bi se dijagnostikovali mikrosatelitno nestabilni tumori. U zavisnosti od tipa (mono, di, trinukleotida) i broja analiziranih mikrosatelitnih ponovaka, publikovan je veliki broj postupaka za detekciju MSI u različitim tumorima. 1997. godine održan je Internacionalni konsenzus koji je predložio Bethesda panel markera za determinaciju MSI statusa (50). Ovaj panel se sastoji od 2 mononukleotidna (BAT 25 i BAT 26) i 3 dinukleotidna ponovka (D5S346, D2S123 i D17S250). BAT 25 predstavlja mikrosatelitni mononukleotidni marker u genu c-kit sa mikrosatelitnom sekvencom (MS) od 25 timinskih nukleotida (25T). BAT 26 je, takođe, mononukleotidni mikrosatelitni marker, koji se nalazi unutar gena hMSH-2, MS od 26T. Mikrosatelitna nestabilnost u jednom mikrosatelitnom lokusu se klasifikuje kao nizak stepen nestabilnosti MSI-L (L - Low). Tumor koji pokazuje nestabilnost dva ili više mikrosatelitnih lokusa predstavlja MSI-H (H - High). Ukoliko ne postoji nestabilnost ni u jednom mikrosatelitnom markeru, tumor je mikrosatelitno stabilan (MSS). Pokazano je da MSI-L tumori imaju slično biološko ponašanje kao i MSS tumori,

dok se MSI-H izdvajaju kao posebna grupa sporadičnih ili naslednih (LS) kolorektalnih karcinoma (50).

Svaki od dinukleotidnih ponovaka iz pomenutog panela je pokazivao nestabilnost u svega 60-80% MSI-H tumora (100). Upotreba većeg broja dinukleotidnih ponovaka može dovesti do pogrešno klasifikovanog MSI-H tumora (tumor koji je MSI-H može biti klasifikovan kao MSS) (101). Dinukleotidne mikrosatelitne sekvence su sklonije polimorfizmima, i korišćenje takvih markera za detekciju MSI u tumorima, zahteva kontrolno, zdravo tkivo istog bolesnika (korespodentno, npr. krv). Stoga, upotreba dinukleotidnih markera čini analizu MSI vremenski i tehnički zahtevnijom. Često se dešava da korespodentna DNK, iz zdravog tkiva pacijenta i nije dostupna. Pokazano je da mutacije hMSH6 gena uopšte ne dovode do alteracije tj. mutacija u dinukleotidnim sekvencama (102).

U značajnom broju tumora, analiza mononukleotidnih ponovaka BAT-25 i BAT-26 je dovoljna da potvrdi njihov MSI status, bez upotrebe korespodentne DNK, iz razloga njihovog „kvazimonorfizma” kod ljudi bele rase (100-103). „Kvazi” monorfizam podrazumeva male varijacije i odstupanja u dužini fragmenata u oba alela između osoba jedne rase (103). BAT-25 i BAT-26 pokazuje polimorfizam od 18,4% i 12,6% kod Afroamerikanaca (101, 103). Kod ljudi bele rase takođe postoji polimorfizam ovih alela u manjem procentu (104). Iz ovog razloga BAT-25 i BAT-26 nisu dovoljni sa detekciju MSI u svim populacijama, neophodni su dodatni mikrosatelitni markeri, posebno u slučaju sumnjivog polimorfizma. 2002. godine publikovana je studija francuskih autora u kojoj je predstavljena metoda sa 5 mononukleotidnih markera (BAT-25, BAT-26, NR-21, NR-22 i NR-24) koja ima specifičnost i senzitivnost od 100% za detekciju MSI bez neophodnog određivanja MSI statusa u korespodentnom, netumorskom, zdravom tkivu. NR-21, NR-22 i NR-24 su mikrosatelitni, mononukleotidni markeri (kao i BAT-25 i BAT-26) koji sadrže repetitivne sekvence koje se nalaze unutar sledećih gena SLC7A8, gen transmembranski prekursori protein B5 odnosno zinc-finger 2. U sekvencama pomenutih gena nalaze se mikrosatelitne sekvence od 21, 22 odnosno 24 timinska ponovaka (po redosledu NR-21, NR-22 odnosno NR-24) (103). Skorašnja studija danskih autora je takođe pokazala pouzdanost mononukleotidnih markera za detekciju MSI (105).

1.7.3. „Target“ geni za mikrosatelitnu nestabilnost

Mikrosatelitna nestabilnost nastaje usled inaktivacije nekog od gena zaduženih za reparaciju DNK nakon replikacije, kako je već pomenuto. Inaktivacija nekog od MMR gena je neophodna, ali ne i dovoljna za malignu transformaciju ćelije. Do danas su prepoznati mnogi geni koji sadrže mikrosatelitne sekvence koje su sklone mutacijama tokom MSI kancerogeneze. Ovi geni su target geni za MSI. Prvi ovakav gen je prepoznat 1995. godine i važan je za kolorektalnu kancerogenezu putem MSI kao tumor-supresorni gen, TGF β 2 (receptor za transformišući faktor rasta β 2) koji sadrži mikrosatelitnu sekvencu od 10 nukleotida adenina u kodirajućem regionu. U ovom regionu dolazi do delecije 1-2 bazna para u oko 80% CRC nastalih putem mikrosatelitne nestabilnosti (106). Drugi geni koji su mutirani u MSI kancerogenezi i sadrže mikrosatelitne sekvence unutar kodirajućih regiona su: BAX (proapoptotski gen; engl. Bcl-2–Associated X protein; sadrži 8 nukleotida guanina), hMSH3, hMSH6 (MMR geni) i IGFIIR (engl. insulin-like growth factor II receptor; sadrži 8 vezanih nukleotida guanina). Do danas je opisano oko 30 target gena koji su uključeni u MSI kancerogenezi (najpoznatiji su dati u Tabeli 3).

Kancerogeneza putem MSI je karakteristična ne samo za kolorektalni karcinom, već i za sporadične karcinome želuca i endometrijuma. U ovim karcinomima tokom nastanka i progresije neoplastičnog procesa dolazi do pojave mutacija unutar različitih target gena za MSI. Studije su pokazale veću stopu mutacije TGF β 2 u MSI karcinomima kolona u odnosu na MSI karcinom želuca. Najmanju stopu mutacije ovog gena ima MSI karcinom endometrijuma (107).

Pomenuti mikrosatelitni markeri, BAT-25 i BAT-26, predstavljaju mikrosatelitne sekvence u nekodirajućim regionima koji tokom kancerogeneze mutiraju u vidu postepene delecije baznih parova. Smatra se da veličina delecije u ovim nekodirajućim mikrosatelitnim sekvencama dobro koreliše sa brojem mutiranih target gena (108). U Tabeli 3 su prikazani target geni za mikrosatelitnu nestabilnost i njihova stopa mutacije u kolorektalnom karcinomu koji nastaje putem MSI kancerogeneze.

Target gen	Funkcija	Repetitivna sekvenca	Stopa mutacije u CRC
<i>ACTRII</i>	Receptor za FR	(A)8	58%
<i>APAF-1</i>	Apoptoza	(A)8	3-13%
<i>AXIN-2</i>	Wnt-signalni put	(A)6*2; (G)7; (C)6	24%
<i>BAX</i>	Apoptoza	(G)8	13-54%
<i>BCL-10</i>	Apoptoza	(A)8	13%
Caspase-5	Apoptoza	(A)10	26-73%
<i>MSH-3</i>	MMR mehanizam	(A)8	26-53%
<i>MLH-3</i>	MMR mehanizam	(A)9	9%
<i>FAS</i>	Apoptoza	(T)7	10%
<i>MSH-6</i>	MMR mehanizam	(C)8	9-50%
<i>hG4-1</i>	Ćelijski ciklus	(A)8	21%
<i>IGFIIR</i>	Receptor za FR	(G)8	6-36%
<i>PTEN</i>	Ćelijski ciklus	(A)6*2	19%
<i>RHAMM</i>	Motilitet ćelije	(A)9	19%
<i>RIZ</i>	Ćelijski ciklus i apoptoza	(A)8; (A)9	25%
<i>TGFβRII</i>	Receptor za FR	(A)10	61-100%

Skraćenice: FR-faktor rasta, A-adenin, G-guanin, T-timin

Tabela 3. Target geni za mikrosatelitnu nestabilnost i njihova stopa mutacije u MSI kolorektalnom karcinomu

1.8. Patohistološki prediktori mikrosatelitne nestabilnosti

Brojne publikacije identifikovale su patohistološke parametre koji su povezani sa MSI-H fenotipom kolorektalnog karcinoma. Slabiji stepen diferentovanosti, mucinska produkcija, ekspanzivni rast neke su od pomenutih patohistoloških odlika MSI-H kolorektalnog karcinoma (26).

Treći Bethesda revidirani kriterijum obuhvata određene patohistološke karakteristike kolorektalnog karcinoma (prisutni tumor infiltrišući limfociti, "Crohn-like" limfocitna reakcija, mucinozna ili "signet ring" diferencijacija) kod bolesnika starosti od 50 od 60 godina. Za ove patohistološke karakteristike se smatra da su visoko sugestibilne za MSI. Bez starosne granice iste patohistološke karakteristike se u literaturi označavaju kao „*MSI histology*“ (50) za šta će u daljem tekstu konzistentno biti korišćen izraz MSI histologija.

2007. godine Jenkins i saradnici (109) su objavili MsPath skor kojim se pomoću patohistoloških kriterijuma računa verovatnoća da tumor ima MSI-H fenotip. MsPath model uključuje 6 kliničkih i patohistoloških karakteristika: starost pacijenta prilikom postavljanja dijagnoze (ispod 50 godina – 0,7), lokalizaciju tumora (cecum, ascendens ili transverzalni kolon – 1,6), histološki tip tumora (mucinozni, signet ring ili nediferentovani – 1,1), stepen diferentovanosti tumora (slab stepen diferentovanosti -0,6), inflamatorna reakcija kao u Kronovoj bolesti (Crohn-like) (prisutna – 0,5), tumor infiltrišući limfociti (prisutni – 2,1). Autori su preporučili graničnu vrednost (cutoff) MsPath skora od 1,0, kako bi povećali specifičnost i održali visoku senzitivnost za predikciju MSI-H CRC.

1.9. Ostali genetski markeri u kolorektalnom karcinomu

Molekularni markeri se mogu podeliti na dijagnostičke, prognostičke i prediktivne. Podela nije striktna, obzirom da jedan marker može biti korišćen i u dijagnostičke i na primer u prognostičke svrhe. Nekoliko proteina i genetskih markera je opisano da bi se dobio što idealniji prognostički marker i predvideo odgovor adjuvantne hemoterapije. Proučavani genetski markeri su obično vezani za somatske mutacije i za adenom-karcinom sekvencu (prognostički markeri) (77).

Najpoznatiji i najviše proučavani genetski markeri u kolorektalnom karcinomu su: KRAS, APC i β -catenin, p53, LOH, epigenetska i mikrosatelitna nestabilnost.

KRAS je prognostički i skoro idealan prediktivni marker u CRC. Mutacije su lako detektabilne i ograničene na 12. i 13. kodon drugog egzona. Drugo, 99% pacijenata sa mutiranim KRAS neće imati korist od biološke terapije (monoklonska antitela na EGFR), čime se dobija visoka negativna prediktivna vrednost ovog markera. Generalno, pacijenti sa CRC i mutiranim KRAS imaju lošiju prognozu (78).

Iako je mutacija APC gena rani događaj u kolorektalnoj kancerogenezi putem hromozomske nestabilnosti, nema definisanog kliničkog značaja obzirom na veliki broj opisanih mutacija u ovom genu. Ovaj gen je detaljno opisan u poglavlju vezanom za FAP.

Gubitak heterozigotnosti (LOH) kratkog kraka hromozoma 17, gde je smešten tumor-supresorni gen TP53, je čest nalaz kod CRC. Povećana ekspresija proteina p53 u tumorskom tkivu može se dokazati i imunohistohemijski. Podaci o njegovom

prognostičkom značaju su kontroverzni (80,81). U kolorektalnom karcinomu na terenu inflamatornih bolesti creva, mutacija p53 je rani molekularni događaj (110).

LOH dugog kraka hromozoma 18 (18q) je česta citogenetska abnormalnost u CRC i povezana je sa lošijom prognozom. U ovom regionu, kao što je napomenuto, smeštena su dva tumor-supresorna gena, DCC i SMAD4. Za DCC nema jasnog prognostičkog značaja. Za SMAD4 gen, koji se nalazi u TGF β signalnom putu, se smatra da je povezan sa lošijom prognozom i lošim odgovorom na adjuvantnu 5-Fluoro-Uracil (5-FU) terapiju. LOH 18q je marker hromozomske nestabilnosti (78).

Epigenetska nestabilnost tj. metilacija promotorskih regiona gena okarakterisana je kao noviji prognostički marker. Niži stepen metilacije, hipometilacija je povezana sa hromozomskom nestabilnošću i samim tim lošijom prognozom (94).

2. HIPOTEZA I CILJEVI ISTRAŽIVANJA

2.1. Hipoteza

Na osnovu dosadašnjih istraživanja postavljena je sledeća hipoteza:

Visok stepen mikrosatelitne nestabilnosti udružen sa kliničkim i patohistološkim parametrima (godine života, lokalizacija tumora, limfocitna infiltracija, mucinska produkcija, stepen diferentovanosti tumora) predstavlja prediktivni marker koji ukazuje na duže preživljavanje pacijenata sa CRC i bolju prognozu bolesti u odnosu na tumore bez ili sa niskim stepenom mikrosatelitne nestabilnosti.

2.2. Ciljevi istraživanja

- a) utvrđivanje korelacije između kliničkih (lokalizacije tumora, starosti pacijenata) i patohistoloških parametara (diferentovanost, limfocitna infiltracija, mucinska produkcija tumora, kao i Dukes/AJCC stadijum u momentu operacije) u odnosu na mikrosatelitni status tumora.
- b) utvrđivanje značaja prisustva mikrosatelitne nestabilnosti za predikciju preživljavanja i prognozu toka bolesti kod pacijenata sa CRC.
- c) selekcija pacijenata sa MSI-H CRC radi daljeg kliničkog praćenja samih pacijenata kao i članova porodice (mogući nasledni tip CRC – HNPCC).

3. PACIJENTI I METODOLOGIJA RADA

3.1. Pacijenti

U istraživanje je uključeno 150 pacijenata muškog i ženskog pola sa kolorektalnim karcinomom koji su hospitalizovani radi operativnog lečenja na Klinici za digestivnu hirurgiju, Kliničkog Centra Srbije.

Kriterijumi za uključivanje pacijenata u studiju su:

- Pacijenti do 75 godina starosti sa patohistološki potvrđenim adenokarcinomom kolona i rektuma i potpisanim informisanim pristankom

Kriterijumi za neuključivanje pacijenata u studiju:

- Pacijenti sa karcinomom kolona i rektuma na terenu familijarne adenomatozne polipoze (na osnovu anamnestičkih podataka, operativnog i patohistološkog nalaza)
- Pacijenti sa kolorektalnim karcinomom na terenu inflamatornih bolesti creva (na osnovu podataka o postojanju preegzistentne Kronove bolesti i ulceroznog kolitisa)
- pacijenti sa kolorektalnim karcinomom preko 75 godina starosti
- pacijenti sa drugim patohistološkim tipovima kolorektalnog karcinoma (planocelularni, melanom)

3.2. Dizajn studije

Studija ima karakteristike prospektivne kohortne studije. U Klinici za digestivnu hirurgiju je sproveden klinički deo istraživanja tj. intervjuisanje pacijenata, preoperativno kliničko ispitivanje u cilju određivanja stadijuma bolesti (NMR, kompjuterizovana tomografija, ehosonografija abdomena), od Juna 2006. godine do Septembra 2010. godine. Operativni uzorci tkiva tumora, su analizirani rutinski od strane patologa, bez uvida u mikrosatelitni status tumora. Genetsko istraživanje, testiranje uzorka tumorskog tkiva na mikrosatelitnu nestabilnost, je sprovedeno u Genetskoj laboratoriji Instituta za endokrinologiju, dijabetes i metaboličke poremećaje Kliničkog Centra Srbije.

Pacijenti su intervjuisani u vezi porodične anamneze i pratećih komorbiditeta koji su potvrđeni uvidom u dostupnu medicinsku dokumentaciju. U studiji su bili praćeni sledeći klinički parametri: godine starosti, pol, porodična i lična anamneza vezana za gastrointestinalne i ostale karcinome vezane za Lynch sindrom (endometrijum, želudac, mokraćna bešika, ureter, bubreg, bilijarni trakt, glioblastom mozga, sebacealni adenomi, tumori tankog creva) kao i lokalizacija karcinoma. Na osnovu dobijenih podataka, zaključeno je da li pacijent ispunjava bilo koji od revidiranih Bethesda kriterijuma koji su dati u Tabeli 4.

Tabela 4. Revidirani Bethesda kriterijumi

B1 Pacijenti mlađi od 50 godina sa CRC
B2 Prisustvo sinhronih ili metahronih CRC ili tumora udruženih sa LS (želudac, mokraćna bešika, ureter, bubreg, bilijarni trakt, glioblastom mozga, sebacealni adenomi, tumori tankog creva) bez obzira na uzrast
B3 CRC dijagnostikovani pre 60. godine sa patohistološkim karakteristikama sugestibilnim za mikrosatelitnu nestabilnost: (prisutni tumor infiltrišući limfociti, "Crohn-like" limfocitna reakcija, mucinozna ili "signet ring" diferencijacija)
B4 CRC kod pacijenata sa jednim ili više rođaka prvog stepena srodstva sa CRC ili tumorima udruženim sa LS (dijagnostikovani pre 50. godine ili pre 40. godine kada je reč o adenomima)
B5 CRC kod pacijenata sa dva ili više rođaka sa CRC ili drugim karcinomima koji se mogu javiti u sklopu LS, bez obzira na godine starosti

(neophodno je ispuniti bar jedan kriterijum)

Pacijenti su imali karcinome kolona i rektuma. Karcinomi kolona i rektuma su podeljeni na proksimalne karcinome kolona (tumor lokalizovan posle lijenalne fleksure kolona, u transverzalnom, ascendentnom kolonu i cekumu), distalne karcinome kolona (karcinomi descendentnog, sigmoidnog kolona) i karcinome rektuma. Karcinomi rektuma se mogu svrstati i posmatrati zajedno sa karcinomima distalnih partija kolona (7).

3.3. Patohistološke karakteristike tumora

Tumori su bili patohistološki rutinski analizirani, bez znanja patologa o mikrosatelitnom statusu tumora. Iz patohistoloških nalaza će biti posebno razmatrana mucinska produkcija u tumoru, prisustvo limfocitnog infiltrata, diferentovanost tumora, Dukes stadijum, AJCC stadijum.

Mucinska produkcija u tumoru je kategorisana kao:

- nizak stepen mucinske produkcije (0=0-33%)
- umeren stepen (1=33-66%)
- visok stepen mucinske produkcije (2=preko 66% preparata tumora).

Limfocitni infiltrat u tumorskom tkivu je stepenovan kao:

- prisutan (1 = više od 5 limfocita/10 polja velikog uveličanja)
- odsutan (0 = manje od 5 limfocita/10 polja velikog uveličanja).

Diferentovanost tumora je stepenovana na sledeći način:

- dobra (3)
- umerena ili srednja (2)
- slaba (1) diferentovanost tumora.

Za pacijente ispod 60 godina računat je MsPath skor sabiranjem koeficijenata šest kliničko-patohistoloških karakteristika tumora (Tabela 5). Prisutni tumor infiltrišući limfociti, “Crohn-like” limfocitna reakcija, mucinozna ili “signet ring” diferencijacija su patološke karakteristike koje su pomenute u trećem revidiranom Bethesda kriterijumu i označavaju se kao MSI histologija (engl. MSI histology). Patohistološki nalazi svih pacijenata analizirani su u smislu ispunjavanja kriterijuma za MSI histologiju, što je korelisano sa njihovim MSI statusom.

Tabela 5. MsPath skor (109)

Kliničko-patohistološka karakteristika	koeficijent
Starost prilikom postavljanja dijagnoze	
<50 godina	0,7
>50 godina	0,0
Lokalizacija tumora	
Cekum, ascendentni i transverzalni kolon	1,6
Descendentni, sigmoidni kolon i rektum	0,0
Histološki tip	
Mucinozni „signet ring“ ili nediferentovani	1,1
Adenokarcinom	0,0
Histološki gradus	
Slabo diferentovani	0,6
Umereno i dobro diferentovani	0,0
Kronu-slična reakcija limfocita	
Prisutna	0,5
Odsutna	0,0
Tumor-infiltrirajući limfociti	
Prisutni	2,1
Odsutni	0,0

Granična vrednost skora=1

3.4. Određivanje mikrosatelitne nestabilnosti

Metodologija određivanja mikrosatelitne nestabilnosti zasniva se na primeni pentaplex PCR reakcije za analiziranje pet mikrosatelitnih markera za mononukleotidne ponovke i to:

- BAT 25 za gen c-kit sa mikrosatelitnom sekvencom (MS) od 25 timinskih nukleotida (T); normalni fragment (NF) dužine 124 bp
 - BAT 26 za gen hMSH-2, MS od 26T; NF dužine 120 bp
 - NR 21 za gen SLC7A8, MS od 21T; NF dužine 103 bp
 - NR 22 za gen transmembranski prekursori protein B5, MS od 22T; NF dužine 142 bp
 - NR 24 za gen zinc-finger 2, MS od 24T; NF dužine 132 bp
- Prajmeri za mikrosatelitne markere dati su u Tabeli 6.

Reč je o fragmentoj analizi, jednoj PCR reakciji sa pet prajmer parova koji su obeleženi različitim fluorescentnim bojama (Tabela 6). Kako se analizira pet mikrosatelitnih markera u jednoj PCR reakciji, reakcija je nazvana PENTAPLEX – PCR.

PCR produkti amplifikovani su u volumenu od 25 μ l koji je sadržao:

- 100 ng DNK izolovane iz tumorskog tkiva
- 1x Taq pufera (500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl pH 8.3, 15 mM Mg(OAc)₂)
- 1 μ mol svakog prajmera
- 200 μ mol/L dNTP mešavine (dATP, dGTP, dCTP, dTTP),
- 1,5mM MgCl₂
- 0,75 U (jedinica) Taq DNK polimeraze
- Sterilna redestilovana voda do volumena od 25 μ l

PCR amplifikacija je izvedena pod sledećim uslovima:

- Inicijalna denaturacija na 94°C u trajanju od 5 min
- 35 ciklusa denaturacije na 94°C u trajanju od 30 s, aniling na 55°C u trajanju od 30 s i ekstenzije na 72°C u trajanju od 30 s,
- Finalna ekstenzija na 72°C u trajanju od 7 min.

Produkti navedene pentaplex PCR reakcije analizirani su u genetičkom analizatoru ABI PRISM 3130 (Applied Biosystems, SAD) primenom programa *Gene Mapper Software version 3.7*. Prisustvo skraćenog fragmenta uz fragment normalne veličine tumači se kao mikrosatelitna nestabilnost. Skraćenje fragmenta u jednom alelu predstavlja mutaciju tog alela. Ukoliko postoji skraćenje u najmanje tri markera, radi se o mikrosatelitnoj nestabilnosti visokog stepena (MSI-H) tj. tumor ima MSI-H fenotip. Skraćenje u jednom ili dva markera predstavlja nizak stepen mikrosatelitne nestabilnosti (MSI-L). Skraćenje u jednom markeru takode može predstavljati polimorfizam određenog mikrosatelitnog markera, što se može potvrditi i Pentaplex reakcijom sa DNK iz krvi pacijenata koji imaju nestabilnost u jednom markeru. Kod pacijenta koji su imali nestabilnost u jednom markeru, urađena je dodatna Pentaplex reakcija iz germinativne DNK (iz krvi) u cilju razlikovanja polimorfizma (nestabilnost postoji i u DNK iz krvi) i MSI-L fenotipa tumora (nestabilnost postoji u tumoru, ali ne u germinativnoj DNK). Razlikovanje polimorfizma i nestabilnosti markera nema klinički značaj, već samo naučni, obzirom da se oba svrstavaju u mikrosatelitno stabilnih tumora. Ukoliko ne postoji skraćenje ni za jedan od pet mikrosatelitnih markera, tumor je mikrosatelitno stabilan

(MSS) tj. ima MSS fenotip. Tako su pacijenti su podeljeni na osnovu MSI statusa u dve grupe: MSI-H i MSS/L grupa.

Tabela 6. Pet mikrosatelitnih markera koji se koriste u Pentaplex PCR metodi za određivanje MSI statusa

Ime markera	Gen	Broj u banci gena	Dužina, lokalizacija ponovka	Fluorescentni marker	Sekvenca prajmera 5' ka 3'	Srednja dužina PCR produkta (bp)*
BAT26	hMSH2	U41210	26 (A) Intron 5	FAM	tgactacttttgacttcagcc aaccattcaacattttaacce ^a	120
BAT25	c-kit	L04143	25 (T) Intron 16	NED	tcgcctccaagaatgtaagt ^a tctgcattttaactatggctc	124
NR21	SLC7A8	XM_033393	21 (T) 5' UTR	HEX	taaagtgtgtctcccctgg attctactccgcattcaca ^a	103
NR22	Transmembrane precursor protein B5	L38961	22 (T) 3' UTR	FAM	gaggctgtcaaggacataa aattcggatgccatccagt ^a	142
NR24	Zinc finger 2 (ZNF-2)	X60152	24 (T) 3' UTR	HEX	ccattgctgaatttacctc atttgccattgcattccaa ^a	132

^a Obeležni kraj prajmera

bp- bazni par A-adenin; T-timin; *Surawera et al. 2004, Gastroenterology.

Analizirana je dužina fragmenata svih pet mononukleotidnih, mikrosatelitnih markera i upoređivana je sa dužinama ovih fragmenata iz drugih populacija. Za svaki marker je određivan kvazimonomorfni opseg (engl. QuasiMonomorphic Variation Range, QMVR) za mikrosatelitno stabilne slučajeve. To je opseg u kojima varira dužina određenog markera u MSS tumoru. Zato ovi markeri nisu monomorfni u 100% slučajeva, već kvazimonomorfni. Od posebnog je interesa dužina fragmenata u mikrosatelitno nestabilnim tumorima. U ovim tumorima je određena veličina delecije u svim markerima u odnosu na mikrosatelitno stabilne tumore.

3.5. Analiza kliničko-patohistoloških karakteristika kolorektalnih karcinoma u odnosu na MSI status

Pacijenti su u odnosu na mikrosatelitni status tumora podeljeni u dve grupe.

Prva grupa obuhvata pacijente sa MSI-H tumorima (MSI-H grupa). Druga grupu se sastoji od pacijenata sa MSS i MSI-L tumorima koji se zbog sličnih kliničko-patohistoloških osobina i biološkog ponašanja tumora uvek svrstavaju u jednu grupu (MSS/L grupa).

Između grupa su korelisani klinički (godine starosti, pol, lokalizacija tumora) i patohistološki parametri (limfocitna infiltracija, stepen mucinske produkcije, stepen diferentovanosti, TNM/Dukes stadijum). Ovi parametri su korelisani sa MSI statusom tumora univarijatnom logističkom regresijom. Multivarijatnim logističkim modelom za predikciju MSI statusa tumora ispitivani su oni klinički i patohistološki parametri koji su u univarijatnom modelu postigli p manje ili jednako 0,100.

Sagledana je ispunjenost revidiranih Bethesda kriterijuma u obe grupe pacijenata. Determinisana je specifičnost, senzitivnost, negativna i pozitivna prediktivna vrednost revidiranih Bethesda kriterijuma, MsPath skora, patohistološkog nalaza koji sugeriše MSI (engl. MSI-histology, u daljem tekstu MSI histologija), za predikciju MSI-H fenotipa kolorektalnih tumora. Kao što je već pomenuto, MSI histologija predstavlja skup patoloških karakteristika tumora koje su navedene u trećem revidiranom Bethesda kriterijumu. Prvi, drugi i treći revidirani Bethesda kriterijumi su analizirani posebno, dok su četvrti i peti bili zajedno vrednovani obzirom da se oba odnose na porodičnu anamnezu bolesnika.

3.6. Analiza metilacionog statusa promotora hMLH1 gena u MSI-H grupi

Testiranje mikrosatelitne nestabilnosti predstavlja skrining test za Lynch sindrom. U saglasnosti sa trećim ciljem disertacije, da se napravi selekcija pacijenata sa MSI-H CRC radi daljeg kliničkog praćenja samih pacijenata kao i članova porodice (mogući nasledni tip CRC – HNPCC). Kako bismo što preciznije odredili koji od pacijenata sa MSI-H tumorima može imati naslednu formu CRC, u ovim tumorima smo odredili metilacioni status hMLH1 gena. Ukoliko postoji metilacija hMLH1 gena, radi se o sporadičnom MSI-H tumoru. Ukoliko je metilacija hMLH1 gena odsutna, može se sa velikom verovatnoćom reći da se radi o Lynch sindromu.

Genetska analiza metilacionog statusa promotora hMLH1 gena urađena je samo u grupi MSI-H tumora, ne radi se u MSS/L grupi. Radi se o primeni PCR reakcije prilagođenoj za detekciju metilacionog statusa promotorskog regiona gena od interesa (hMLH1). Da bi ova reakcija mogla da bude primenjena neophodno je tretirati po 2 µg DNK izolovane iz tumorskog tkiva sa Epi Tect Bisulfite Kit (Qiagen, Germany) prema uputstvu proizvođača. Korišćena su dva seta prajmera za specifično dizajnirana za nemetilovani i metilovani promotor hMLH1 gena. Sekvence prajmera date su u Tabeli 7.

Princip određivanja metilacionog statusa promotorskog regiona hMLH1 gena je sledeći:

a) Bisulfitna konverzija DNK

- Po 2 µg DNK dobijene iz tumorskog tkiva se tretira, prema uputstvu proizvođača, kitom za bisulfitnu konverziju DNK. Tako tretirana DNK se koristi u PCR reakciji za detekciju metilacionog statusa promotorskog regiona hMLH1 gena.

Oko 100 ng modifikovane DNK se koristi za PCR amplifikaciju sa prajmerima specifično dizajniranim za detekciju metilacionog statusa promotorskog regiona hMLH1 gena (MSPCR od engl. methylation-specific PCR). Sekvence prajmera, temperature anilinga i očekivana veličina PCR produkata za hMLH1 je data u tabeli.

b) PCR reakcija

PCR amplifikacija je izvedena u volumenu od 25 µl uz korišćenje:

- 100 ng DNK izolovane iz tumorskog tkiva
- 1x Taq pufera (500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl pH 8.3, 15 mM Mg(OAc)₂)

- 0,2 $\mu\text{mol/L}$ svakog prajmera
- 200 $\mu\text{mol/L}$ dNTP mešavine (dATP, dGTP, dCTP, dTTP),
- 1,5mM MgCl_2
- 0,75 U (jedinica) Taq DNK polimeraze (Qiagen)
- Sterilnu redestilovanu vodu do volumena od 25 μl

PCR amplifikacija je izvedena pod sledećim uslovima:

- Inicijalna denaturacija na 95°C u trajanju od 10 min
- 35 ciklusa denaturacije na 94°C u trajanju od 15 s, aniling na 53°C u trajanju od 30 s i ekstenzije na 72°C u trajanju od 30 s,
- Finalna ekstenzija na 72°C u trajanju od 10 min.

c) Vizuelizacija i tumačenje rezultata:

-Vizuelizacija amplifikovanih PCR produkta se izvodi razdvajanjem dobijenih fragmenata elektroforezom na 2% agaroznom gelu. Kao pozitivna kontrole korišćena je DNK dobijena iz tumorskog tkiva pacijenta kod koga je prisustvo metilacije u promotorskom regionu hMLH1 gena potvrđeno u francuskoj laboratoriji, INSERM-u (Institut National pour la Santé et la Recherche Médicale). Kao negativna kontrola PCR reakcije korišćena je sterilisana redestilovana voda umesto DNK.

Tabela 7. Prajmeri za određivanje metilacionog statusa promotora hMLH1 gena, temperatura anilinga i veličina dobijenog produkta

hMLH1	Prajmer - Forward	Prajmer – reverzni	Temperatura anilinga	Veličina produkta
Nemetilovani	5'AGAGTGGATAGTGATTTT TAATGT-3'	5'ACTCTATAAATTA CTAAATCTCTTC3'	53	100
Metilovani	5'GATAGCGATTTTAAACG C3'	5'TCTATAAATTACT AAATCTCTTCG3'	53	93

3.7. Studija preživljavanja

Pacijenti su praćeni od momenta operacije do Septembra 2012. godine ili do pojave lokalnih recidiva, udaljenih metastaza, ili smrtnog ishoda. Pojava lokalnog recidiva i/ili metastatske bolesti ustanovljena je pomoću: biohemijskih analiza (tumorski marker-CEA), kolonoskopijom, kompjuterizovanom tomografijom abdomena i male karlice. Informacija o smrtnom ishodu pacijenta dobijena je anketiranjem članova porodice.

U studiji preživljavanja bolesnika, glavni ciljevi su bili definisanje celokupnog preživljavanja (engl. overall survival, u daljem tekstu OS), preživljavanja specifičnog za bolest (engl. disease-specific survival, u daljem tekstu DSS), perioda preživljavanja bolesnika bez znakova recidiva (engl. disease-free survival, u daljem tekstu DFS). OS je definisano periodom od ulaska u studiju do smrtnog ishoda usled bilo kog razloga. DSS predstavlja period od ulaska u studiju tj. momenta operacije do eventualnog smrtnog ishoda usled kolorektalnog karcinoma. DFS se odnosi na period od ulaska u studiju do eventualne pojave recidiva bolesti. Recidiv bolesti podrazumeva pojavu lokalnog recidiva ali i udaljenih depozita (metastatska bolest).

Konstruisane su Kaplan-Meier krive za OS, DSS i DFS, log rank testom je ispitivan značaj mikrosatelitnog statusa za preživljavanje bolesnika. Univarijantnim Cox regresionim modelom je ispitivan značaj kliničkih parametara (pol, starost, lokalizacija tumora), patohistoloških parametara (diferentovanost, stepen mucinske produkcije, prisustvo TILs, AJCC stadijuma) i mikrosatelitnog statusa tumora za preživljavanje bolesnika (DFS i DSS). Ovom analizom izvršena je selekcija parametara čiji će se značaj oceniti u multivarijantnoj Cox hazard regresionoj analizi. U multivarijantnoj Cox regresionoj analizi procenjivani su oni parametri za koje je p u univarijantnoj analizi bilo manje ili jednako 0,100.

3.8. Statistička analiza

Sve statističke analize su rađene u programu SPSS (Statistical Package for Social Sciences Inc. Chicago, Illinois, SAD), verzija 15.0. Za poređenje između grupa korišćen je χ -kvadrat test, Fisherov test i t-test gde je bilo odgovarajuće. Vrednost p manje od 0,05 je smatrana za statistički značajnu razliku. Senzitivnost, specifičnost, pozitivna i negativna prediktivna vrednost su izračunavane korišćenjem standardnih definicija i statističkih formula.

Sve logističke korelacije između mikrosatelitne nestabilnosti i kliničko-patohistoloških karakteristika su prvo rađene univarijantnom analizom. Potom su svi parametri zajedno korišćeni za konstruisanje modela multivarijantne logističke regresije, da bi se izdvojili parametri koji sa najvećom značajnošću utiču na predikciju mikrosatelitne nestabilnosti u tkivu tumora. Logističkim regresionim modelima je ispitivan značaj pojedinih kliničkih i patohistoloških parametara za predikciju mikrosatelitne nestabilnosti u tkivu tumora.

Kaplan-Meier krive su konstruisane, a log-rank testom je ispitivana značajnost mikrosatelitne nestabilnosti za preživljavanje i prognozu bolesnika. Univarijantnim i multivarijantnim Cox hazard regresionim modelima su ispitivani značaj mikrosatelitne nestabilnosti i pojedinih kliničkih, patohistoloških parametara za preživljavanje i pojavu recidiva bolesti.

4. REZULTATI

4.1. Kliničke i patohistološke karakteristike pacijenata i mikrosatelitni status tumora

4.1.1. Starosna i polna distribucija

U ispitivanju je učestvovalo 150 pacijenata (90 muškaraca i 60 žena), starosti od 35 do 75 godina, medijana 62 godine, koji su operisani zbog karcinoma kolona i rektuma. Grupa muškaraca i grupa žena bili su slične starosne strukture. Srednja vrednost godina starosti za pacijente muškog pola bila je $61,5 \pm 10$ godina (medijana 64 godina) odnosno 60 ± 10 godina (medijana 61,5 godina) za ženski pol (Tabela 8, 9, Slika 3).

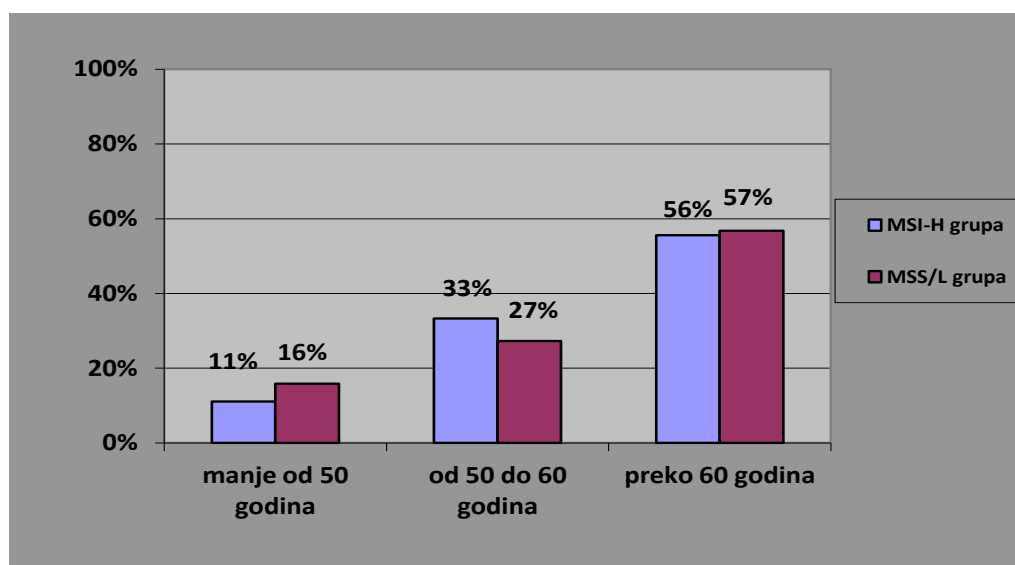
Pacijenti su podeljeni u dve grupe na osnovu mikrosatelitnog statusa tumora: grupa pacijenata sa tumorima koji imaju visok stepen mikrosatelitne nestabilnosti (u daljem tekstu će biti konzistentno označeni kao MSI-H grupa) i grupa pacijenata sa tumorima koje karakteriše nizak stepen mikrosatelitne nestabilnosti ili mikrosatelitno stabilni (u daljem tekstu će biti konzistentno označeni kao MSS/L grupa).

Tabela 8. Prosečna starosna dob ispitivanih pacijenata

	N	X	SD	Mediana	Minimum	Maximum
MSI-H grupa	18	61,1	9	63,5	41	72
MSS/L grupa	132	60,7	10	62	35	75
Ukupno	150	60,8	10	62	35	75

U MSI-H grupi bilo je 18 pacijenata, dok je u MSS/L grupi bilo 132 pacijenta. U MSI-H grupi bilo je 14 muškaraca i 4 žene. U MSS/L grupi je bilo 76 muškaraca i 56 žena. U MSI-H grupi medijana starosti pacijenata je bila 63,5, najmlađi pacijent je imao 41, dok je najstariji imao 72 godine. U MSS/L grupi medijana starosti pacijenata je bila 62 godine, najmlađi pacijent je imao 35, dok je najstariji imao 75 godina. Nije bilo statistički značajne razlike u starosnoj i polnoj raspodeli između MSI-H i MSS/L grupe pacijenata. Dat je

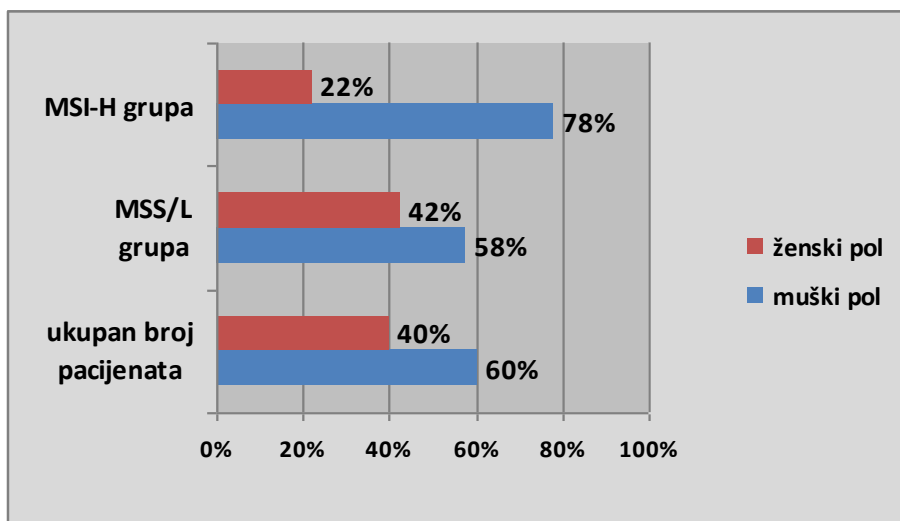
tabelarni i grafički prikaz starosne strukture pacijenata u MSI-H i MSS/L grupi po starosnim kategorijama: ispod 50 godina, od 50 do 60 godina, preko 60 godina starosti (Tabela 9, Slika 3). Ne postoji statistički značajna razlika u starosti između pacijenata posmatranih grupa ($t=0,210$, $p=0,523$). U obe grupe pacijenata bilo je više muškaraca nego žena, razlika je evidentnija u MSI-H grupi (slika 4), ali statistički značajna razlika nije dostignuta ($\chi^2=2,7$, $df=1$, $p=0,080$).



Slika 3. Starosna distribucija pacijenata po grupama (grafički prikaz)

Tabela 9. Starosna distribucija pacijenata po grupama

	Manje od 50 godina	Od 50 do 60 godina	Preko 60 godina
MSI-H grupa	2 (11%)	6 (33%)	10 (56%)
MSS/L grupa	21 (16%)	36 (27%)	75 (57%)
Ukupan broj pacijenata	23 (15%)	42 (28%)	85 (57%)



Slika 4. Polna distribucija po grupama

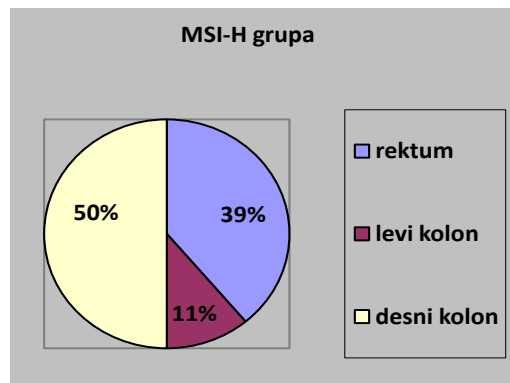
4.1.2. Lokalizacija primarnog procesa

Od 150 pacijenata, 72 je imalo karcinom rektuma, 49 je imalo karcinom levog kolona dok je karcinom desnog kolona imalo 29 bolesnika.

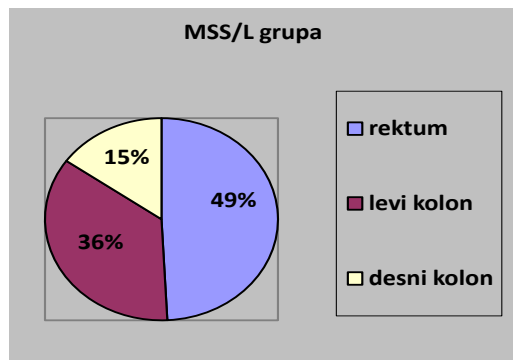
U MSI-H grupi pacijenata raspodela po lokalizaciji primarnog procesa je bila sledeća: 9 pacijenata je imalo karcinom desnog kolona, 2 levog kolona, dok je 7 bolesnika imalo karcinom rektuma.

U MSS-L grupi 65 pacijenata je imalo karcinom rektuma, 47 pacijenata je imalo karcinom levog kolona, dok je 20 bolesnika imalo primarni neoplastični proces lokalizovan u desnom kolonu. Procentualni prikaz distribucije grupa MSI-H i MSS/L po lokalizaciji primarnog procesa dat je na Slici 5.

Postoji visoko statistički značajna razlika utvrđena χ^2 testom između lokalizacije primarnog tumora između grupa. U MSI-H grupi, najveći broj bolesnika je imalo karcinom desnog kolona ($\chi^2=13,21$, $df=2$, $p=0,001$).



a)



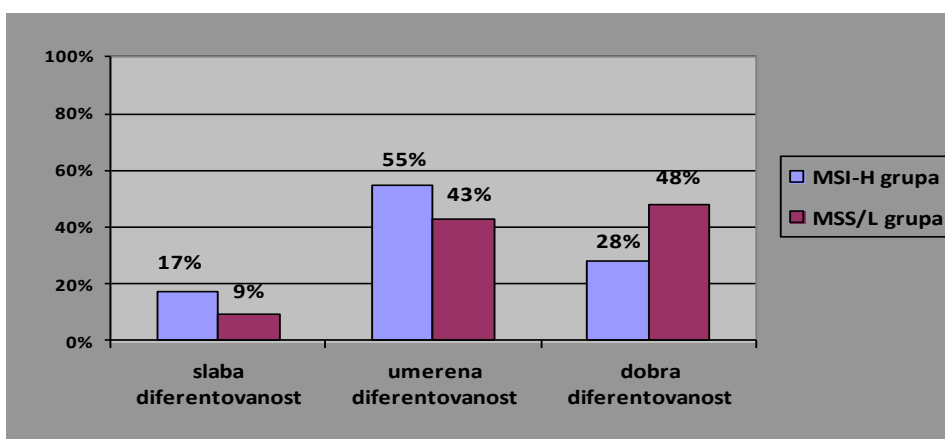
b)

Slika 5. Lokalizacija primarnog neoplastičnog procesa u a) MSI-H grupi i b) MSS/L grupi

4.1.3. Patohistološke karakteristike tumora

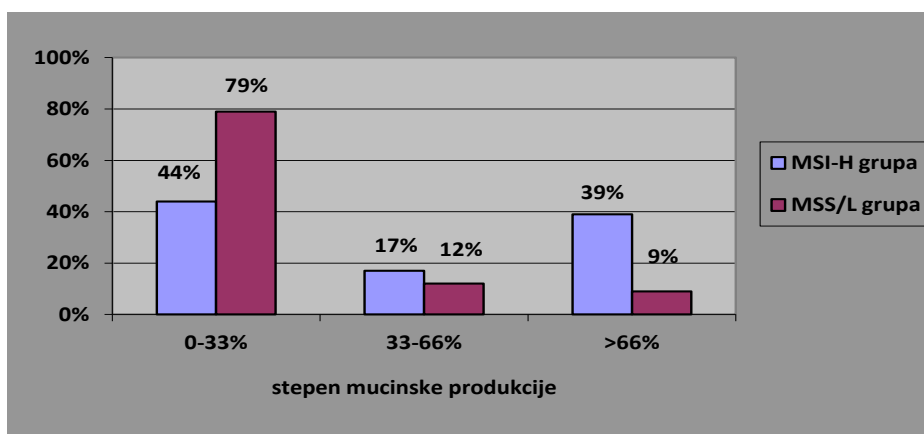
Svih 150 uzoraka tumora analizirano je nezavisno od strane patologa, bez prethodnog znanja o MSI statusu tumora. Od patohistoloških karakteristika analizirana je diferentovanost tumora, procenat mucinske produkcije i prisustvo tumor-infiltrirajućih limfocita. Utvrđen je i patohistološki stadijum tumora (Dukes/TNM stadijum) na osnovu kojih su pacijenti svrstani u četiri stadijuma.

U celokupnom uzorku najveći broj tumora je bio dobro i umereno diferentovan (68 odnosno 67 tumora), manji broj tumora (svega 15) je bio slabog stepena diferentovanosti. Dobro diferentovanih tumora je bilo više u MSS/L grupi u odnosu na MSI-H grupu (48% versus 28%). Ukupan broj pacijenata sa dobro diferentovanim tumorima u MSI-H grupi je 5, dok je u MSS/L grupi ovaj broj iznosio 63. Distribucija umereno diferentovanih tumora je bila sledeća: u MSI-H grupi 10 pacijenata (55%) versus MSS/L grupa sa 57 pacijenata (43%). Procentualno je veći broj slabo diferentovanih tumora bio u MSI-H grupi (17%), u odnosu na MSS/L grupu gde je broj pacijenata sa ovim tipom tumora bio manji (9%) (Slika 6). Ovakva raspodela diferentovanosti tumora u MSI-H i MSS/L grupi nije bila od statističkog značaja ($\chi^2=2,90$; $DF=2$; $p=0,234$).



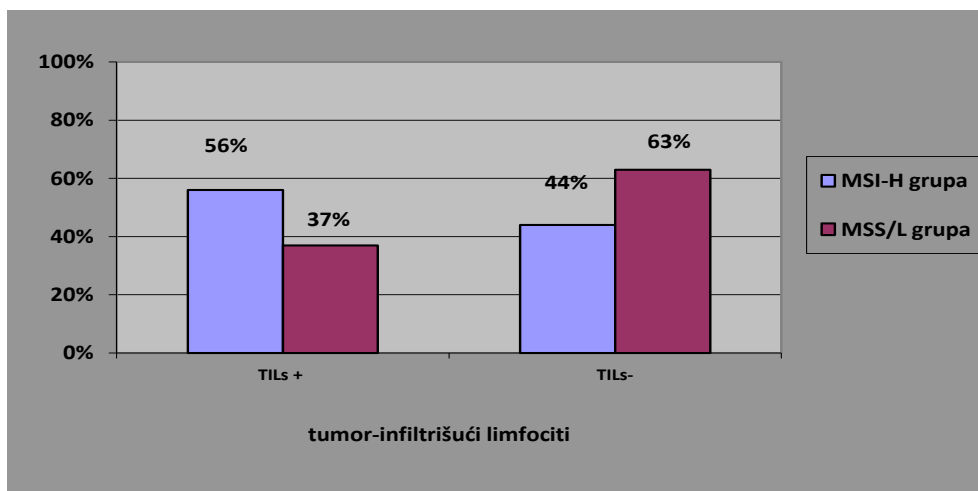
Slika 6. Diferentovanost u odnosu na mikrosatelitni status tumora

Najveći broj tumora je imao nizak stepen mucinske produkcije (113 pacijenata, 75%) dok je umeren i visok stepen mucinske produkcije imalo 18 (12%) odnosno 19 (13%) pacijenata. U MSI-H grupi 39% pacijenata je imalo visok (preko 66% na preparatu tumorskog tkiva), dok je 44% pacijenata u ovoj grupi imalo nizak stepen (ispod 33% na preparatu) mucinske produkcije. U MSS/L grupi broj pacijenata sa visokim stepenom mucinske produkcije je bio značajno manji i iznosio je 9% (12 od 132 pacijenata) (Slika 7). Između grupa postoji visoko statistički značajna razlika kada je upoređivan stepen mucinske produkcije u tumoru ($\chi^2=14,11$, $DF=3$, $p=0,003$).



Slika 7. Stepen mucinske produkcije u odnosu na mikrosatelitni status tumora

Tumor-infiltrirajući limfociti (TILs) nisu uočeni na preparatima u 91 tumoru, dok su preostalih 59 tumora imali TILs. U MSI-H grupi TILs su bili prisutni u 10 tumora (56%), dok je broj MSI-H tumora bez TILs na preparatima bio 8 (44%). U MSS/L grupi veći broj pacijenata nije imao TILs u tumorima (83 pacijenata, 63%), dok su tumori preostalih pacijenata imali TILs kao patohistološku odliku (49 pacijenata, 37%) (Slika 8). Nije bilo statistički značajne razlike između grupa po ovom ispitivanom patohistološkom parametru ($\chi^2=2,256$, $df=1$; $p=0,108$).



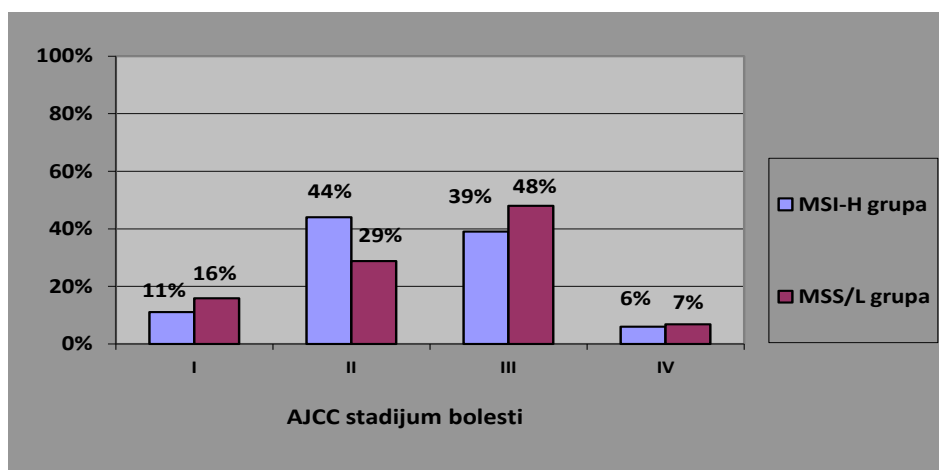
Slika 8. Prisustvo tumor-infiltrirajućih limfocita u odnosu na mikrosatelitni status tumora

Najveći broj pacijenata (70) u celokupnom uzorku je u momentu operacije bio u III stadijumu po AJCC klasifikaciji, odnosno Dukes C stadijumu. IV stadijum (metastatsku bolest u momentu operacije) je imalo 10 bolesnika. I stadijum je patohistološki određen kod 23 bolesnika, dok su 47 pacijenata imali tumor u II stadijumu bolesti.

U MSI-H grupi pacijenata 1 pacijent je imao znake metastatske bolesti (IVa stadijum po AJCC/ Dukes D), dok je najveći broj pacijenata u ovoj grupi bio u II i III stadijumu bolesti, 8 (44%) odnosno 7 (39%) bolesnika. I stadijum bolesti u MSI-H grupi imalo je dva pacijenta (11%) (Slika 9). U MSS/L grupi slična raspodela po stadijumima (Slika 9), nije bilo statistički značajne razlike po stadijumima bolesti u ispitivanim grupama ($\chi^2=3,33$, $DF=3$, $p=0.344$).

Tabela 10. Histološki parametri i mikrosatelitni status tumora

	Svi pacijenti	MSS/L	MSI-H	P vrednost
Diferentovanost				
Slaba	15 (10%)	12 (9%)	3(16%)	P=0,234
Umerena	66 (44%)	56 (43%)	10 (56%)	
Dobra	68 (46%)	63 (48%)	5 (28%)	
Stepen mucinske produkcije				
0-33%	113 (75%)	104 (79%)	8 (44%)	P=0,003
33-66%	18 (12%)	15 (12%)	3 (17%)	
>66%	19 (13%)	12 (9%)	7 (39%)	
TILs				
Prisutni	59(39%)	49(37%)	10 (56%)	P=0,108
Odsutni	91 (61%)	83 (63%)	8 (44%)	
AJCC				
I stadijum	23(15%)	21 (16%)	2 (11%)	P=0,645
II stadijum	47 (31%)	39 (29%)	8 (44%)	
III stadijum	70 (47%)	63 (48%)	7 (39%)	
IV stadijum	10 (7%)	9 (7%)	1 (6%)	



Slika 9. AJCC stadijum bolesti u odnosu na mikrosatelitni status tumora

4.1.4. Revidirani Bethesda kriterijumi

45 pacijenata (30%) od celokupne grupe od 150 pacijenata je ispunjavalo bar jedan od revidiranih Bethesda kriterijuma (u daljem tekstu RBK), dok preostalih 105 pacijenata (70%) nije ispunjavalo nijedan od navedenih kriterijuma. Prikaz svih bolesnika koji ispunjavaju RBK dat je u Tabeli 11. U MSI-H grupi 15 pacijenata je ispunilo bar jedan RBK, dok je u MSS/L grupi bar jedan RBK ispunilo 30 pacijenata. Senzitivnost i specifičnost RBK za MSI-H tumore iznosi 83,3 % odnosno 77,2 %, dok pozitivna (PPV) i negativna (NPV) prediktivna vrednost iznose 30% odnosno 70%.

Prvi revidirani Bethesda kriterijum (u daljem tekstu B1) je ispunio 21 pacijent tj. 21 pacijent je imao manje od 50 godina prilikom postavljanja dijagnoze kolorektalnog karcinoma. U MSI-H grupi svega 2 (11%) pacijenta su bila mlađa od 50 godina, dok je u MSS/L grupi ovaj broj bio veći i iznosio je 19 (14%). Specifičnost odnosno senzitivnost B1 kriterijuma za detekciju MSI-H tumora iznosili su 85,6% odnosno 11 %, PPV 14%, NPV 86%.

Ukoliko je starosna granica u B1 kriterijumu pomerena na 45 godina (u daljem tekstu modifikovani B1), tada je specifičnost računata za modifikovani B1 veća i iznosi 91%, dok senzitivnost ostaje ista (11%). PPV i NPV za modifikovani B1 iznosile su 9,3% odnosno 90,7%. Specifičnost RBK sa modifikovanim B1 iznosi 83.3%, dok je senzitivnost ista kao prethodna (83,3%), PPV i NPV iznosile su 24,7% odnosno 75,3%.

Drugi revidirani Bethesda kriterijum (u daljem tekstu B2) vezan za pojavu sinhronih i metahronih karcinoma koji se javljaju u sklopu Lynch sindroma ispunilo je 5 pacijenata, od kojih je samo jedan pacijent bio u MSI-H grupi, dok je preostalih 4 bilo u MSS/L grupi bolesnika. Specifičnost B2 kriterijuma za detekciju MSI-H tumora iznosila je 97%. Senzitivnost je bila niska i iznosila je svega 5.5%, dok je negativna i pozitivna prediktivna vrednost za B2 bila 96.7% odnosno 3.3%.

Treći revidirani Bethesda kriterijum (u daljem tekstu B3) je ispunilo 18 pacijenata. U MSI-H grupi je 8 bolesnika ispunilo B3, dok je 10 pacijenta u MSS/L grupi ispunilo ovaj kriterijum. Specifičnost odnosno senzitivnost B3 kriterijuma za detekciju MSI-H tumora iznosili su 92.4% odnosno 44.4%, dok je negativna i pozitivna prediktivna vrednost za B3 bila 88% odnosno 12%. Statistički značajno veći broj bolesnika u MSI-H grupi pacijenata je ispunio B3 u odnosu na MSS/L grupu ($\chi^2=5,5$, $df=1$; $p=0,035$).

Četvrti i peti revidirani Bethesda kriterijum (u daljem tekstu B4, B5) će biti zajedno razmatrani zbog toga što se oba kriterijuma odnose na porodičnu anamnezu. B4 je ispunilo 7 bolesnika, s tim da je većina njih (šest) bila iz MSI-H grupe. Statistički značajno veći broj bolesnika u MSI-H grupi pacijenata je ispunio B4 u odnosu na MSS/L grupu (Fisher test =21,1, df=1; p=0,001). Peti revidirani Bethesda kriterijum je ispunilo tri pacijenta i sva tri su bila iz MSI-H grupe. Specifičnost odnosno senzitivnost B4 i B5 kriterijuma za detekciju MSI-H tumora iznosili su 99% odnosno 33%, dok su negativna i pozitivna prediktivna vrednost za ove kriterijume iznosile 95% odnosno 5%.

Tabela 11. Pacijenti koji ispunjavaju Revidirane Bethesda kriterijume i njihov MSI status

	B1(<50.)	B2	B3	B4	B5	B1+B3	B3+B4	B1+ B3+B5	Σ
Broj pacijenata	16	5	10	4	2	4	3	1	45
MSI-H grupa	0	1	4	4	2	1	2	1	15
MSS/MSI-L grupa	16	4	6	0	0	3	1	0	30

4.1.5. Prediktivna vrednost kliničkih i patohistoloških karakteristika za mikrosatelitni status tumora

U prethodnom poglavlju analizirana je specifičnost i senzitivnost revidiranih Bethesda kriterijuma za MSI. Od postojećih modela za predikciju MSI analiziran je MsPath model koji se primenjuje kod pacijenata mlađih od 60 godina. Za graničnu vrednost modela preporučena je vrednost 1. U ispitivanom uzorku bilo je 65 pacijenata mlađih od 60 godina. U MSI-H grupi 8 pacijenata su bili mlađi od 60 godina, dok je u grupi MSS/L bilo 58 pacijenata mlađih od 60 godina. Vrednost MsPath modela veću od 1 je u MSI-H grupi imalo je svih 8 pacijenata, dok je u MSS/L grupi ovu vrednost imalo 26 bolesnika. MsPath skor preko jedan su statistički značajnije imali bolesnici sa MSI-H tumorima u odnosu na MSS/L grupu pacijenata (Fisher test = 11,4, df = 1; p=0,040). Specifičnost MsPath modela za detekciju MSI-H tumora na ispitivanom uzorku iznosi 85%, dok je senzitivnost 86%. PPV i NPV iznose 82% odnosno 18%.

MSI-histologija (B3 bez starosne granice) je bila patohistološka karakteristika kod 32 pacijenata (13 u MSI-H grupi, 19 u MSS/L grupi). Specifičnost MSI-histologije za detekciju MSI-H tumora u celokupnom uzroku iznosi 90%, senzitivnost 72%, vrednosti PPV i NPV iznose 17% odnosno 83%.

Devet kliničkih i patohistoloških karakteristika je analizirano univarijantim i multivarijantnim logističkim modelom radi ocene njihovog značaja za predikciju MSI-H tumora. Ovim modelom obuhvaćeni su sledeći klinički parametri: pol, starost pacijenata (<60 i >60 godina), lokalizacija tumora, ispunjenje nekog od Bethesda kriterijuma. Od patohistoloških parametara modelom smo ispitali: patohistološki stadijum bolesti, stepen diferentovanosti, stepen mucinske produkcije, prisustvo tumor-infiltrirajućih limfocita, ispunjenost kriterijuma za MSI-histologiju.

Na osnovu univarijantne logističke regresione analize dolazi se do sledećih rezultata (Tabela 12):

- Pol nije statistički značajan prediktivni faktor za MSI u univarijantnoj logističkoj analizi (OR, 2,6; 95% CI, 0,8-8,3; $p = 0.111$).
- Starost bolesnika nije od prediktivnog značaja za mikrosatelitni status tumora (OR 1,7; 95% CI, 0,4-3,6; $p=0,344$).
- Lokalizacija tumora (tumori lokalizovani u desnom kolonu) je visoko statistički značajan prediktivni faktor za MSI-H tumore (OR 2,4; 95% CI, 1,4-4; $p=0,001$).
- Ispunjavanje bilo kog revidiranog Bethesda kriterijuma jeste visoko statistički značajan prediktivni faktor za predikciju MSI-H tumora (OR 7; 95% CI 2,5-19,9; $p=0,0001$).
- Stadijum bolesti je razmatran dvojako. Binarnom kategorizacijom stadijumi bolesti su analizirani kao viši stadijum bolesti (III i IV) i niži stadijum bolesti (I i II). Analiza je urađena i za svaki stadijum posebno. U oba slučaja nijedan stadijum bolesti nije značajan prediktivni faktor za MSI-H fenotip tumora (viši, III i IV, vs. niži, I i II stadijum: OR 1,1; 95% CI 0,3-1,7; $p=0,753$).
- Slaba diferentovanost tumora je karakteristika koja nije statistički značajan prediktivni faktor za MSI-H tumore (OR 1,9; 95% CI, 0,9-3,8; $p=0,100$).
- Visok stepen mucinske produkcije je visoko statistički značajan prediktivni faktor za MSI-H tumore (OR 2,8; 95% CI, 1,5-4,9; $p=0,001$).

- Prisustvo tumor-infiltrirajućih limfocita na prepratu tumora kolona i rektuma nije značajan prediktivni parametar za MSI-H tumore (OR 2,1; 95%CI, 0,8-5,7; p=0,139).
- Ispunjavanje kriterijuma za MSI histologiju jeste visoko značajan prediktivni faktor za MSI-H fenotip tumora (OR 5,9; 95%CI 2,1-16,9; p=0,001).

Table 12. Univarijantna logistička regresiona analiza kliničkih i patohistoloških parametara u predikciji MSI-H fenotipa karcinoma kolona i rektuma

Parametar	OR	Confidence Interval 95%	P
Muški pol	2,6	(0,8-8,3)	0,111
Starost <60 godina	1,7	(0,4-3,6)	0,344
Lokalizacija tumora (desni kolon)	2,4	(1,4-4,0)	0,001
Diferentovanost tumora (slaba)	1,9	(0,9-3,8)	0,100
Mucinska produkcija (visok stepen)	2,8	(1,5-4,9)	0,001
TILs>5/HPF	2,1	(0,8-5,7)	0,139
Niži stadijum tumora (AJCC stage; I and II)	1,1	(0,3-1,7)	0,753
Ispunjenje bar jednog RBK	7,0	(2,5-19,9)	0,0001
Ispunjenost kriterijuma za MSI-histologiju	5,9	(2,1-16,9)	0,001

U multivarijantnom logističkom regresionom modelu za predikciju MSI-H fenotipa tumora analizirani su oni klinički i patohistološki parametri za koje je statistička verovatnoća (p) bila manja ili jednaka 0,100 (Tabela 13). Lokalizacija tumora, ispunjavanje bar jednog RBK, ispunjavanje kriterijuma za MSI-histologiju, stepen diferentovanosti i stepen mucinske produkcije su analizirani multivarijantnim logističkim modelom. Multivarijantni logistički regresioni model je pokazao da i dalje postoji statistička značajnost za predikciju MSI-H fenotipa tumora za sledeće parametre:

- lokalizacija tumora u desnom kolonu (OR 2,1; 95% CI 1,1-4; p=0,020)
- prisutan bar jedan ispunjeni revidirani Bethesda kriterijum (OR 13,8; 95% CI 3,3-57,6; p=0,0001)

Patohistološki parametri, mucinska produkcija i stepen diferentovanosti, kao i ispunjenost kriterijuma za MSI-histologiju se u multivarijantnom logističkom regresionom

modelu nisu pokazali kao statistički značajni za predikciju MSI-H fenotipa tumora (Tabela 13).

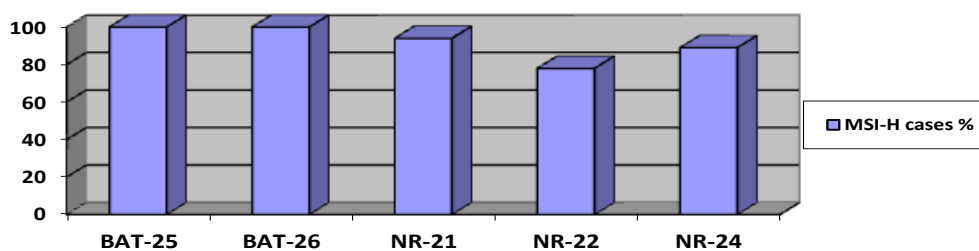
Tabela 13. Multivarijantna logistička regresiona analiza kliničkih i patohistoloških parametara u predikciji MSI-H fenotipa karcinoma kolona i rektuma

Parametar	OR	Confidence Interval 95%	P
Lokalizacija tumora (desni kolon)	2,1	(1,1-4,0)	0,020
Diferentovanost tumora (slaba)	1,9	(0,8-4,5)	0,163
Mucinska produkcija (visok stepen)	1,8	(0,8-4,1)	0,152
Ispunjenje bar jednog RBK	13,8	(3,3-57,6)	0,0001
Ispunjenost kriterijuma za MSI-histologiju	1,1	(0,2-4,4)	0,985

4.2. Analiza mikrosatelitne nestabilnosti i mikrosatelitni markeri

BAT-26 i BAT-25 su pokazivali nestabilnost u svim MSI-H tumorima (n=18), dok je NR-21 bio nestabilan u 17 MSI-H tumora (94%). NR-22 mononukletoidni marker je bio nestabilan tj. skraćen u 14 MSI-H tumora (78%), dok je NR-24 bio nestabilan u 16 MSI-H tumora (89%) (Slika 10). U 12 od 18 MSI-H tumora, svih pet mononukleotidnih markera su bili nestabilni (Slika 11a). Preostalih 6 MSI-H tumora imali su nestabilnost u najmanje tri markera i to 5 MSI-H tumora u 4 markera, i jedan MSI-H tumor u tri markera.

Srednja vrednost delecije nukleotida za BAT26 je bila 10 baznih parova (bp), dok je za BAT25 srednja vrednost delecije iznosila 7bp u MSI-H tumorima. Srednja vrednost delecije za ostala tri mononukleotidna markera je bila nešto manja i iznosila je za NR-21 i NR-24 6bp, dok je za NR-22 bila 5bp (Tabela 14).



Slika 10. Mikrosatelitni marker i njihova procentualna zastupljenost u MSI-H tumorima (N=18). BAT-25, 100%; BAT-26, 100%; NR-21, 94%; NR-22, 78%; i NR-24 89%.

BAT-26 je 100% senzitivnan i skoro 100% specifičan (99,2%) marker za detekciju MSI. BAT-25 je 100% senzitivnan, i ima nešto manju senzitivnost u odnosu na BAT-26 (98,4%). Senzitivnost NR-21 za detekciju MSI iznosi 94,4%, dok je specifičnost ovog markera 96,9%. Marker NR-22 i NR-24 imaju nešto smanjenu senzitivnost koje iznose 77,7% odnosno 88,9% za svaki marker pojedinačno. Specifičnost NR-21 za detekciju MSI je 100%, dok je NR-24 zadržao takođe visoku specifičnost od 96,7%. Pregled senzitivnosti, specifičnosti, srednje vrednosti delecije svih korišćenih mononukleotidnih, mikrosatelitnih markera data je u Tabeli 14.

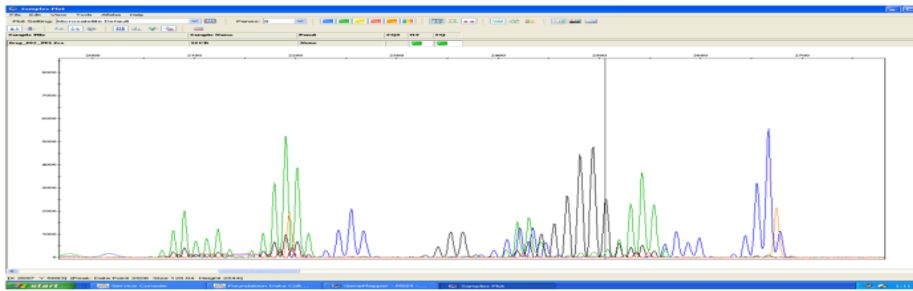
U slučaju MSI-L tumora (Slika 11b), nestabilnost je detektovana u samo jednom markeru. Ukupno je bilo 7 MSI-L tumora. U ovoj grupi NR-24 je bio nestabilan u 5 slučajeva (srednja vrednost delecije 123 bp). Jedan MSI-L tumor je imao nestabilnost za BAT-26 marker, dok je preostali imao nestabilnost za NR-21 marker.

Tabela 14. Srednja vrednost delecije fragmenata u svih pet mikrosatelitnih markera, njihova specifičnost i senzitivnost za detekciju mikrosatelitne nestabilnosti

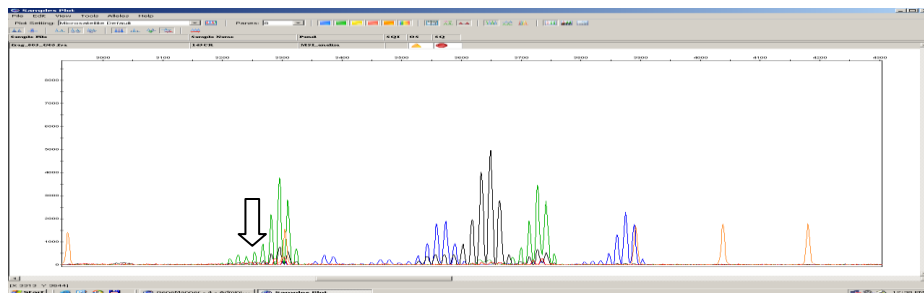
		BAT-26	BAT-25	NR-21	NR-22	NR-24
Uzorci tkiva kolorektalnog karcinoma	Srednja vrednost delecije fragmenata (bazni parovi)	10	7	6	5	6
	Senzitivnost markera za MSI	100%	100%	94,4%	77,7%	88,9%
	Confidence Interval 95%	78-100	78-100	70,6-99,7	51,9-92,6	63,9-98,1
	Specifičnost markera za MSI	99,2%	98,4%	96,9%	100%	95,4%
	Confidence Interval 95%	95,2-99,9	94,1-99,7	91,9-99	96,4-100	89,9-98,1

Skraćenje alela tj. delecije su klasifikovane u dve grupe: mutirani tj. skraćeni aleli, usled polimorfizma ili somatske mutacije (tabela, svetlo siva polja). Nemutirani, stabilni aleli imaju dužine fragmenata unutar “kvazi”monomorfnog opsega (engl. quasimonomorphic variation range, u daljem tekstu QMVR) (Table 15, tamno siva polja), gde postoji mala varijacija u dužini fragmenata između alela. NR-22, NR-24 i BAT-25 su bili stabilni unutar QMVR. Za ove markere QMVR iznosi od 137 do 139 bp, od 127 do 129 bp odnosno 123 do 125 bp. Za BAT-26, postoji bimodalna distribucija stabilnih i nestabilnih alela. U odnosu na ostale markere, NR-21 nema jasnu granicu između normalnih i skraćenih alela u ispitivanom uzorku (Tabela 15).

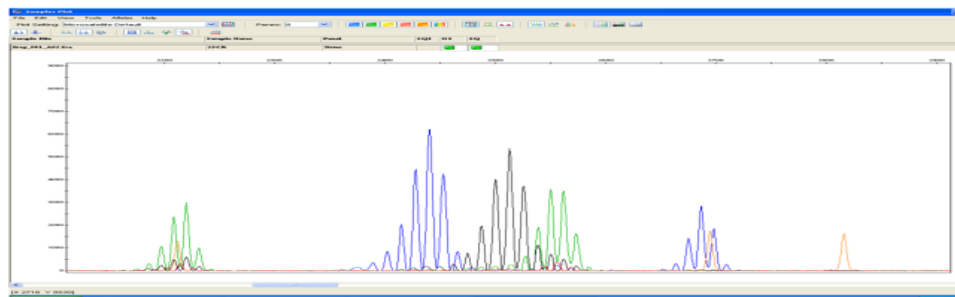
a)



b)



c)



Slika 11. Mikrosatelitna nestabilnost određena Pentaplex PCR metodom sa pet fluorescentno obeleženih prajmera (BAT-25, BAT-26, NR-21, NR-22, NR-24) kod naših bolesnika a) mikrosatelitno-nestabilan karcinom rektuma (MSI-H) b) mikrosatelitno-nestabilan karcinom – MSI-L c) mikrosatelitno-stabilan karcinom rektuma (MSS)

Tabela 15. Dužina alela za svih pet mononukleotidnih, mikrosatelitnih markera u 150 uzoraka kolorektalnog karcinoma

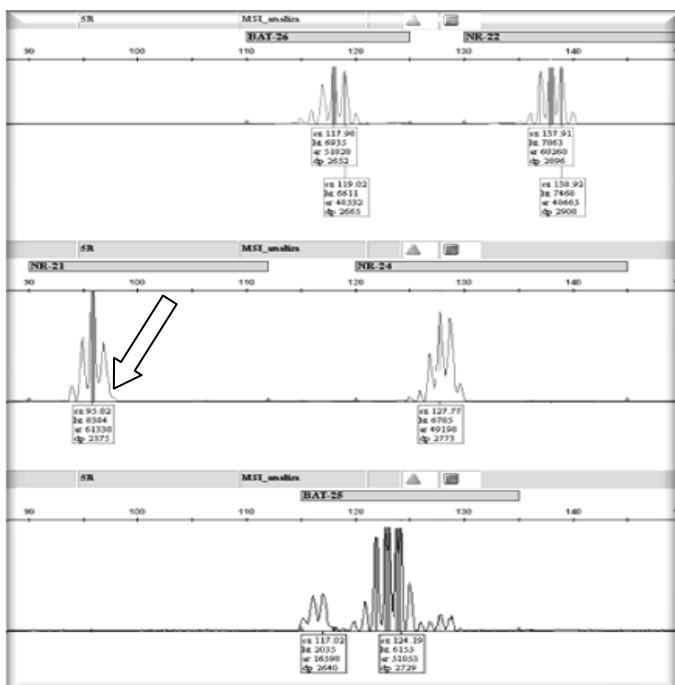
Dužina fragmenata za svih pet mikrosatelitnih mononukleotidnih markera u 150 uzoraka CRC														
BAT-25			BAT-26			NR-21			NR-22			NR-24		
Dužina (bp*)	No	%	Dužina (bp)	No	%	Dužina (bp)	No	%	Dužina (bp)	No	%	Dužina (bp)	No	%
108	-	-	103	1	0,7	88	-	-	129	-	-	117	-	-
109	-	-	104	-	-	89	-	-	130	-	-	118	-	-
110	-	-	105	6	4,2	90	-	-	131	3	2,1	119	1	0,7
111	2	1,4	106	-	-	91	2	1,4	132	2	1,4	120	-	-
112	-	-	107	2	1,4	92	3	2,1	133	1	0,7	121	2	1,4
113	3	2,1	108	-	-	93	3	2,1	134	6	4,2	122	9	6,3
114	1	0,7	109	2	1,4	94	4	2,8	135	2	1,4	123	7	4,9
115	2	1,4	110	1	0,7	95	2	1,4	136	-	-	124	2	1,4
116	5	3,5	111	1	0,7	96	3	2,1	137	3	2,1	125	1	0,7
117	3	2,1	112	1	0,7	97	2	1,4	138	123	86,1	126	-	-
118	3	2,1	113	2	1,4	98	2	1,4	139	10	7,0	127	14	9,8
119	1	0,7	114	-	-	99	7	4,9	140	-	-	128	105	73,5
120	-	-	115	2	1,4	100	36	24	141	-	-	129	9	6,3
121	-	-	116	8	5,6	101	85	59,5				130	-	-
122	-	-	117	21	14,7	102	-	-				131	-	-
123	93	65,1	118	97	63,6	103	-	-						
124	37	25,9	119	6	4,2	104	-	-						
125	-	-	120	-	-									
126	-	-	121	-	-									
127	-	-												

Objašnjenje: Tamno siva prebojenost polja u tabeli ukazuje na dužinu alela u "kvazi" monomorfni opsegu; svetlo siva prebojenost polja u tabeli ukazuje na mutirane tj. skraćene alele (usled somatske mutacije – MSI-H fenotip tumora ili polimorfizma) u uzorcima kolorektalnog karcinoma.

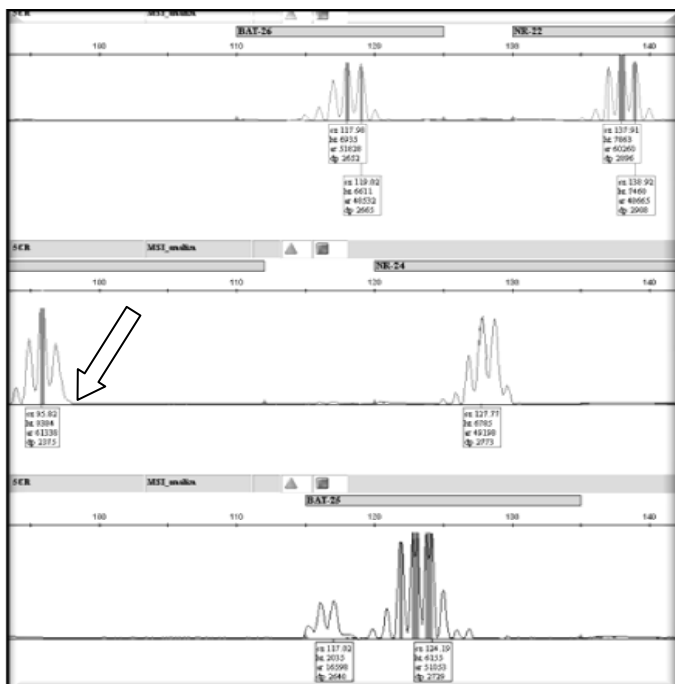
* (bp, bazni parovi)

4.2.1. Polimorfizmi u mikrosatelitnim markerima

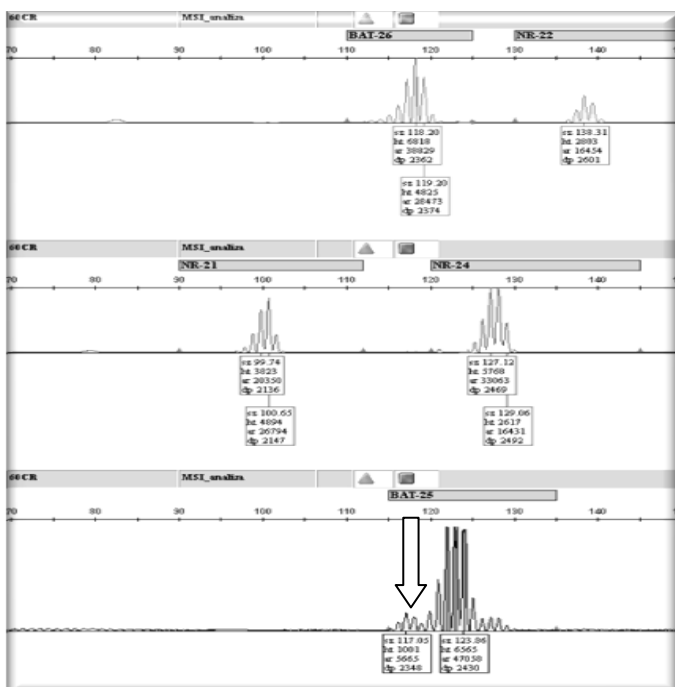
13 pacijenata je imalo nestabilnost u jednom mikrosatelitnom, mononukleotidnom markeru. Ovi pacijenti pripadaju MSS/L grupi i mogu biti MSI-L ili se nestabilnost markera javila u sklopu konstitucionalnog polimorfizma. U cilju potvrde polimorfizama mononukletidnih, mikrosatelitnih markera BAT25, BAT26, NR-21, NR-22 i NR-24, urađeno je dodatnih 13 MSI analiza korespodentnih DNK iz krvi pacijanata. 6 pacijenata su imali skraćenje jednog od pet mikrosatelitna markera i u korespodentnoj DNK iz krvi i oni predstavljaju grupu pacijenata sa MSS tumorom i polimorfizmom u jednom markeru. Preostalih 7 pacijenata nije imalo skraćenje ni u jednom markeru u korespodentnoj DNK iz krvi, te oni pripadaju grupi MSI-L tumora. Polimorfizam BAT-25 markera u jednom alelu nađen u dva pacijenta. Polimorfizam markera NR-21 u jednom alelu, detektovan je u 2 pacijenta, dok je jedan pacijent imao polimorfizam NR-21 u oba alela. Samo jedan pacijent je imao NR-24 polimorfizam. U ispitivanom uzorku, stopa polimorfizma je iznosila: 1.3 % (4/300 alela) za BAT-25; 1,7% (5 od 300) za NR-21; 0.5% (2 od 300) za NR-24. Nije nađen polimorfizam za markere BAT-26 i NR-22.



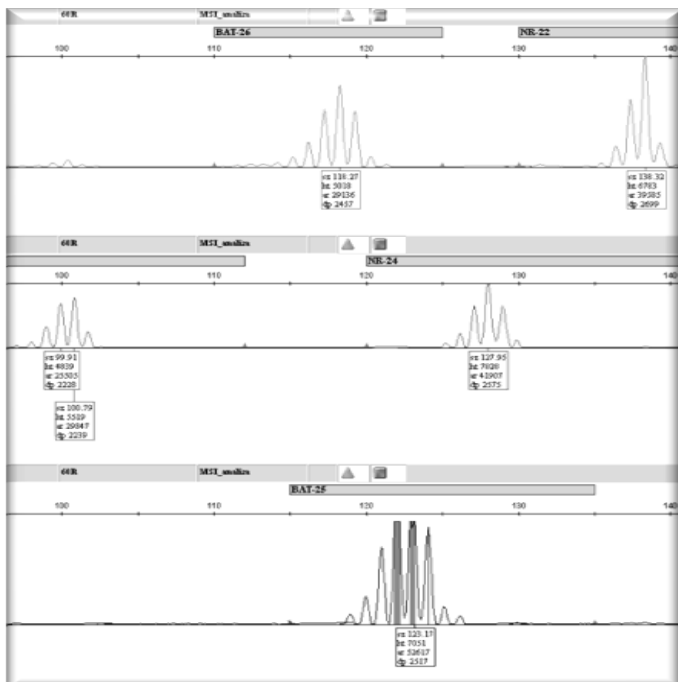
Slika 12.a) Pentaplex PCR profil: polimorfizam NR-21 markera (95 bp u oba alela) iz krvi bolesnika



Slika 12. b) Pentaplex PCR profil: polimorfizam markera u tumoru bolesnika (NR-21, skraćen u oba alela)



Slika 12.c) Pentaplex PCR profil: MSI-L tumor (nestabilnost BAT-26)

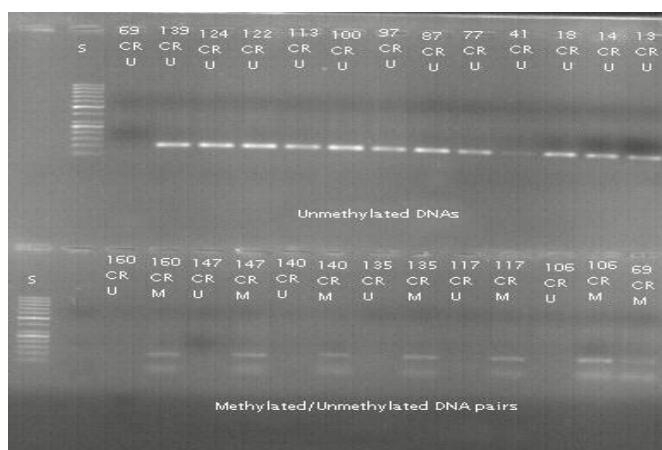


Slika 12.d) Pentaplex PCR profil: krv bolesnika sa MSI-L tumorom

4.3. Metilacioni status promotorskog regiona MLH-1 gena u MSI-H tumorima

U grupi od 18 pacijenata sa MSI-H tumorima, 8 je imalo metilovani promotorski region hMLH1 gena (u daljem tekstu metilovani hMLH1). Preostalih 10 tumora imalo nemetilovani promotorski region hMLH1 gena (u daljem tekstu nemetilovani hMLH1). Primer rezultata metilacije je dat na Slici 13 ispod. Slika 13 predstavlja vizuelizaciju fragmenata uz pomoć elektroforeze na agaroznom gelu kako je opisano u metodologiji disertacije.

Grupa sa metilovanim hMLH1 predstavlja grupu sporadičnih CRC sa MSI-H fenotipom (isključen Lynch sindrom). Pacijenti sa metilovanim hMLH1 su bili stariji od 50 godina, najmlađi pacijent je imao 57 godina, najstariji 72 godina. U ovoj grupi su svi pacijenti sa MSI-H tumorom koji su stariji od 70 godina. Lokalizacija ovih tumora je sledeća: 5 pacijenata sa CRC u desnom kolonu, jedan u levom kolonu, jedan karcinom rektuma, jedan pacijent sa sinhronim tumorom (rektum i desni kolon).



Slika 13. Rezultat ispitivanja metilacionog statusa promotorskog regiona MLH-1 gena – elektroforeza na agaroznom gelu.

Grupa sa MSI-H i nemetilovanim hMLH1 predstavlja grupu sa verovatnim Lynch sindromom. U ovoj grupi se nalazi 10 pacijenata, dva pacijenta su ispunjavala B1 tj. bili su mlađi od 50 godina (najviši stepen verovatnoće da se radi o Lynch sindromu). Ostali pacijenti su imali 68 godina (dva pacijenta), 66 godina (jedan pacijent), 64 godine (dva pacijenta), 57 godina (jedan pacijent), 56 godina (jedan pacijent), 52 godine (jedan pacijent). Srednja vrednost godina starosti u ovoj grupi je bila $58 \pm 9,8$ godina, najmlađi

bolesnik je imao 41 godinu, najstariji je imao 68 godina. U ovoj grupi MSI-H tumora sa nemetilovanim hMLH1, raspodela lokalizacija je bila sledeća: rektum - 6; levi kolon - 0; desni kolon - 4. Između grupa sa metilovanim hMLH1 i nemetilovanim hMLH1 korelisani su sledeći klinički i patohistološki parametri: godine starosti, lokalizacija tumora, ispunjenost nekog od RBK, AJCC stadijum bolesti i ispunjenost kriterijuma za MSI histologiju. Pacijenti sa nemetilovanim promotorskim regionom hMLH1 gena bili su mlađi i razlika u odnosu na grupu MSI-H sa metilovanim hMLH1 je bila blizu statističke značajnosti ($t=1,802$; $p=0,091$). Pacijenti sa metilovanim hMLH1 imali su češće CRC u desnom kolonu, za razliku od pacijenata sa nemetilovanim hMLH1 koji su češće imali karcinom rektuma, razlika je takođe blizu statističke značajnosti ($\chi^2=5,529$; $DF=2$; $p=0,063$). U drugim korelisanom parametrima statistička verovatnoća nije bila ni blizu statističke značajnosti (Tabela 16).

Tabela 16. Kliničko-patohistološke karakteristike grupa pacijenata sa MSI-H tumorima u odnosu na metilacioni status promotorskog regiona hMLH1 gena

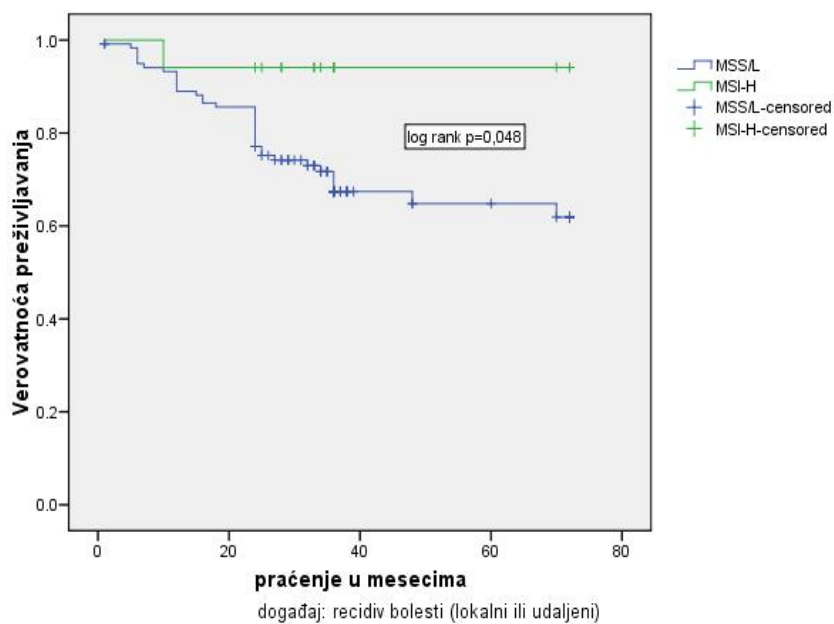
Parametar	Grupa sa metilovanim hMLH1	Grupa sa nemetilovanim hMLH1	P vrednost
Godine starosti (X)	64,9±6,3	58±9,8	P=0,091 *
Lokalizacija tumora			
Rektum	1	6	P=0,063**
Levi kolon	2	0	
Desni kolon	5	4	
Ispunjenost nekog od RBK	5	10	P=0,069**
AJCC stadijum bolesti			
I i II stadijum	5	5	P=0,480 **
III i IV stadijum	3	5	
Ispunjenost kriterijuma za MSI histologiju	4	5	P=0,681**

* t-test ** Fisher-ov test

4.4. Studija preživljavanja

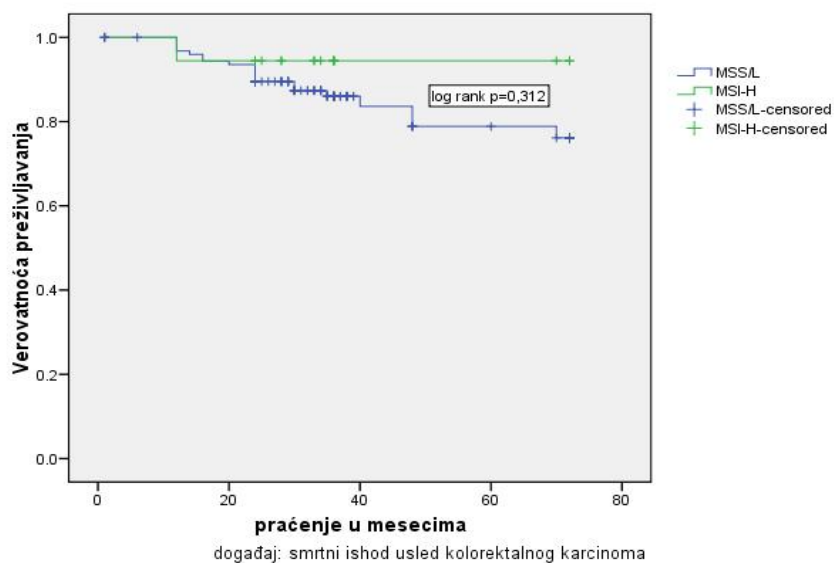
Podaci o preživljavanju bili su dostupni za 146 pacijenata, i to za sve pacijente iz MSI-H grupe (n=18) i 128 pacijenata iz MSS/L grupe. Iz studije je isključeno 4 pacijenata o kojima nije bilo dostupnih podataka.

Pacijenti su bili praćeni u smislu pojave recidiva (bilo lokalnog ili udaljenog) i smrtnog ishoda usled kolorektalnog karcinoma ili drugog razloga. U studiji praćenja i definisanja perioda bez recidiva (DFS) su uključeni pacijenti u I, II i III stadijumu. Pacijenti koji su operisani i pri tom su imali znake sekundarnih depozita u udaljenim organima nisu uzeti u razmatranje za DFS. U MSI-H grupi je jedan pacijent imao metastatsku bolest, ostali su imali I, II ili III stadijum bolesti (17 pacijenata). Od ovih 17 pacijenata jedan je imao recidiv bolesti. U MSS/L grupi je 9 bolesnika imalo IV stadijum bolesti i oni su isključeni iz procene DFS u odnosu na MSI status tumora. Od 123 pacijenata sa I, II, III stadijumom u MSS/L grupi, za 3 nije bilo dostupnih podataka, te je procenjen DFS 120 pacijenata sa MSS/L fenotipom. U MSS/L grupi je 37 pacijenata u I, II i III stadijumu bolesti imalo recidiv bolesti. Srednje vreme do pojave recidiva bolesti u MSI-H grupi je bilo znatno duže i iznosilo je 68,4 meseci (61,4-75,3), dok je u MSS/L grupi bilo 54,5 meseci (49,7 -59,2). Postoji značajna statistička razlika u DFS (period bez znakova recidiva bolesti; engl. disease free survival) između MSI-H i MSS/L grupa (Kaplan Meir test; $p=0,048$, log rank) (Slika 14).

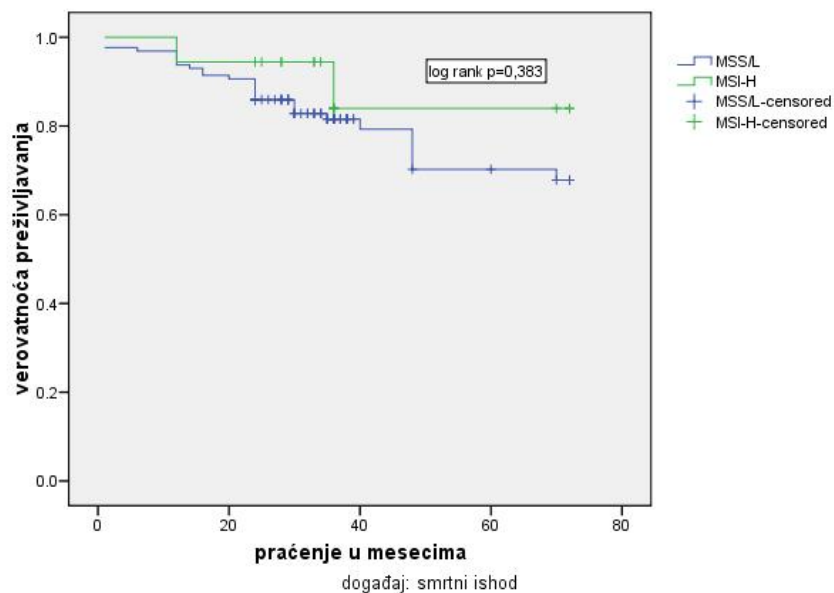


Slika 14. Praćenje pojave recidiva bolesti kod bolesnika sa MSI-H i MSS/L fenotipom tumora tokom ispitivanog perioda (preživljavanje bez znakova recidiva bolesti; engl. DFS – Disease Free Survival)

U MSI-H grupi su bila dva smrtna ishoda (jedan usled pogoršanja bolesti, drugi usled kardiovaskularnog događaja). Srednje vreme preživljavanja u MSI-H grupi je bilo 68 meseci (60,1-75,1). U celokupnom uzorku bilo je 30 smrtnih ishoda (20%), 21 usled kolorektalnog karcinoma. U MSS/L grupi bilo je 28 smrtnih ishoda, ali je 20 smrtnih ishoda bilo usled CRC. Srednje vreme preživljavanja u MSS/L grupi je bilo 62,9 meseca (59,2-66,7). Nije bilo statistički značajne razlike u preživljavanju vezano za bolest (engl. DSS – disease specific survival), na osnovu Kaplan-Meir testa ($p=0,312$, log rank test) (Slika 15). Što se tiče celokupnog preživljavanja (engl. OS – overall survival), takođe nije bilo statistički značajne razlike u preživljavanju između MSI-H i MSS/L grupe pacijenata (log rank, $p=0,383$) (Slika 16).



Slika 15. Preživljavanje bolesnika sa MSI-H i MSS/L fenotipom tumora tokom ispitivanog perioda (preživljavanje specifično za bolest; engl. DSS – Disease Specific Survival)



Slika 16. Preživljavanje bolesnika sa MSI-H i MSS/L fenotipom tumora tokom ispitivanog perioda (celokupno preživljavanje; engl. OS – Overall Survival)

Sedam kliničkih i patohistoloških karakteristika i mikrosatelitni status tumora su analizirani univarijantnom i multivarijantnom Cox regresionom analizom radi ocene njihovog značaja za preživljavanje i pojavu recidiva kolorektalnog karcinoma. Rizik za pojavu recidiva kolorektalnog karcinoma (DFS) procenjen je u grupi pacijenata sa I, II, III stadijumom. Ocena ovih parametara u bolest-specifičnom (DSS) i celokupnom preživljavanju (OS) je ocenjena u svim stadijumima bolesti. Ovim modelom obuhvaćeni su sledeći klinički parametri: pol, starost pacijenata (<60 i >60 godina), lokalizacija tumora (proksimalna versus distalna lokalizacija versus rektum). Od patohistoloških parametara modelom bili su ispitivani sledeći parametri: patohistološki stadijum bolesti (I i II versus II i III stadijum), stepen diferentovanosti (slaba diferentovanost versus srednja i dobra diferentovanost), stepen mucinske produkcije (nizak, manje od 33%, versus viši stepen mucinske produkcije, više od 33%), prisustvo tumor-infiltrirajućih limfocita.

Na osnovu univarijantne Cox regresione analize dolazi se do sledećih rezultata vezanih za značaj ispitivanih parametara za pojavu recidiva bolesti (engl. DFS) (Tabela 17):

- Pol, starost pacijenata, lokalizacija primarnog procesa, prisustvo TILs u tumorskom tkivu nisu statistički značajni prediktivni faktori za pojavu recidiva kod ispitivanih pacijenata (Tabela 17)
- Ostali ispitivani parametri imali su statističku p vrednost manju od 0,100 u univarijantnoj Cox regresionom modelu i oni su analizirani i multivarijantnom Cox regresionom analizom.
- MSI status nije statistički značajan faktor za pojavu recidiva u univarijantnom modelu (HR 5,7; 95%CI, 0,9-15,2; p=0,086), ali je rezultat u multivarijantnom Cox regresionom modelu na samoj granici statističke značajnosti (HR 4,7; 95%CI, 1,1-19,2; p=0,058).
- AJCC stadijum bolesti je visoko najznačajniji parametar za pojavu recidiva, šta označava češću pojavu recidiva u višem stadijumu bolesti. Visoka statistička značajnost AJCC stadijuma bolesti za pojavu recidiva (DFS) je dobijena i univarijantnom (HR 2,6; 95%CI, 1,3-5,2; p=0,009) i multivarijantnom analizom (HR 2,3; 95%CI, 1,1-4,7; p=0,02).
- Pacijenti sa slabije diferentovanim tumorima imali su češću pojavu recidiva. Diferentovanost tumora predstavlja statistički značajan prediktivni faktor za pojavu

recidiva u univarijatnoj (HR2,5;95%CI,1,2-5,3;p=0,048) i multivarijatnoj Cox regresionoj analizi (HR 2,6; 95%CI,0,8-8,8; p=0,041).

- Mucinska produkcija u tumoru nije od statističkog značaja za pojavu recidiva bolesti, u univarijatnoj i multivarijatnoj Cox regresionoj analizi (Tabela 17).

Tabela 17. Univarijantni i multivarijantni Cox regresioni model u predikciji pojave udaljenog ili lokalnog recidiva kolorektalnog karcinoma

Parametar	Univarijantna			Multivarijantna		
	HR	95%CI	P	HR	95%CI	p
Godine starosti (< 60 g. vs. > 60 g.)	1,2	0,6-2,2	0,678	-	-	-
Pol (muški vs. ženski)	1,1	0,5-2,1	0,828	-	-	-
Lokalizacija tumora (proksimalni vs. distalni)	1,8	0,7-4,7	0,206	-	-	-
TILs (prisutni vs. odsutni)	1,5	0,8-2,9	0,237	-	-	-
Stepen mucinske produkcije (nizak vs. visok)	3,4	0,8-14,4	0,089	2,3	0,5-10,0	0,095
Diferentovanost tumora (slaba vs srednja i dobra)	2,5	1,2-5,3	0,048	2,6	0,8-8,8	0,041
AJCC stadijum (I i II vs. III i IV)	2,6	1,3-5,2	0,009	2,3	1,1-4,7	0,020
MSS/L vs. MSI-H	5,7	0,9-15,2	0,086	4,7	1,1-19,2	0,058

Značaj mikrosatelitnog statusa, kliničkih i patohistoloških karakteristika za preživljavanje bolesnika su ispitivani Cox-regresionom analizom koja se odnosi na celokupno preživljavanje (engl. Overall survival – OS) i preživljavanje specifično za bolest (engl. Disease specific survival – DSS). Nadalje će biti konzistentno korišćene skraćenice OS i DSS.

Univarijantnim Cox regresionim modelom ispitivan je značaj MSI statusa tumora (MSI-H vs MSS/L grupa), godina starosti pacijenata, pola, lokalizacije tumora, stepena mucinske produkcije, prisustva TILs, stepena diferentovanosti tumora i stadijuma bolesti (niži vs viši AJCC stadijum) za preživljavanje bolesnika – DSS i OS (posebno su razmatrani). Multivarijantnim Cox regresionim modelom ispitivan je značaj onih varijabli koje su u univarijantnom modelu imali p vrednost manju od 0,100.

Univarijantnom Cox regresionom analizom vezanom za DSS je pokazana visoka statistička značajnost AJCC stadijuma bolesti za predikciju smrtnog ishoda usled CRC (HR 4,1; 95%CI,1,4-12,2; p=0,011). Ostali pomenuti parametri, pa i MSI status nisu bili značajni prediktori smrtnog ishoda usled CRC (Tabela 18). U multivarijantnom modelu

ispitan je prognostički značaj AJCC stadijuma i stepena diferentovanosti tumora. Oba parametra su statistički značajna za preživljavanje bolesnika (rezultati prikazani u Tabeli 18).

Tabela 18. Univarijantni Cox regresioni model u predikciji pojave smrtnog ishoda usled kolorektalnog karcinoma (DSS)

Parametar	Univarijantna			Multivarijantna		
	HR	95%CI	P	HR	95%CI	p
Godine starosti (< 60 g. vs. > 60 g.)	1,4	0,5-4,5	0,529	-	-	-
Pol (muški vs. ženski)	1,1	0,5-2,8	0,763	-	-	-
Lokalizacija tumora (proksimalni vs. distalni)	4,9	0,7-37,1	0,117	-	-	-
Stepen mucinske produkcije (nizak vs. visok)	1,1	0,7-1,9	0,586	-	-	-
TILs (prisutni vs. odsutni)	1,5	0,6-3,8	0,367	-	-	-
Diferentovanost tumora (slaba vs srednja i dobra)	3,1	1,1-8,6	0,028	2,8	1-7,6	0,051
AJCC stadijum (I i II vs. III i IV)	4,1	1,4-12,2	0,011	3,8	1,3-11,4	0,017
MSS/L vs. MSI-H	2,7	0,4-19,9	0,336	-	-	-

Univarijantnom Cox regresionom analizom vezanom za OS, dokazan je prognostički značaj sledećih parametara: lokalizacija tumora (proksimalna vs. distalna) (HR 2,7; 95% CI 1-7,2; p=0,047), AJCC stadijum bolesti (I, II vs. III, IV) i diferentovanost tumora (HR 2,5; 95%CI,1,1-5,6; p=0,032). Statistička analiza nije ukazala na MSS status kao značajan prognostički parametar smrtnog ishoda (Tabela 19). U multivarijantnom Cox regresionom modelu prognostički značaj istih parametara (AJCC stadijum, lokalizacija i diferentovanost tumora) za predikciju smrtnog ishoda je ostao u granicama statističke značajnost (Tabela 19).

Tabela 19. Univarijantni i multivarijantni Cox regresioni model u predikciji pojave smrtnog ishoda

Parametar	Univarijantna			Multivarijantna		
	HR	95%CI	P	HR	95%CI	p
Godine starosti (< 60 g. vs. > 60 g.)	1,3	0,6-2,7	0,498	-	-	-
Pol (muški vs. ženski)	1,4	0,7-3	0,380	-	-	-
Lokalizacija tumora (proksimalni vs. distalni)	2,7	1-7,24	0,047	2,7	1-7,35	0,050
Stepen mucinske produkcije (nizak vs. visok)	1,6	0,5-5,3	0,444	-	-	-
TILs (prisutni vs. odsutni)	1,8	0,8-3,9	0,148	-	-	-
Diferentovanost tumora (slaba vs srednja i dobra)	2,5	1,1-5,6	0,032	2,4	1-5,3	0,039
AJCC stadijum (I i II vs. III i IV)	2,2	1,0-4,9	0,044	1,8	1,1-3,2	0,017
MSS/L vs. MSI-H	1,9	0,4-7,8	0,397	-	-	-

5. DISKUSIJA

U ovoj doktorskoj disertaciji ispitivana je mikrosatelitna nestabilnost kao molekularni, genetski marker u kolorektalnom karcinomu. Značaj ovog genetskog markera je dvojak, počevši od skrininga za hereditarne forme kolorektalnog karcinoma (Lynch sindrom), do značaja u sporadičnim formama.

Kancerogeneza putem mikrosatelitne nestabilnosti je poseban mehanizam nastanka tumora i ispitivanjem MSI u tkivu karcinoma izdvajamo ovu grupu kao poseban entitet u sklopu CRC. MSI CRC su grupa tumora sa posebnim kliničkim-patohistološkim odlikama, odlikuju se boljom prognozom i sve je više kontroverzno pitanje primene hemioterapije u odnosu na MSI status tumora.

Ispitivanje ovog genetskog markera na našem uzorku je doprinos u utvrđivanju korelacije između kliničkih i patohistoloških karakteristika bolesnika sa CRC i MSI statusa tumora, kao i uticaja MSI statusa tumora na preživljavanje i pojavu recidiva bolesti.

Tehnika ispitivanja mikrosatelitne nestabilnosti u kolorektalnom karcinomu korišćena u ovoj tezi, Pentaplex PCR, odlikuje se jednostavnošću za izvođenje i prvi put je rađena u našoj zemlji. Ovo je prva studija ispitivanja mononukleotidnih, mikrosatelitnih markera u populaciji naših bolesnika sa kolorektalnim karcinomima.

5.1. Diskusija vezana za kliničko-patohistološke karakteristike pacijenata i MSI status

Kolorektalni karcinomi nastali kancerogenezom putem MSI su specifični po svojim kliničkim i patohistološkim karakteristikama. Prema navodima jednog od svetskih eksperata u ovoj oblasti, MSI CRC su toliko različiti u odnosu na CRC nastale putem hromozomske nestabilnosti, da se mogu svrstati u zasebnu bolest (111). U velikom broju pacijenata sa kolorektalnim karcinomom neophodno je detektovati one sa MSI kancerogenezom tj. sa MSI-H fenotipom. U tome pomažu klinički podaci i patohistološke karakteristike tumora.

U ispitivanom uzorku od 150 pacijenata, došlo se do 18 MSI-H tumora što čini 12% od celokupnog uzorka. U literaturi procenat MSI-H CRC iznosi od 12% do 28% (111). 10/88 (11%) muškaraca i 8/62 (12%) žena su imali MSI-H CRC. Nije bilo razlike u godinama starosti između MSI-H i MSS/L grupe pacijenata, iako bi se razlika očekivala, obzirom da MSI-H tumori vezani za pojavu tumora u mlađem životnom dobu. Na prvi pogled ovaj izostanak značajne razlike u godinama starosti između grupa može ukazivati da pojedini naši pacijenti sa MSI-H fenotipom tumora imaju sporadičnu formu CRC. U MSI-H grupi postoji veći broj pacijenata sa tumorom lokalizovanim u proksimalnom kolonu, zbog čega postoji visoka statistička značajnost između grupa. Više od 50% MSI-H tumora u našem uzorku su lokalizovani u desnom kolonu. Ovo je jedna od glavnih kliničkih karakteristika MSI-H CRC, koja je utvrđena od strane mnogih autora (96, 112) i potvrđena je ovom studijom. Kako u Bethesda kriterijumima ne figurira lokalizacija tumora kao odlika MSI-H tumora, od strane pojedinih autora je predloženo da lokalizovanost tumora u desnom kolonu bude sastavni deo ovih kriterijuma (113). U istoj studiji je zaključeno da lokalizacija tumora ima važniju ulogu od MSI histologije u detekciji CRC sa MSI-H fenotipom (113). Tako bi u narednim revizijama trebalo da kriterijumi za detekciju MSI-H obuhvate i pacijente starosti od 50 do 60 godina sa CRC lokalizovanim u desnom kolonu. Prikazani rezultati disertacije ukazuju na značajnu povezanost lokalizacije tumora u desnom kolonu i MSI-H fenotipa tumora što je u korelaciji sa prethodno pomenutom studijom (113). Grupa sa MSI-H proksimalnim CRC ima 9 pacijenata, od kojih su 6 stariji od 60 godina, dok u ovoj grupi 50% pacijenata ima

metilovani hMLH1 gen. Ovo govori u prilog činjenici da su tumori sa MSI-H fenotipom koji lokalizovani u desnom kolonu verovatno sporadične forme CRC.

Kod mikrosatelitno nestabilnog kolorektalnog karcinoma, mora se odgovoriti na pitanje, da li je hereditarna forma CRC ili se radi o sporadičnoj formi. Na prvom mestu kliničke i patohistološke karakteristike pomažu u diferencijaciji ova dva tipa CRC:

- a) porodična anamneza koja je najkorisniji klinički indikator LS;

Pozitivna porodična anamneza je sadržana u 4. i 5. revidiranom Bethesda kriterijumu (B4 i B5). B4 kriterijum ispunjavaju pacijenti koji imaju jednog ili više rođaka prvog stepena srodstva sa CRC ili tumorima udruženim sa LS (dijagnostikovani pre 50. godine ili pre 40. godine kada je reč o adenomima kolona i rektuma). Ovaj kriterijum su ispunila 7 pacijenata, od kojih je 6 imalo MSI-H tumor, većina sa nemetilovanim promotorskim regionom hMLH1 (5 bolesnika), što je implikacija za dalju molekularnu dijagnostiku u smislu Lynch sindroma (u ovoj grupi je verovatna dijagnoza LS na osnovu molekularnih markera). Tri bolesnika koja su ispunila B4 kriterijum imala su manje od 60 godina, dok su tri pacijenta imala više od 60 godina i to: 64 godina (dva pacijenta) i 68 (jedan pacijent). Jedan pacijent koji je ispunio ovaj kriterijum je imao MSS tumor i kod ovog bolesnika nema elemenata za Lynch sindrom iako je mlađe životne dobi. B5 kriterijum ispunjavaju pacijenti koji imaju dva ili više rođaka sa CRC ili drugim karcinomima koji se mogu javiti u sklopu LS, bez obzira na godine starosti. U našoj grupi bolesnika, tri pacijenta su ispunila ovaj kriterijum. Sva tri pacijenta su iz MSI-H grupe i imala su nemetilovan promotorski region hMLH1 gena, što ih selektuje za dalju molekularnu dijagnostiku (sekvenciranje MMR gena) i praćenje u smislu Lynch sindroma. Jedan pacijent je imao manje od 60 godina (41 godinu) i kod njega postoji najviši stepen sumnje da u porodici postoji hereditarna forma kolorektalnog karcinoma (LS). Preostala dva bolesnika su imala više od 60 godina, nemetilovan status promotora hMLH1 gena i treba tragati za genetskim defektom MMR gena (imunohistohemijom ili sekvenciranjem).

- b) godine starosti: pacijenti sa sporadičnim MSI tumorima su stariji (64);

Između grupa sa MSS i MSI-H kolorektalnih karcinoma nije bilo razlike u godinama starosti. MSI-H grupa je heterogena po godinama starosti bolesnika (najmlađi bolesnik je imao 41 godina, najstariji 72 godine). Verovatnoća nasledne forme CRC

rapidno se smanjuje nakon 60. godine života. U našoj MSI-H grupi bilo je 8 pacijenata mlađih od 60 godina, od kojih je 5 imalo nemetilovani promotorski region hMLH1 gena i kod kojih postoji najveći stepen kliničke sumnje na osnovu dostupnih molekularnih pretraga da se radi o LS.

- c) pol: sporadični MSI tumori se dominantno nalaze kod starijih žena, dok se CRC u sklopu LS često nalaze u mladim muškaraca (114, 115);

U ispitivanom uzorku MSI-H tumora sa metilovanim promotorskim regionom hMLH1 gena bilo je 8 pacijenata, od kojih su 5 imali CRC lokalizovan u desnom kolonu (tri muškarca i dve žene). Od 18 MSI-H tumora, najveći stepen verovatnoće da se radi o LS postoji kod dva mlada muškarca (41 i 44 godina).

- d) lokalizacija tumora: CRC u sklopu LS imaju predilekciju za javljanje u desnom kolonu, ali se i do 40% mogu javiti u levom kolonu i rektumu; sporadični MSI-H CRC se javljaju pretežno u desnom kolonu (90%) (116);

U grupi sa MSI-H i nemetilovanim hMLH1, 4 pacijenata je imalo CRC u desnom kolonu, 5 karcinom rektuma, dok je jedan pacijent imao CRC lokalizovan u levom kolonu. Dva muškarca sa najvećom verovatnoćom za LS imali su MSI-H karcinom rektuma. Od 8 sporadičnih MSI-H tumora, čak 5 su lokalizovani u desnom kolonu.

- e) patohistologija: MSI CRC su često slabije diferentovani, sa mucinskom produkcijom, bez nekroze u tumorskom tkivu, sa povećanim limfocitnim infiltratom i prominentnom inflamatornom reakcijom na ivicama tumora (reakcija limfocita kao u Kronovoj bolesti – „Crohn like“).

Ispostavilo se da su sporadični MSI CRC slabije diferentovani i imaju izraženiju mucinsku produkciju od CRC u sklopu LS (109). Ove patohistološke karakteristike dovele su do razvoja brojnih, različitih skorova (117, 118) koji pomažu u boljoj selekciji većeg broja CRC sa MSI-H fenotipom. Pomenuti skorovi i dalje nemaju mogućnost da razdvoje sporadičnu od hereditarne forme MSI CRC.

Revidirani Bethesda kriterijumi su nedovoljni da u potpunosti razdvoje hereditarnu od sporadične forme MSI CRC slučajeva. Zbog toga je dijagnoza LS u našim slučajevima najverovatnija ukoliko se radi o MSI-H tumoru sa nemetilovanim promotorskim regionom

hMLH1. Pacijent srednjih godina od 50 do 65 godina i nejasnom porodičnom anamnezom koji ima mikrosatelitno nestabilan kolorektalni karcinom predstavlja kliničku dilemu, jer diferencijalno dijagnostički mogu doći u obzir obe forme CRC, kako LS tako i sporadična forma. U tom slučaju sledeći dijagnostički korak nakon određivanja MSI statusa tumora bio bi ispitivanje metilacije promotora hMLH1 gena u tumoru, koja bi ukazala na sporadični CRC. Prvi slučaj metilacije promotora hMLH1 opisan je 1997. godine (119). Metilacija se dešava na nivou dinukleotidnih ponovaka (CpG) koji čine i do 60 % promotorskog regiona gena i utiče na gensku ekspresiju. Sporadični MSI slučajevi CRC imaju metilaciju mnogih promotora i čine jedinstvenu i dobro definisanu podgrupu CRC (CpG Island Methylation Phenotype – CIMP). Sporadični MSI CRC su uglavnom CIMP pozitivni, za razliku od hereditarnih formi koje su CIMP negativni (120). Mutacija BRAF gena na karakterističnom mestu, V600E („hotspot“) povezana je sa metilacijom hMLH1 promotora i/ili CIMP podgrupom CRC. Oko 10% CRC imaju ovu mutaciju, ali je interesantna činjenica da je nije nađena u CRC u sklopu LS (121).

Kao što je već pomenuto, u mnogim studijama su pročavane patohistološke karakteristike koje bi predvidele MSI-H fenotip CRC. U ovoj studiji MSI-H CRC su bili češće slabe diferentovanosti, ali statistička razlika u odnosu na MSS/L grupu je bila blizu statističke značajnosti. U drugim studijama statistički je značajno veći broj slabije diferentovanih tumora u MSI-H grupi pacijenata (122, 123). U drugoj studiji u kojoj je ustanovljen model za predikciju MSI-H fenotipa tumora (PREDICT – Tabela 20) diferentovanost tumora nije odlika koja bi ukazala na MSI-H tumor (117). MsPath skor sadrži slabu diferentovanost kao parametar koji ukazuje na MSI-H tumor (109). U studiji Greensona i saradnika diferentovanost je drugačije analizirana. Oni su došli do zaključka da i dobro diferentovani i slabo diferentovani tumori mogu ukazati na MSI-H fenotip, te su ove grupe tumora zajedno klasifikovali i na taj način analizirali prediktivnu vrednost diferentovanosti (118).

TILs je sledeća patohistološka odlika koja ukazuje na MSI-H fenotip u mnogim studijama (109, 118). U pomenutoj studiji Greensona i saradnika, TILs nije značajna odlika MSI-H grupe tumora, kao i u ovoj studiji gde su naši pacijenti sa MSI-H tumorima češće mali manje od 5 limfocita na histološkom preparatu. Stoga, TILs se nije pokazao kao značajan prediktor MSI statusa u ovoj studiji. U drugoj studiji je pokazano da je prisustvo TILs specifičan, ali ne i senzitivn parametar za detekciju MSI-H tumora (specifičnost =

98,2%; senzitivnost = 33,3%), jer je samo 5 od 15 MSI-H CRC u pomenutoj studiji imalo tumor-infiltrirajući limfocitni infiltrat.

MSI-H tumori su češće mucinozne diferencijacije (109, 118, 122, 123), što je pokazano i u ovom uzorku pacijenata. Univarijatnom logističkom regresijom je pokazano da su nezavisni prediktori MSI-H tumora povećana mucinska produkcija i ispunjenost kriterijuma za MSI histologiju, a od kliničkih karakteristika, lokalizovanost tumora u desnom kolonu, ispunjenost nekog od RBK. Multivarijatnim logističkim modelom ustanovljena je značajnost lokalizacije u desnom kolonu i ispunjenosti nekog od RBK za predikciju MSI-H CRC. Parametri koji su bili značajni u univarijatnom modelu: mucinska produkcija, MSI histologija, u multivarijatnom nisu bili značajni, obzirom da su sadržani u RBK u sklopu trećeg kriterijuma (B3).

U ovoj studiji je jedan od kriterijuma neuključivanja pacijenata bio ispunjenje Amsterdamskih kriterijuma. Pacijenti koji ispunjavaju Amsterdamske kriterijume ne zahtevaju MSI testiranje. Pacijent koji ispuni ove kriterijume sa najvećom verovatnoćom ima HNPCC i ovog pacijenta treba testirati na prisustvo germinativnih mutacija nekog od 4 MMR gena (sekvenciranje) (124, 125).

U ovoj prospektivnoj studiji je ispitivana klinička validnost Bethesda kriterijuma, MsPath skora i MSI-histologije za detekciju MSI-H CRC. Prema rezultatima, oko 80% pacijenta sa MSI-H tumorima, ispunilo je bar jedan od revidiranih Bethesda kriterijuma. U skorašnjoj studiji (117), analizirana je vrednost RBK za detekciju MSI sa i bez trećeg kriterijuma (B3). U ovom istraživanju, 2/3 MSI-H tumora identifikovano je ispunjenjem bar jednog RBK. RBK su u pomenutoj studiji imali senzitivnost od 66,7% i specifičnost od 50,9% za detekciju CRC sa MSI-H fenotipom. Senzitivnost i specifičnost RBK za detekciju MSI-H u našem uzorku su iznosile 83,3% odnosno 77,2% procenata. Može se reći da su senzitivnost i specifičnost RBK bile većih vrednosti u ovoj u odnosu na pomenutu studiju (117). U oba istraživanja su uključivani pacijenti sa CRC ispod 75 godina starosti, ali je broj pacijenata u pomenutoj studiji bio znatno veći (700 pacijenata). Senzitivnost MSI histologije u istoj studiji je bila 82,5%, dok je specifičnost bila niska 27,1%. U drugoj studiji senzitivnost i specifičnost MSI histologije za detekciju MSI-H CRC iznosile su 66,7% i 68,5%. Niža specifičnost je povezana sa većim brojem mucinoznih karcinoma koji su ispunili kriterijum za MSI histologiju, ali su bili MSS fenotipa (126).

Iznenadujuća je niska senzitivnost prvog revidiranog Bethesda kriterijuma (11%) u ovoj studiji. Sa druge strane B1 kriterijum je imao visoku specifičnost. Razlog niske senzitivnosti ovog kriterijuma za detekciju MSI-H CRC je činjenica da su samo dva pacijenta u MSI-H grupi imala manje od 50 godina. U ranijim Bethesda kriterijumima je starosna granica bila manja i iznosila je 45 godina. Iz toga je proistekla ideja da se u prvom revidiranom kriterijumu modifikuje starosna granica na 45 godina, kao u ranijim Bethesda kriterijumima iz 1997. godine, bez modifikacija ostalih kriterijuma. U tom slučaju dobijamo veću specifičnost kriterijuma, ali senzitivnost ostaje ista. Razlog povećanja specifičnosti ovakih kriterijuma jeste smanjenje određenog broja lažno pozitivnih slučajeva (pacijenti MSS/L grupe koji su starosne dobi od 45 do 50 godina). Ova modifikacija je samo hipotetička, na osnovu našeg uzorka (127).

Pacijenti sa sinhronim i metahronim kolorektalnim tumorima, ali i drugim tumorima koji se mogu javiti u sklopu LS, ispunjavaju drugi RBK (B2). U našem uzorku bilo je svega 5 pacijenata koji su ispunili B2, od kojih je samo jedan bio MSI-H, što je rezultovalo niskom specifičnošću ovog kriterijuma u detekciji MSI-H (veći broj lažno pozitivnih slučajeva, pacijenti sa MSS tumorima koji su ispunili ovaj kriterijum).

U kohorti naših pacijenata MSI histologija je imala senzitivnost od 87%, dok je specifičnost bila 67% za detekciju MSI-H tumora. Jenkins sa saradnicima (109) je 2007. godine publikovao MsPath model za predikciju MSI-H tumora. Ovaj model ne uključuje porodičnu anamnezu, ali sa druge strane uključuje histološke karakteristike opisane u B3, lokalizaciju tumora kao i starost pacijenata prilikom postavljanja dijagnoze CRC. MsPath model je primenljiv na pacijente sa dijagnostikovanim CRC pre 60 godina starosti. Prema pomenutoj studiji tvorca MsPath skora Jenkinsa i saradnika, vrednost skora ≥ 1.0 je imao senzitivnost od 93% i specifičnost od 55% za detekciju MSI-H tumora (109). Kada smo MsPath skor primenili na našem uzorku bolesnika, sa preporučenom graničnom vrednošću od 1, dobili smo senzitivnost od 86%, a specifičnost 85%. Broj naših pacijenata je manji od onog u kome su Jenkins i saradnici primenjivali svoj MsPath skor, ali je senzitivnost skora bila slična u obe studije. To bi dalje značilo da je MsPath koristan skor za patologe radi selekcije za MSI testiranje. Nedostatak MsPath skora jeste njegova neprimenjivost na bolesnike preko 60 godina, te bi veliki broj MSI-H CRC bili ispušteni.

U skorašnjoj studiji kojom je prezentovan novi model za detekciju MSI-H CRC nazvan PREDICT (Tabela 20), analizirana je validnost MsPath skora (117). Senzitivnost je

bila blizu vrednosti do koje su došli Jenkins i saradnici (92,1%), ali je specifičnost bila značajno niže vrednosti 37,8%. U pomenutoj studiji (117) multivarijantnom logističkom regresijom došlo se do parametara koji sa značajno korelišu sa MSI-H fenotipom CRC na osnovu čega je formiran PREDICT model za detekciju MSI-H CRC. Lokalizacija CRC u desnom kolonu, mucinozna diferencijacija, godine starosti pacijenta ispod 50, TILs, peritumorska reakcija, povišen plazma ćelijski infiltrat u stromi predstavljaju komponente PREDICT modela i parametre koje značajno korelišu sa MSI-H statusom CRC. Od pomenutih 6 parametara PREDICT modela, u ovoj studiji tri parametra (lokalizovanost CRC u desnom kolonu, mucinozna diferencijacija, godine starosti ispod 50 - B1 kriterijum) takođe značajno korelišu na osnovu uni i multivarijantne logističke regresije; TILs ne korelišu sa MSI-H statusom CRC; dok dva preostala parametra (peritumorska limfocitna infiltracijai plazma-ćelijski infiltrat u stromi) nisu uzeta u razmatranje. Crohn-like limfocitni infiltrat je primećen u tri bolesnika, i nijedan nije bio u MSI-H grupi. Sličan rezultat je dobijen u studiji koja opisuje PREDICT model, dok u drugoj studiji (118) ovaj nalaz visoko korelišu sa MSI-H fenotipom CRC.

U ovom istraživanju multivarijantnom logističkom regresijom analizirani su oni klinički i patohistološki parametri koji su u univarijantnoj analizi bili statistički značajni ili je p vrednost bila manja ili jednaka 0,100 – lokalizovanost tumora u desnom kolonu, ispunjavanje bar jednog od RBK, ispunjavanje kriterijuma za MSI-histologiju, stepen diferentovanosti i stepen mucinske produkcije. Multivarijantnom logističkom regresijom su lokalizacija u desnom kolonu i RBK ostali u domenu statističke značajnosti, dok su stepen mucinske produkcije, stepen diferentovanosti, MSI histologija bili izvan granica statističke značajnosti. Stepem mucinske produkcije, diferentovanosti, MSI histologija su već sadržani u trećem kriterijumu RBK, pa zbog toga u multivarijantnom modelu nisu bili statistički značajni prediktori MSI-H fenotipa tumora.

Grupa pacijenata sa MSI-L tumorima (nestabilnost u jednom mikrosatelitnom markeru) je svrstana sa grupom pacijenata sa mikrosatelitno stabilnim CRC (MSS/L grupa). U našem uzorku grupu sa MSI-L tumorima činilo je 7 pacijenata (3 žene i 4 muškaraca). Starosna struktura ove grupe tumora u našem uzorku je bila heterogena, ali među njima nije bilo pacijenata koji su ispunjavali B1 tj. bili mlađi od 50 godina. 3 pacijenta su imala tumor desnog kolona (karakteristika MSI-H tumora), druga polovina pacijenata sa MSI-L CRC imala je distalne karcinome (po 2 karcinoma – levi kolon i

rektum). U najvećem broju studija su ovi pacijenti svrstani su sa MSS grupom tumora zbog sličnog biološkog ponašanja i sličnih kliničkih i patohistoloških karakteristika, iako imaju nestabilnost u jednom markeru. Zbog toga je ova grupa tumora prema literaturnim podacima kontroverzna. Yearsley i saradnici (128) nisu pronašli razliku između MSI-L i MSS grupa CRC kada su ih upoređivali na osnovu kliničkih i patohistoloških karakteristika (mucinska produkcija, histološki tip, diferentovanost, TILs). I drugi autori zaključuju da je MSI-L grupa tumora sličnija MSS fenotipu nego MSI-H (129). Patohistološke odlike MSI-L grupe tumora u našem uzorku sličnije su MSS grupi CRC (diferentovanost umerena i dobra, bez TILs, i samo jedan tumor sa pozitivnom mucinskom produkcijom). Samo dva MSI-L tumora su imala pozitivan MsPath skor, ali zbog lokalizacije u desnom kolonu i godina starosti. Jedina sličnost sa MSI-H tumorima je bila lokalizacija u desnom kolonu (50%), ali je neophodan znatno veći broj ovih tumora da bi se njihova sličnost potvrdila ili ne.

Tabela 20. PREDICT model – za predikciju MSI-H kolorektalnih karcinoma

Karakteristika	Skor
Lokalizacija tumora u desnom kolonu	1.6
Mucinska produkcija	1.6
Godine starosti < 50	1.3
Tumor-infiltrirajući limfociti	1.3
Peritumorska reakcija	1.3
Povećan stromalni plazma-ćelijski infiltrat	0,7
Maximalni skor	7,8

Granična vrednost skora = 2.7

Pojedini autori smatraju da MSI-L tumori mogu imati sličnosti i sa MSI-H i MSS tumorima i da predstavljaju specifičnu i posebnu grupu kolorektalnih karcinoma sa specifičnom MSI-L kancerogeneza (41, 130). Nova kancerogeneza MSI-L tumora je razmatrana u tri nezavisna istraživanja (130, 131,132) u kojima se došlo do sličnog zaključka da su KRAS mutacije učestalije u ovoj grupi tumora (41% do 50%) u odnosu na MSS (18% do 30%), naročito u odnosu na MSI-H tumore gde su KRAS mutacije retke.

Whitehall i saradnici su publikovali povezanost metilacije promotorskog regiona MGMT gena (MethylGuanine Transferase) i MSI-L fenotipa tumora. MGMT je gen koji ima ulogu u mehanizmima reparacije DNK nakon replikacije, stoga je razumljivo kako dolazi do MSI u ovom slučaju nižeg stepena (MSI-L). Jass sa svojim saradnicima je postavio hipotezu o inaktivaciji MGMT gena koja rezultuje ekscesivnom sparivanju metilguanina sa timinom i većom verovatnoćom pojave grešaka u genomu koje neće biti prepoznate od MMR mehanizama (130).

5.2. Diskusija vezana za tehniku određivanja MSI i mikrosatelitne markere

Mikrosatelitna nestabilnost se definiše kao pojava novih alela u repetitivnim (mikrosatelitnim) sekvencama, koji su odsutni u normalnoj DNK. Kako se greške u replikaciji češće dešavaju u repetitivnim sekvencama DNK, posledica inaktivacije nekog MMR gena u tumorima, rezultuje akumulacijom brojnih delecija i insercijama u mikrosatelitnim sekvencama genoma. Ova pojava je prvobitno nazvana RER ili „Replication Error“ ali je sada u upotrebi termin MSI (engl. Microsatellite Instability) (50).

MSI-H fenotip tumora se definiše postojanjem nestabilnosti u najmanje tri mononukleotidna mikrosatelitna markera. Ukoliko postoji varijabilnost dva ili jednog alela, tumor je MSI-L fenotipa. U našem uzorku nije bilo tumora sa nestabilna dva alela, a samo jedan MSI-H tumor je imao varijabilnost u tri markera i on je klasifikovan u MSI-H grupu. Ostali MSI-H tumori imali su nestabilnost u 4 ili u svih pet markera.

Kao što je napomenuto u uvodnom poglavlju, 1997. godine predložen je Bethesda panel sa tri dinukleotidna i dva mononukleotidna markera (BAT-26, BAT-25) za dijagnostiku MSI. 2004. godine je opisan Pentaplex, PCR metoda sa pet obeleženih mononukleotidnih markera. Prednosti mononukleotidnih markera nad dinukleotidnim su višestruke. Prvo, senzitivnost dinukleotidnih ponovaka za detekciju MSI-H tumora je manja, 85- 89% za D2S123, 77-81% za D17S250 i 59-69% za D5S345 u odnosu na mononukleotidne. Ukoliko postoji mutacija MSH-6 gena (MMR gen), mikrosatelitna nestabilnost ne može detektovati dinukleotidnim markerima, jer u ovom slučaju postoji insercija/delecija manje od 2 bp. Sa druge strane MSI koja nastaje usled mutacije MSH-6 gena može se detektovati mononukleotidnim markerima i Pentaplexom (133). Kao i u ovoj studiji, i u drugima su BAT-25 i BAT-26 markeri bili nestabilni u 100% MSI-H CRC (134). Mutacija mononukleotidnih markera ogleda se u njihovom skraćanju, koje koreliše sa stepenom akumulacije mutacija u kodirajućim sekvencama prilikom neoplastičnog procesa (engl. Shortening Index at Non Coding repeats – SINC). Sa tehničke i praktične strane, interpretacija dinukleotidnih markera je složenija u odnosu na interpretaciju mononukleotidnih. Za mikrosatelitni marker koji se koristi u detekciji mikrosatelitne nestabilnosti neophodna karakteristika je monomorfizam markera u određenoj populaciji. U dinukleotidnim ponovcima veća je stopa polimorfizma, pa rezultati mogu biti tumačeni kao lažno pozitivni. Kako mikrosatelitni markeri nisu u 100% slučajeva monomorfni u

jednoj populaciji, termin koji ih bolje opisuje je „kvazi“monomorfizam, jer postoje male varijacije u njihovoj dužini u MSS tumorima i normalnom, zdravom tkivu, koja iznosi u proseku 2bp (135). Prilikom analize MSI statusa u tkivu tumora mononukleotidnim, mikrosatelitnim markerima nije neophodno upoređivanje sa statusom ovih markera u zdravoj DNK. Tumorska DNK je dovoljna za analizu MSI statusa mononukleotidnim markerima po mišljenju mnogih autora. (103, 105, 136). Ukoliko se koriste dinukleotidni markeri, korišćenje zdrave, pored tumorske DNK je imperativ. Stoga su mononukleotidni markeri informativniji, senzitivniji, specifičniji i praktičniji u MSI analizi, u odnosu na dinukleotidne. Zbog toga se u poslednjem Bethesda konsenzusu prednost ipak daje upotrebi mononukleotidnih markera za MSI analizu (49).

U dosadašnjim studijama dužine alela mikrosatelitnih markera korišćenih u ovoj studiji (BAT-25, BAT-26, NR-21, NR-22 i NR-24) su sledeće: 124, 120, 103, 142 odnosno 132 baznih parova (bp) (103). BAT-25 je u ispitivanoj seriji pacijenata bio monomorf u opsegu 123-124 baznih parova sa jasnom granicom ka varijabilnim alelima somatskih mutacija ili polimorfizmima gde su aleli ovog markera u opsegu od 110 do 120 baznih parova. BAT-26 marker je u MSS tumorima je bio najčešće dužine od 116bp do 119bp (u najvećem broju slučajeva njegova dužina je iznosila 118 bp). U odnosu na prvobitnu studiju BAT-26 marker je bio kraći u ispitivanom uzroku, bez jasne razlike između stabilnog i varijabilnog alela. I kod markera NR-21 nema jasne razlike u dužini fragmenata između stabilnih i varijabilnih alela, ali je kvazimonomorfni opseg (QMVR) bio sličan publikovanim vrednostima ± 2 bp (100-102bp). NR-22 i NR-24 su bili kraći za više od 2 bp kod naših bolesnika. Dužina u stabilnom/nemutiranom opsegu za NR-22 je bila od 137 do 139bp, dok je za NR-24 bila od 127 do 129 bp, u najvećem broju slučajeva je dužina ovog markera iznosila 128 bp. Kod oba markera uočena je bimodalna distribucija – varijabilni (mutirani ili polimorfni) aleli i stabilni aleli jasno razdvojeni. Generalno je dužina svih fragmenata bila kraća u odnosu na studiju gde su prvobitno bili korišćeni (103). Moguća objašnjenja ovog skraćivanja je činjenica da je u ovoj studiji korišćena tumorska DNK, dok je u pomenutoj studiji analizirana germinativna DNK. Drugi mogući razlog jeste razlika u tumačenju rezultata tj. tehničkom smislu ± 2 bp.

Mali nestabilni aleli mogu biti lako uočeni i razlikuju se u odnosu na normalno, zdravo tkivo pomoću analize SSCP (engl. single strand conformation polymorphism) što se dokazuje sekvenciranjem DNK. BAT-26 je visoko senzitivna za detekciju MSI-H

kolorektalnog karcinoma, što je navelo mnoge istraživače da predlože marker BAT26 kao jedinog u determinaciji MSI statusa sa tačnošću više od 99% (50, 137-139). Markeri BAT26 i BAT25 bili su 100% senzitivni za detekciju MSI-H tumora u našem uzorku. Takođe mnogi autori predlažu upotrebu BAT25 i BAT26 za determinaciju MSI statusa tumora umesto panela 5 markera predloženih od strane Nacionalnog Instituta za Kancer (engl. National Cancer Institute – NCI) (140, 141). Od ostala tri markera, NR-22 marker je pokazao zapaženu monomorfnost (čak 123 pacijenata sa MSS tumorima imali su dužinu od 138 bp), ali mu je senzitivnost za detekciju MSI-H tumora bila najniža u poređenju sa ostalim markerima.

U narednoj studiji francuskih autora (142) koji su prvi publikovali Pentaplex metodu sa mononukleotidnim markerima za determinaciju MSI statusa, NR-22 marker je zamenjen NR-27 markerom, dok su ostali markeri bili različite dužine, ali su analizirane repetitivne sekvence ostale iste (u daljem tekstu novi Pentaplex). Ovi autori (142) su analizirali germinativnu DNK novim pentaplexom kod 1206 pojedinaca u 55 populacija širom sveta. Ovom opsežnom studijom utvrđena je sledeća stopa polimorfizma 2.6% (62 od 2,412) za NR-21, 0.1% (2 of 2,412) za NR-24, 1.7% (40 od 2,412) za BAT-25, i 1.2% (30 of 2,412) za BAT-26. U ovoj studiji se prvi put pominje kvazimonomorfni opseg dužine markera (QMVR). Ovaj opseg za svaki od markera varira u proseku oko 5 baznih parova. Za BAT-25, BAT-26 i NR-21 opisana je bi i trimodalna distribucija dužina fragmenata koji odgovaraju QMVR i varijantnim alelima. U našem slučaju, jedino je za BAT-26 postojala bimodalna distribucija dužine fragmenata, dok za NR-21 nije bilo jasne granice između normalnih i skraćenih fragmenata.

Pyatt i saradnici (143) su pokazali visok stepen varijacija BAT25 i BAT26 markera kod populaciji Afro-Amerikanaca, sugerišući da varijacije mogu postojati i u drugim populacijama. Ovo otkriće je ohrabrilo istraživače koji su propagirali korišćenje korespondentne, zdrave DNK prilikom determinacije MSI statusa tumora. Takođe je zapaženo da ovi markeri pokazuju veći polimorfizam u populaciji bolesnika sa endometrijalnim karcinomima (143). Zbog svega navedenog je neophodno u određenoj populaciji odrediti stopu polimorfizama ovih markera bilo u tumorskoj bilo u zdravoj DNK, i potom odluku o korišćenju zdrave DNK u determinaciji MSI statusa zasnovati na stopi polimorfizama markera i nejasnih slučajeva. To znači da učestalost varijacije alela u određenoj populaciji treba definisati pre implementacije metoda za određivanje MSI

statusa tumora. U populaciji naših bolesnika, stopa polimorfizama je bila niska, stoga nismo koristili zdravu DNK prilikom analize MSI statusa tumora.

Nije bilo nejasnih slučajeva u determinaciji MSI statusa u ispitivanoj grupi kada je reč o MSI-H i MSS CRC. Jedina dvosmislenost u tumačenju rezultata Pentaplex reakcije predstavlja nestabilnost detektovana u jednom mononukleotidnom, mikrosatelitnom markeru. Nestabilnost u jednom markeru može biti tumačena dvojako, kao polimorfizam i kao MSI-L fenotip tumora (Slika 12). Klinički značaj ove činjenice je mali, obzirom da se oba tumora (i MSI-L i MSS sa polimorfizmom u jednom markeru) svrstavaju u MSS/L grupu. U ispitivanom uzorku bilo je 13 slučajeva nestabilnosti u jednom markeru, i u ovom slučaju je MSI status određen i u germinativnoj DNK (u krvi bolesnika). Na ovaj način su dokazani polimorfizmi kod 6 bolesnika, 2 pacijenta su konstitucionalno imala varijantni alel BAT25 (stopa polimorfizma 1,3%). Kod 3 bolesnika detektovan je polimorfizam za NR21 (stopa polimorfizma 1,7%), dok je jedan pacijent imao polimorfizam NR-24 markera (0,5%). BAT-26 i NR-22 nisu bili varijantni usled polimorfizma, već samo usled somatskih mutacija (MSI). Kako je stopa polimorfizma bila niska, dalje određivanje MSI statusa će se raditi bez upoređivanja sa MSI statusom u zdravom tkivu. Stopa polimorfizama mononukleotidnih markera je poznata u mnogim populacijama u Evropi, Aziji, i kod Afro-Amerikanaca (142, 144). Prema podacima studije Pyatt i saradnika (143), u populaciji 103 Afro-amerikanaca stopa polimorfizma je 12.6% za BAT-26 i 18.4% za marker BAT-25. U toj studiji se došlo do zaključka da repetitivni region u markeru BAT26 varira od 21 do 27 adeninska ponovka i kod zdravih pojedinaca. Polimorfizam NR-21 markera je najviše prisutan u Centralnoj i Južnoj Aziji (Makrani iz Pakistana) i dve kineske manjine iz istočne Azije (Dai i Tujia) (142). Opisana stopa polimorfizma NR-21 u ovim populacijama je visoka i iznosi 25,6% (Mahdi Montazer Haghghi). U istoj populaciji stopa polimorfizma BAT-25 je bila takođe visoka i iznosila je 23,1%.

5.3. Diskusija vezana za preživljavanje i tok bolesti u odnosu na MSI status

MSI status kolorektalnog karcinoma može imati prognostički značaj. Retrospektivne i populacione studije potvrđuju bolje preživljavanje i prognozu kod pacijenata sa MSI-H tumorima u poređenju sa pacijentima sa MSS tumorima.

U seriji od 607 pacijenata (Ontario) koji su dijagnostikovani do 50 godine života, MSI-H fenotip tumora je bio nezavisan prognostički faktor uz stadijum bolesti, diferentovanost tumora (145) na osnovu multivarijantne analize. Bez obzira na dubinu tumorske invazije, CRC sa MSI-H fenotipom imali su značajno manju verovatnoću pojave metastaza u regionalnim limfnim čvorovima ili udaljenim organima (145). Bazirano na ovoj studiji, MSI u CRC predstavlja povoljan prognostički marker, vezan za dobru prognozu. Slično prethodnoj studiji, populaciona studija Utaha i Severne Kalifornije, ukazala je na povezanost dobre prognoze i MSI statusa, nezavisno od stadijuma, lokalizacije, histoloških karakteristika i godina starosti bolesnika (146). Zapravo, su ovi autori zapazili 60% manji broj smrtnih ishoda zbog CRC u grupi pacijenata sa MSI-H fenotipom. Smatrali su da tumor III stadijuma ima biološko ponašanje II stadijuma ukoliko nastaje putem MSI-H kancerogeneze (146).

U ovoj studiji primećen je manji procenat recidiva bolesti u MSI-H grupi pacijenata u odnosu na MSS/L grupu, kada su uzeti u razmatranje pacijenti I, II i III stadijuma. Obzirom na prisutnu metastatsku bolest u momentu operacije pacijenti IV stadijuma su isključeni iz procene značajnosti MSI statusa tumora za pojavu recidiva. Iako je broj smrtnih ishoda u MSI-H grupi bio značajno manji u odnosu na MSS/L grupu, analizom preživljavanja nije se došlo do statističke značajnosti. Tako da MSI status možemo smatrati pokazateljem povoljnijeg biološkog toka kolorektalnog karcinoma. U našoj grupi MSI-H tumora imali smo samo jednog pacijenta u IV stadijumu sa MSI-H tumorom.

Retrospektivna studija od 460 pacijenata u III stadijumu pokazala je bolju prognozu kod pacijenata sa MSI-H tumorima i nosiocima mutacije za receptor II TGF- β 1 (147). Iako većina studija sugeriše da pacijent sa MSI-H CRC ima dobru prognozu, postoje i suprotni rezultati. U studiji škotskih autora je zaključeno da su pacijenti mlađi od 30 godina sa MSI-H tumorom imali lošiju prognozu, tok bolesti i preživljavanje u odnosu na pacijente sa MSS fenotipom tumora (148). Mlađi pacijenti češće su imali MSI-H tumor, sa

mucinoznom diferencijacijom i uznapredovalu bolest. Relativni rizik smrtnog ishoda povezan sa CRC kod pacijenata mlađih od 30 godina sa MSI-H tumorom je bio 0,87, dok je u kontrolnoj kohorti starijih bolesnika ovaj rizik iznosio 0,11 (148).

MSI status ima značaj u reagovanju tumora na adjuvantnu hemioterapiju (149). Ovo je još jedan od kliničkih značaja mikrosatelitne nestabilnosti, koji nije ispitivan u ovoj disertaciji, ali je neophodno istaći, jer adjuvantna hemioterapija ima jednu od glavnih uloga u prognozi i preživljavanju bolesnika. Danas je vreme personalizovane terapije tj. svaki bolesnik zahteva individualan pristup. Savremena medicna traga za markerima koji bi precizno ukazali na terapiju koju treba dati određenom bolesniku. Primer ovakve terapije u kolorektalnom karcinomu je anti-EGFR, koju dobijaju pacijentu u IV stadijumu sa nemutiranim KRAS genom. MSI je potencijalno takav marker kada se adjuvantna terapija bazirana na 5-FU planira u lečenju bolesnika sa CRC, prvenstveno kod pacijenata u II stadijumu. Studija Ribic i saradnika (149) pokazala je da 5-FU terapija ima efekta kod pacijenata sa CRC u II i III stadijumu sa MSS ili MSI-L fenotipom tumora, dok je efekat ove hemioterapije izostao kod MSI-H tumora. Bez hemioterapije, pacijenti sa MSI-H tumorima imali su značajno veće celokupno preživljavanje u odnosu na MSS i MSI-L tumore u istoj studiji. Kada su dobijali hemioterapiju, pacijenti sa MSI-H tumorima nisu imali poboljšanje preživljavanja u poređenju sa MSS i MSI-L grupom pacijenata (149). Dosadašnje studije ukazuju da pacijenti sa MSI-L CRC imaju slično preživljavanje i prognozu kao i MSS tumori (136, 145, 149, 150). U najvećem broju studija prognostički značaj MSI statusa je ispitivan češće na osnovu bimodalne distribucije (MSI-H versus non-MSI-H), ređe trimodalne MSI-H versus MSI-L versus MSS (136, 145, 149).

Stadijum tumora predstavlja najvažniji prediktivni faktor prognoze, i najbolji vodič za terapijske odluke u kolorektalnom karcinomu. Originalni Dukes sistem za klasifikaciju CRC je bio baziran na anatomskoj osnovi, i stepenima tumorske infiltracije zida kolona, kao i na prisutne ili odsutne depozite u limfnim čvorovima (43). Dukes klasifikacija je dobro korelisala sa prognozom, ali je narednih godina modifikovana i potom zamenjena novijim staging sistemima. Prva modifikacija Dukes klasifikacije je bila 1944. godina, uveden je C1 i C2 substadijum, uz D stadijum za uznapredovalu bolest sa udaljenim metastazama. Potom je usledila Astler-Coller klasifikacija (44), kojim su podeljeni stadijumi na B1 i B2, obzirom na nekompletnu ili kompletu infiltraciju tankog mišićnog sloja u samoj sluznici, (lamine muscularis mucosae). U ovoj klasifikaciji su tumori sa

metastazama u RLN kalsifikovani u C1 i C2 stadijum, zavisno od tumorskog širenja kroz mukozu, a ne u odnosu na zahvaćenost limfnih čvorova. Konačno, American Joint Committee (AJC) i Union Internationale Contre Le Cancer (UICC) su udruženim snagama stvorile TNM klasifikaciji (45), što je bio pokušaj da se objedine klinički i patohistološki podaci.

Tabela 21. Prognostički značaj AJCC stadijuma za 5-godišnje preživljavanje bolesnika

AJCC stadijum	5-godišnje preživljavanje pacijenata	
	Karcinom kolona	Karcinom rektuma
I	74%	74%
IIA	67%	65%
IIB	59%	52%
IIC	37%	32%
IIIA	73%*	74%*
IIIB	46%*	45%*
IIIC	28%	33%
IV	6%	6%

U ovom istraživanju stadijum bolesti najviše koreliše sa prognozom bolesti u gotovo svim analizama preživljavanja, uključujući i Cox regresioni model, što je potvrda verodostojnosti studije.

Rezultati skorašnje studije sugerišu da je prisustvo limfocitnog infiltrata, nevezano od molekularnih karakteristika tumora, povezano sa dužim preživljavanjem (151). TILs je prema nekim autorima histološka karakteristika MSI-H tumora, i verovatno je bolja prognoza ove grupe tumora povezana sa naglašenim imunim odgovorom nasuprot malignih ćelija (152). U ovoj studiji TILs nisu bili u korelaciji sa boljim preživljavanjem. TILs je bio češće prisutan kod pacijenata koji nisu imali recidiv bolesti, ali statistička značajnost nije bila dostignuta.

Najveći broj kolorektalnih karcinoma su adenokarcinomi i imaju mucinoznu diferencijaciju u 10% slučajeva, signet ring diferencijaciju u 1-2,4% (153). Mucinozni karcinomi se definišu prisustvom mucina koji zauzima više od 50% tumorske mase. Signet ring karcinomi se odlikuju intracelularnim mucinom koji pomera jedro ka jednoj strani

ćelije. Pojedini autori smatraju da nema razlike u preživljavanju između mucinoznih i nemucinoznih CRC (155, 156). Prema drugim autorima mucinozni CRC imaju lošiju prognozu i preživljavanje (157, 158), vezani su bili za uznapredovali stadijum bolesti, recidive, sekundarne depozite. Sa druge strane signet ring diferencijacija je povezana sa većom stopom pojave metastaza u limfnim čvorovima i udaljenim organima na osnovu rezultata velike studije sa 2.764 slučaja sporadičnog CRC (159). U ovoj studiji, prisustvo mucina u tumorskom tkivu je povezano sa češćom pojavom recidiva bolesti, bez značajnijeg uticaja na celokupno preživljavanje (OS) kao i na preživljavanje specifično za CRC (DSS). Kako je mucinska produkcija patohistološka karakteristika MSI-H tumora za koje se smatra da su povezani sa dobrom prognozom, postoji dvosmislenost prognostičkog značaja same mucinske produkcije koja može da ukaže na agresivnost tumora, ali i da bude povezana sa dobrom prognozom MSI-H tumora. Objašnjenja za agresivniji klinički tok CRC sa povećanom mucinskom produkcijom se mogu pronaći u različitim mehanizmima molekularne kancerogeneze (159). Mucinozni tumori su povezani sa MSI, i u hereditarnoj i sporadičnoj formi CRC. Takođe se ova patološka karakteristika češće nalazi i kod CRC nastalih mehanizmom CIMP. U publikovanim studijama postoji izvesna kontraverznost u vezi značaja MSI statusa u preživljavanju kod signet-ring i mucinoznih tumora. Prema nekim autorima, MSI status, signet ring i mucinoznih tumora nije značajan prediktivni faktor preživljavanja, obzirom da su ove histološke odlike vezane za lošiju prognozu (153).

Diferentovanost kancera je stari, patohistološki parametar, ali se u praksi retko koristi kao prognostički faktor. Slabo diferentovani tumori su povezani sa povećanim rizikom od perforacije tumora, i većim brojem metastaza u regionalnim limfnim čvorovima i jetri (160, 161). Multivarijantnom analizom u ovoj studiji pokazano je da diferentovanost predstavlja nezavisan, prognostički faktor za preživljavanje i pojavu recidiva bolesti (statistički značajan u analizi OS, DSS i DFS). Slabo diferentovani tumori su češće MSI-H fenotipa i oni su povezani sa boljom prognozom. Slabo-diferentovan MSS/L tumor ima lošiju prognozu tj. veću sklonost recidivima bolesti.

6. ZAKLJUČAK

Iz rezultata dobijenih u ovoj studiji mogu se izvesti sledeći zaključci:

1. Mikrosatelitna nestabilnost je detektovana u 12% naših bolesnika sa kolorektalnim karcinomom.
2. Kliničke i patohistološke karakteristike tumora koje ukazuju na MSI-H fenotip su lokalizacija u desnom kolonu, mucinska produkcija, slabija diferentovanost.
3. Ispunjenost bar jednog revidiranog Bethesda kriterijuma je važan klinički kriterijumi koji ukazuje na MSI-H fenotip CRC.
4. MsPath skor i MSI-histologija su važni patološki kriterijumi koji mogu pomoći u detekciji MSI-H fenotipa CRC.
5. Pentaplex PCR predstavlja jednostavnu, lako izvodljivu, praktičnu i pouzdanu metodu za određivanje mikrosatelitnog statusa tumora.
6. BAT25 i BAT26 su najsenzitivniji mikrosatelitni, mononukleotidni markeri za detekciju MSI-H CRC.
7. Stopa polimorfizma za ispitivane markere u populaciji naših pacijenata je iznosila: 1.3 % za BAT-25; 1,7% za NR-21; 0.5% za NR-24. Nije nađen polimorfizam za markere BAT-26 i NR-22.
8. Od 18 pacijenata sa MSI-H tumorima, dijagnoza Lynch sindroma je verovatna kod 10 pacijenata sa nemetilovanim statusom promotorskog regiona hMLH1 gena (kandidati za sekvenciranje MMR gena).
9. Mikrosatelitna nestabilnost je prognostički faktor koji je povezan sa manjom stopom pojave recidiva (lokalnih ili udaljenih metastaza) kod pacijenata sa kolorektalnih karcinoma u I, II i III stadijumu bolesti, ali ne utiče na bolest-specifično i celokupno preživljavanje pacijenata sa CRC.

7. LITERATURA

1. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C and Parkin DM. GLOBOCAN 2008 v2.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 10 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2010. Available from: <http://globocan.iarc.fr>, pristupljeno u septembru 2012.
2. Watson AJ, Collins PD. Colon cancer: a civilization disorder. *Dig Dis.* 2011; 29(2):222-8.
3. Benson AB 3rd. Epidemiology, disease progression, and economic burden of colorectal cancer. *J Manag Care Pharm.* 2007; 13(6 Suppl C):S5-18.
4. Institut za javno zdravlje Srbije "Jovan Jovanović Batut". Incidencija i mortalitet od raka u centralnoj Srbiji, 1999. Beograd: Institut za javno zdravlje 2011.
5. Krivokapic Z. Karcinom rektuma: Poglavlje 2. I izdanje. Zavod za udžbenike. Beograd 2012.
6. Meyer JE, Narang T, Schnoll-Sussman FH, Pochapin MB, Christos PJ, Sherr DL. Increasing incidence of rectal cancer in patients aged younger than 40 years: an analysis of the surveillance, epidemiology, and end results database. *Cancer.* 2010; 116(18):4354-9.
7. Howlader N, Noone AM, Krapcho M, Neyman N, Aminou R, Altekruse SF, Kosary CL, Ruhl J, Tatalovich Z, Cho H, Mariotto A, Eisner MP, Lewis DR, Chen HS, Feuer EJ, Cronin KA (eds). *SEER Cancer Statistics Review, 1975-2009 (Vintage 2009 Populations)*, National Cancer Institute. Bethesda, MD, http://seer.cancer.gov/csr/1975_2009_pops09/, based on November 2011 SEER data submission, posted to the SEER web site, 2012.
8. Stryker SJ, Wolff BG, Culp CE, Libbe SD, Ilstrup DM, MacCarty RL. Natural history of untreated colonic polyps. *Gastroenterology.* 1987; 93(5):1009-13.
9. Rizzo A, Pallone F, Monteleone G, Fantini MC. Intestinal inflammation and colorectal cancer: a double-edged sword? *World J Gastroenterol.* 2011; 17(26):3092-100.
10. Canavan C, Abrams KR, Mayberry J. Meta-analysis: colorectal and small bowel cancer risk in patients with Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther.* 2006; 23(8):1097-104.

11. Eaden JA, Abrams KR, Mayberry JF. The risk of colorectal cancer in ulcerative colitis: a meta-analysis. *Gut*. 2001; 48(4):526-35.
12. Ekblom A, Helmick C, Zack M, Adami HO. Ulcerative colitis and colorectal cancer. A population-based study. *N Engl J Med*. 1990; 323(18):1228-33.
13. Newcomb PA, Savu A, Phipps AI, Coghill AE, Yasui Y. Impact of colon cancer screening on family history phenotype. *Epidemiology*. 2012; 23(2):308-10.
14. Kuriki K, Tajima K. The increasing incidence of colorectal cancer and the preventive strategy in Japan. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2006; 7(3):495-501.
15. Reddy BS, Simi B, Patel N, Aliaga C, Rao CV. Effect of amount and types of dietary fat on intestinal bacterial 7 alpha-dehydroxylase and phosphatidylinositol-specific phospholipase C and colonic mucosal diacylglycerol kinase and PKC activities during stages of colon tumor promotion. *Cancer Res*. 1996; 56(10):2314-20.
16. Chan DS, Lau R, Aune D, Vieira R, Greenwood DC, Kampman E, Norat T. Red and processed meat and colorectal cancer incidence: meta-analysis of prospective studies. *PLoS One*. 2011; 6(6):e20456.
17. Vargas AJ, Thompson PA. Diet and nutrient factors in colorectal cancer risk. *Nutr Clin Pract*. 2012; 27(5):613-23.
18. Giovannucci E. Metabolic syndrome, hyperinsulinemia, and colon cancer: a review. *Am J Clin Nutr*. 2007; 86(3):s836-42.
19. Larsson SC, Orsini N, Wolk A. Diabetes mellitus and risk of colorectal cancer: a meta-analysis. *J Natl Cancer Inst*. 2005; 97(22):1679-87.
20. Ferrari P, Jenab M, Norat T, Moskal A, Slimani N, Olsen A, et al. Lifetime and baseline alcohol intake and risk of colon and rectal cancers in the European prospective investigation into cancer and nutrition (EPIC). *Int J Cancer*. 2007; 121(9):2065-72.
21. Akhter M, Kuriyama S, Nakaya N, Shimazu T, Ohmori K, Nishino Y, Tsubono Y, Fukao A, Tsuji I. Alcohol consumption is associated with an increased risk of distal colon and rectal cancer in Japanese men: the Miyagi Cohort Study. *Eur J Cancer*. 2007; 43 (2):383-90.

22. Liang PS, Chen TY, Giovannucci E. Cigarette smoking and colorectal cancer incidence and mortality: systematic review and meta-analysis. *Int J Cancer*. 2009; 124(10):2406-15.
23. Steinbach G, Lynch PM, Phillips RK, et al. The effect of celecoxib, a cyclooxygenase-2 inhibitor, in familial adenomatous polyposis. *N Engl J Med*. 2000; 342 (26): 1946-52.
24. Giardiello FM, Yang VW, Hylind LM, et al. Primary chemoprevention of familial adenomatous polyposis with sulindac. *N Engl J Med*. 2002; 346 (14): 1054-9.
25. Rustgi AK. The genetics of hereditary colon cancer. *Genes Dev*. 2007; 21(20):2525-38.
26. Jass JR. HNPCC and sporadic MSI-H colorectal cancer: a review of the morphological similarities and differences. *Fam Cancer*. 2004; 3(2):93-100.
27. Lynch HT, Lynch JF. Lynch syndrome: history and current status. *Dis Markers* 2004; 20(4-5):181-98.
28. Classics in oncology. Heredity with reference to carcinoma as shown by the study of the cases examined in the pathological laboratory of the University of Michigan, 1895-1913. By Aldred Scott Warthin. 1913. *CA Cancer J Clin*. 1985; 35(6):348-59.
29. Lynch HT, Shaw MW, Magnuson CW, et al. Hereditary factors in cancer: study of two large Midwestern kindreds. *Arch Intern Med*. 1966; 117:206–212.
30. Lynch HT, Watson P, Lanspa SJ, et al. Natural history of colorectal cancer in hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndromes I and II). *Dis Colon Rectum* 1988; 31:439–444.
31. Guillem JG, Smith AJ, Calle JP, Ruo L. Gastrointestinal polyposis syndromes. *Curr Probl Surg* 1999; 36(4): 217–323.
32. Calland JF, Adams RB, DePrince K, et al. Genetic syndromes and genetic tests in colorectal cancer. *Semin Gastrointest Dis* 2000; 11(4): 207–18.
33. Lynch HT, Lynch PM, Pester J, Fusaro RM. The cancer family syndrome. Rare cutaneous phenotypic linkage of Torre's syndrome. *Arch Intern Med*. 1981; 141(5):607-11.
34. Felton KE, Gilchrist DM, Andrew SE. Constitutive deficiency in DNA mismatch repair: is it time for Lynch III? *Clin Genet*. 2007; 71(6):499-500.

35. Hemminki A, Markie D, Tomlinson I, Avizienyte E, Roth S, Loukola A, et al. A serine/threonine kinase gene defective in Peutz-Jeghers syndrome. *Nature*. 1998; 391(6663):184-7.
36. Duffy MJ. Carcinoembryonic antigen as a marker for colorectal cancer: is it clinically useful? *Clin Chem*. 2001; 47(4):624-30.
37. Liang JT, Huang KC, Cheng AL, Jeng YM, Wu MS, Wang SM. Clinicopathological and molecular biological features of colorectal cancer in patients less than 40 years of age. *Br J Surg*. 2003; 90(2): 205–14.
38. Kuramoto S, Oohara T. How do colorectal cancers develop? *Cancer* 1995; 75(6 Suppl): 1534–8.
39. Langner C, Harbaum L, Pollheimer MJ, Kornprat P, Lindtner RA, Schlemmer A, Vieth M, Rehak P. Mucinous differentiation in colorectal cancer--indicator of poor prognosis? *Histopathology*. 2012; 60(7):1060-72.
40. Gopalan V, Smith RA, Ho YH, Lam AK. Signet-ring cell carcinoma of colorectum--current perspectives and molecular biology. *Int J Colorectal Dis*. 2011; 26(2):127-33.
41. Jass JR. Classification of colorectal cancer based on correlation of clinical, morphological and molecular features. *Histopathology*. 2007; 50: 113–130.
42. Huh JW, Lee JH, Kim HR. Prognostic significance of tumor-infiltrating lymphocytes for patients with colorectal cancer. *Arch Surg*. 2012; 147(4):366-72.
43. Dukes CE. The classification of cancer of the rectum. *Journal of Pathological Bacteriology* 1932; 35:323.
44. Astler VB, Coller FA: The prognostic significance of direct extension of carcinoma of the colon and rectum. *Ann Surg* 1954; 139:846.
45. AJCC (American Joint Committee on Cancer) Cancer Staging Manual, 7th ed, Edge, SB, Byrd, DR, Compton, CC, et al (Eds), Springer, New York 2010. p 143.
46. Vasen HF, Mecklin JP, Khan PM, Lynch HT. The International Collaborative Group on Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer (ICG-HNPCC). *Dis Colon Rectum* 1991; 34(5):424-425.
47. Vasen HF, Watson P, Mecklin JP, Lynch HT. New clinical criteria for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC, Lynch syndrome) proposed by the International Collaborative group on HNPCC. *Gastroenterology*. 1999; 116: 1453-6.

48. Rodriguez-Bigas MA, Boland CR, Hamilton SR, et al. A National Cancer Institute Workshop on Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer Syndrome: meeting highlights and Bethesda guidelines. *J Natl Cancer Inst.* 1997; 89: 1758-62.
49. Umar A, Boland CR, Terdiman JP, et al. Revised Bethesda Guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability. *J Natl Cancer Inst.* 2004; 96: 261–8.
50. Boland CR, Thibodeau SN, Hamilton SR, Sidransky D, Eshleman JR, Burt RW, et al. A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res* 1998; 58:5248–57.
51. Hampel H, Stephens JA, Pukkala E, et al. Cancer risk in hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome: later age of onset. *Gastroenterology.* 2005; 129(2):415-21.
52. Quehenberger F, Vasen HF, van Houtwelingen HC. Risk of colorectal and endometrial cancer for carriers of mutations of the hMLH1 and hMSH2 gene: correction for ascertainment. *J Med Genet.* 2005; 42(6):491-6.
53. Choi YH, Cotterchio M, McKeown-Eyssen G, et al. Penetrance of colorectal cancer among MLH1/MSH2 carriers participating in the colorectal cancer familial registry in Ontario. *Hered Cancer Clin Pract.* 2009; 7(1):14.
54. Geary J, Sasieni P, Houlston R, et al. Gene-related cancer spectrum in families with hereditary non-polyposis colorectal cancer (HNPCC). *Fam Cancer.* 2008; 7(2):163-72.
55. Watson P, Vasen HF, Mecklin JP, et al. The risk of extra-colonic, extra-endometrial cancer in the Lynch syndrome. *Int J Cancer.* 2008; 123(2):444-9.
56. Baglietto L, Lindor NM, Dowty JG, et al. Risks of Lynch syndrome cancers for MSH6 mutation carriers. *J Natl Cancer Inst.* 2010; 102(3):193-201.
57. Senter L, Clendenning M, Sotamaa K, et al. The clinical phenotype of Lynch syndrome due to germ-line PMS2 mutations. *Gastroenterology.* 2008; 135(2):419-28.
58. Fearnhead NS, Britton MP, Bodmer WF. The ABC of APC. *Hum Mol Genet.* 2001; 10(7):721-33.

59. Laurent-Puig P, Beroud C, Soussi T. APC gene: database of germline and somatic mutations in human tumors and cell lines. *Nucleic Acids Res* 1998; 26(1): 269–70.
60. Gomez-Fernandez N, Castellvi-Bel S, et al. Molecular analysis of the APC and MUTYH genes in Galician and Catalanian FAP families: a different spectrum of mutations? *BMC Med Genet*. 2009; 10:57.
61. Mercader P. Muir-Torre syndrome. *Adv Exp Med Biol*. 2010; 685:186-95.
62. Turcot J, Despres JP, St Pierre F. Malignant tumors of the central nervous system associated with familial polyposis of the colon: report of two cases. *Dis Colon Rectum*. 1959; 2:465-8.
63. Hamilton SR, Liu B, Parsons RE, et al. The molecular basis of Turcot's syndrome. *N Engl J Med*. 1995; 332(13):839-47.
64. Colas C, Coulet F, Svrcek M, Collura A, Fléjou JF, Duval A, Hamelin R. Lynch or not Lynch? Is that always a question? *Adv Cancer Res*. 2012; 113:121-66.
65. Hegde MR, Chong B, Blazo ME, et al. A homozygous mutation in MSH6 causes Turcot syndrome. *Clin Cancer Res*. 2005; 11(13):4689-93.
66. Sjursen W, Bjornevoll I, Engebretsen LF, et al. A homozygote splice site PMS2 mutation as cause of Turcot syndrome gives rise to two different abnormal transcripts. *Fam Cancer*. 2009; 8(3):179-86.
67. Durno CA, Holter S, Sherman PM, Gallinger S. The gastrointestinal phenotype of germline biallelic mismatch repair gene mutations. *Am J Gastroenterol*. 2010; 105(11):2449-56.
68. Fearnhead NS. Familial adenomatous polyposis and MYH. *Lancet* 2003; 362 (9377): 5-6.
69. Jones N, Vogt S, Nielsen M, et al. Increased colorectal cancer incidence in obligate carriers of heterozygous mutations in MUTYH. *Gastroenterology*. 2009; 137 (2): 489-94.
70. Hampel H: Genetic testing for hereditary colorectal cancer. *Surg Oncol Clin N Am*. 2009; 18 (4): 687-703.
71. Giraldez MD, Balaguer F, Caldés T, et al. Association of MUTYH and MSH6 germline mutations in colorectal cancer patients. *Fam Cancer* 2009; 8 (4): 525-31.
72. Vogelstein B, Kinzler KW. *The Genetic Basis of Human Cancer*. McGraw-Hill, New York.1988.

73. Davidson NO. Genetic testing in colorectal cancer: who, when, how and why. *Keio J Med.* 2007; 56(1):14-20.
74. Hemminki A, Markie D, Tomlinson I, Avizienyte E, Roth S, Loukola A, et al. A serine/threonine kinase gene defective in Peutz-Jeghers syndrome. *Nature.* 1998; 391(6663):184-7.
75. Jenne DE, Reimann H, Nezu J, Friedel W, Loff S, Jeschke R, et al. Peutz-Jeghers syndrome is caused by mutations in a novel serine threonine kinase. *Nat Genet.* 1998; 18(1):38-43.
76. Loeb LA. A mutator phenotype in cancer. *Cancer Res.* 2001; 61(8):3230-9.
77. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell.* 1990; 61(5):759-67. Review.
78. Armaghany T, Wilson JD, Chu Q, Mills G. Genetic alterations in colorectal cancer. *Gastrointest Cancer Res.* 2012; 5(1):19-27.
79. Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, Nakamura Y, White R, Smits AM, Bos JL. Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med.* 1988; 319(9):525-32.
80. Baker SJ, Markowitz S, Fearon ER, Willson JK, Vogelstein B. Suppression of human colorectal carcinoma cell growth by wild-type p53. *Science.* 1990; 249:912–915.
81. Purdie CA, O’Grady J, Piris J, Wyllie AH, Bird CC. p53 expression in colorectal tumors. *Am J Pathol.* 1991; 138: 807–813.
82. Remvikos Y, Laurent-Puig P, Salmon RJ, Frelat G, Dutrillaux B, Thomas G. Simultaneous monitoring of p53 protein and DNA content of colorectal adenocarcinomas by flow cytometry. *Int J Cancer.* 1990; 45:450–456.
83. European Medicine Agency. Committee for Medical Products for Human Use, May 2008; Plenary Monthly report. 2008. <http://www.emea.europa.eu/pdfs/press/pr.27923508en.pdf/>.
84. Wang L, Cunningham JM, Winters JL, Guenther JC, French AJ, Boardman LA, et al. BRAF mutations in colon cancer are not likely attributable to defective DNA mismatch repair. *Cancer Res.* 2003; 63(17):5209-12.

85. Tan YH, Liu Y, Eu KW, Ang PW, Li WQ, Salto-Tellez M, Iacopetta B, Soong R. Detection of BRAF V600E mutation by pyrosequencing. *Pathology*. 2008; 40 (3): 295–8.
86. Mao C, Liao RY, Qiu LX, Wang XW, Ding H, Chen Q. BRAF V600E mutation and resistance to anti-EGFR monoclonal antibodies in patients with metastatic colorectal cancer: a meta-analysis. *Mol Biol Rep*. 2011; 38(4):2219-23.
87. Rasuck CG, Leite SM, Komatsuzaki F, Ferreira AC, Oliveira VC, Gomes KB. Association between methylation in mismatch repair genes, V600E BRAF mutation and microsatellite instability in colorectal cancer patients. *Mol Biol Rep*. 2012; 39(3):2553-60.
88. Fatemi M, Pao MM, Jeong S, Gal-Yam EN, Egger G, Weisenberger DJ, Jones PA. Footprinting of mammalian promoters: use of a CpG DNA methyltransferase revealing nucleosome positions at a single molecule level. *Nucleic Acids Res*. 2005; 33 (20): p176.
89. Toyota M, Ahuja N, Ohe-Toyota M, Herman JG, Baylin SB, Issa JP. CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999; 96(15):8681-6.
90. Curtin K, Slattery ML, Samowitz WS. CpG island methylation in colorectal cancer: past, present and future. *Patholog Res Int*. 2011; 2011: 902674.
91. Ogino S, Kawasaki T, Ogawa A, Kirkner GJ, Loda M, Fuchs CS. TGFBR2 mutation is correlated with CpG island methylator phenotype in microsatellite instability-high colorectal cancer. *Hum Pathol*. 2007; 38(4):614-20.
92. Wu C, Bekaii-Saab T. CpG Island Methylation, Microsatellite Instability, and BRAF Mutations and Their Clinical Application in the Treatment of Colon Cancer. *Chemother Res Pract*. 2012; 2012:359041.
93. Imai K, Yamamoto H. Carcinogenesis and microsatellite instability: the interrelationship between genetics and epigenetics. *Carcinogenesis*. 2008; 29(4):673-80.
94. Ogino S, Kawasaki T, Kirkner GJ, Kraft P, Loda M, Fuchs CS. Evaluation of markers for CpG island methylator phenotype (CIMP) in colorectal cancer by a large population-based sample. *J Mol Diagn*. 2007; 9(3):305-14.

95. Ionov Y, Peinado MA, Malkhosyan S, Shibata D, Perucho M. Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. *Nature*. 1993; 363(6429):558-61.
96. Thibodeau SN, Bren G, Schaid D. Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science*. 1993; 260(5109):816-9.
97. Peltomäki P, Lothe RA, Aaltonen LA, Pylkkänen L, Nyström-Lahti M, Seruca R, David L, Holm R, Ryberg D, Haugen A, et al. Microsatellite instability is associated with tumors that characterize the hereditary non-polyposis colorectal carcinoma syndrome. *Cancer Res*. 1993; 53(24):5853-5.
98. Jo WS, Carethers JM. Chemotherapeutic implications in microsatellite unstable colorectal cancer. *Cancer Biomark*. 2006; 2(1-2):51-60
99. Ellegren H. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. *Nat Rev Genet*. 2004; 5(6):435-45.
100. Sutter C, Gebert J, Bischoff P, Herfarth C, von Knebel Doeberitz M. Molecular screening of potential HNPCC patients using a multiplex microsatellite PCR system. *Mol Cell Probes* 1999; 13: 157–165
101. Hoang JM, Cottu PH, Thuille B, Salmon RJ, Thomas G, Hamelin R. BAT-26, an indicator of the replication error phenotype in colorectal cancers and cell lines. *Cancer Res*. 1997; 57:300–303.
102. Akiyama OY, Sato H, Yamada T, Nagasaki H, Tsuchiya A, Abe R, Yuasa Y. Germ-line mutation of the hMSH6/GTBP gene in an atypical hereditary nonpolyposis colorectal cancer kindred. *Cancer Res*. 1997; 57:3920–3923.
103. Suraweera N, Duval A, Reperant M, Vaury C, Furlan D, Leroy K et al. Evaluation of tumor microsatellite instability using five quasimonomorphic mononucleotide repeats and pentaplex PCR. *Gastroenterology* 2002; 123(6):1804-11.
104. Pyatt R, Chadwick RB, Johnson CK, Adebamowo C, de la Chapelle A, Prior TW. Polymorphic variation at the BAT-25 and BAT-26 loci in individuals of African origin: implications for microsatellite instability testing. *Am J Pathol* 1999; 155:349-353.
105. Soreide K. High-fidelity of five quasimonomorphic mononucleotide repeats to high-frequency microsatellite instability distribution in early-stage adenocarcinoma of the colon. *Anticancer Res*. 2011; 31(3):967-71.

106. Markowitz S, Wang J, Myeroff L, Parsons R, Sun L, Lutterbaugh J, Fan RS, Zborowska E, Kinzler KW, Vogelstein B, et al. Inactivation of the type II TGF-beta receptor in colon cancer cells with microsatellite instability. *Science*. 1995; 268(5215):1336-8.
107. Duval A, Hamelin R. Mutations at coding repeat sequences in mismatch repair-deficient human cancers: toward a new concept of target genes for instability. *Cancer Res*. 2002; 62(9):2447-54.
108. Duval A, Rolland S, Compoint A, Tubacher E, Iacopetta B, Thomas G, Hamelin R. Evolution of instability at coding and non-coding repeat sequences in human MSI-H colorectal cancers. *Hum Mol Genet*. 2001; 10(5):513-8.
109. Jenkins MA, Hayashi S, O'Shea AM, Burgart LJ, Smyrk TC, Shimizu D, et al. Pathology features in Bethesda guidelines predict colorectal cancer microsatellite instability: a population-based study. *Gastroenterology*. 2007; 133(1):48-56.
110. Pozza A, Scarpa M, Ruffolo C, Polese L, Erroi F, Brida A, Norberto L, Frego M. Colonic carcinogenesis in IBD: molecular events. *Ann Ital Chir*. 2011; 82(1):19-28.
111. Boland CR, Goel A. Microsatellite instability in colorectal cancer. *Gastroenterology*. 2010;138(6):2073-2087
112. Chou CL, Lin JK, Wang HS, Yang SH, Li AF, Chang SC. Microsatellite instability screening should be done for right-sided colon cancer patients less than 60 years of age. *Int J Colorectal Dis*. 2010; 25(1):47-52.
113. Urso E, Pucciarelli S, Agostini M, Maretto I, Mescoli C, Bertorelle R, Viel A, Rugge M, Nitti D. Proximal colon cancer in patients aged 51-60 years of age should be tested for microsatellites instability. A comment on the Revised Bethesda Guidelines. *Int J Colorectal Dis*. 2008; 23(8):801-6.
114. Young J, Simms LA, Biden KG, et al. Features of colorectal cancers with high-level microsatellite instability occurring in familial and sporadic settings: parallel pathways of tumorigenesis. *Am J Pathol*. 2001; 159(6):2107-16.
115. Malkhosyan SR, Yamamoto H, Piao Z, Perucho M. Late onset and high incidence of colon cancer of the mutator phenotype with hypermethylated hMLH1 gene in women. *Gastroenterology*. 2000; 119(2):598.

116. Kim H, Jen J, Vogelstein B, Hamilton SR. Clinical and pathological characteristics of sporadic colorectal carcinomas with DNA replication errors in microsatellite sequences. *Am J Pathol.* 1994; 145(1):148-56.
117. Hyde A, Fontaine D, Stuckless S, et al. A histology-based model for predicting microsatellite instability in colorectal cancers. *Am J Surg Pathol.* 2010; 34(12): 1820-9.
118. Greenson JK, Huang SC, Herron C, et al. Pathologic predictors of microsatellite instability in colorectal cancer. *Am J Surg Pathol.* 2009; 33: 126-133.
119. Kane MF, Loda M, Gaida GM, et al. Methylation of the hMLH1 promoter correlates with lack of expression of hMLH1 in sporadic colon tumors and mismatch repair-defective human tumor cell lines. *Cancer Res.* 1997; 57(5):808-11.
120. Arain MA, Sawhney M, Sheikh S, et al. CIMP status of interval colon cancers: another piece to the puzzle. *Am J Gastroenterol.* 2010; 105(5):1189-95.
121. Domingo E, Laiho P, Ollikainen M, et al. BRAF screening as a low-cost effective strategy for simplifying HNPCC genetic testing. *J Med Genet.* 2004; 41(9):664-8.
122. Kazama Y, Watanabe T, Kanazawa T, Tanaka J, Tanaka T, Nagawa H. Poorly differentiated colorectal adenocarcinomas show higher rates of microsatellite instability and promoter methylation of p16 and hMLH1: a study matched for T classification and tumor location. *J Surg Oncol.* 2008; 97(3):278-8.
123. Kazama Y, Watanabe T, Kanazawa T, Tanaka J, Tanaka T, Nagawa H. Microsatellite instability in poorly differentiated adenocarcinomas of the colon and rectum: relationship to clinicopathological features. *J Clin Pathol.* 2007; 60(6):701-4.
124. Lynch HT, Smyrk TC. Identifying hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *N Engl J Med.* 1998; 338:1537-8.
125. Wijnen JT, Vasen HF, Khan PM, Zwinderman AH, van der Klift H, Mulder A, et al. Clinical findings with implications for genetic testing in families with clustering of colorectal cancer. *N Engl J Med.* 1998; 339:511-8.
126. Gologan A, Krasinskas A, Hunt J, Thull DL, Farkas L, Sepulveda AR. Performance of the revised Bethesda guidelines for identification of colorectal carcinomas with a high level of microsatellite instability. *Arch Pathol Lab Med.* 2005; 129:1390-7.

127. Krivokapić Z, Marković S, Antić J, Dimitrijević I, Bojić D, Svorcan P, Jojić N, Damjanović S. Clinical and pathological tools for identifying microsatellite instability in colorectal cancer. *Croat Med J.* 2012; 53(4):328-35.
128. Yearsley M, Hampel H, Lehman A, Nakagawa H, de la Chapelle A, Frankel WL. Histologic features distinguish microsatellite-high from microsatellite-low and microsatellite-stable colorectal carcinomas, but do not differentiate germline mutations from methylation of the MLH1 promoter. *Hum Pathol.* 2006; 37:831-838.
129. Pawlik TM, Raut CP, Rodriguez-Bigas MA. Colorectal carcinogenesis: MSI-H versus MSI-L. *Dis Markers.* 2004; 20:199-206.
130. J.R. Jass, K.G. Biden, M.C. Cummings, L.A. Simms, M. Walsh and E. Schoch et al., Characterisation of a subtype of colorectal cancer combining features of the suppressor and mild mutator pathways. *J Clin Pathol.* 1999; 52: 455–460.
131. M.Konishi, R. Kikuchi-Yanoshita, K.Tanaka, M. Muraoka, A. Onda and Y. Okumura et al., Molecular nature of colon tumors in hereditary nonpolyposis colon cancer, familial polyposis, and sporadic colon cancer. *Gastroenterology.* 1996; 111:307– 317.
132. T. Uchida, K.Wada, T. Akamatsu, M. Yonezawa, H. Noguchi and A. Mizoguchi et al., A novel epidermal growth factor-like molecule containing two follistatin modules stimulates tyrosine phosphorylation of erbB-4 in MKN28 gastric cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999; 266:593–602.
133. N. Papadopoulos, N.C. Nicolaides, B. Liu, R. Parsons, C. Lengauer, F. Palombo, A. D'Arrigo, S. Markowitz, J.K.V. Willson, K.W. Kinzler, J. Jiricny and B. Vogelstein, Mutations of GTBP in genetically unstable cells, *Science* 1995;268:1915–1917.
134. A. Loukola, K. Eklin, R. Salovaara, P. Kristo, H. Jarvinen, J.P. Mecklin, V. Launonen and L.A. Aaltonen, Microsatellite marker analysis in screening for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC), *Cancer Res.* 2001; 61: 4545–4549.
135. Hoang JM, Cottu PH, Thuille B, Salmon RJ, Thomas G, Hamelin R. BAT-26, an indicator of the replication error phenotype in colorectal cancers and cell lines. *Cancer Res.* 1997; 57: 300-303.

136. Gonzalez-Garcia I, Moreno V, Navarro M, Marti-Rague J, Marcuello E, Benasco C, Campos O, Capella G, Peinado MA. Standardized approach for microsatellite instability detection in colorectal carcinomas. *J Natl Cancer Inst.* 2000;92: 544-549.
137. Dietmaier W, Wallinger S, Bocker T et al. Diagnostic microsatellite instability: definition and correlation with mismatch repair protein expression. *Cancer Res.* 1997; 57: 4749-56.
138. Yu H-JA, Lin KM, Ota DM et al. Hereditary nonpolyposis colorectal cancer: preventive management. *Cancer Treat Rev.* 2003; 29:461-H70.
139. Fuzikawa AK, Hadad LA, da-Cunha-Melo JR et al. Utilization of microsatellites for the analysis of genomic alterations in colorectal cancers in Brazil. *Braz J Med Biol Res.* 1997; 30:915-21.
140. Zhou XP, Hoang JM, Li YJ, Seruca R et al. Determination of the replication error phenotype in human tumors without the requirement for matching normal DNA by analysis of mononucleotide repeat microsatellites. *Genes Chrom Cancer.* 1998; 21:101-7.
141. Iacopetta B, Hamelin R. Rapid and nonisotopic SSCP-based analysis of the BAT-26 mononucleotide repeat for identification of the replication error phenotype in human cancers. *Hum Mutat.* 1998; 12:355-60.
142. Buhard O, Cattaneo F, Wong YF, Yim SF, Friedman E, Flejou JF, Duval A, Hamelin R. Multipopulation analysis of polymorphisms in five mononucleotide repeats used to determine the microsatellite instability status of human tumors. *J Clin Oncol.* 2006; 24(2):241-51.
143. Pyatt R, Chadwick RB, Johnson CK et al. Polymorphic variation at the BAT-25 and BAT-26 loci in individuals of African origin. Implications for microsatellite instability testing. *Am J Pathol.* 1999; 155:349-53.
144. Colombino M, Cossu A, Manca A et al. Prevalence and prognostic role of microsatellite instability in patients with rectal carcinoma. *Ann Oncol.* 2000; 13:1447-53.
145. R. Gryfe, H. Kim, E.T. Hsieh, M.D. Aronson, E.J. Holowaty and S.B. Bull et al. Tumor microsatellite instability and clinical outcome in young patients with colorectal cancer, *N Engl J Med.* 2000; 342:69–77.

146. W.S. Samowitz, K. Curtin, K.N. Ma, D. Schaffer, L.W. Coleman and M. Leppert et al., Microsatellite instability in sporadic colon cancer is associated with an improved prognosis at the population level, *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2001; 10:917–923.
147. T. Watanabe, T.T. Wu, P.J. Catalano, T. Ueki, R. Satriano and D.G. Haller et al., Molecular predictors of survival after adjuvant chemotherapy for colon cancer, *N Engl J Med.* 2001; 344: 1196–1206.
148. S.M. Farrington, A.J. McKinley, A.D. Carothers, C. Cunningham, V.J. Bubb and L. Sharp et al., Evidence for an age-related influence of microsatellite instability on colorectal cancer survival, *Int J Cancer.* 2002; 98: 844–850.
149. C.M. Ribic, D.J. Sargent, M.J. Moore, S.N. Thibodeau, A.J. French and R.M. Goldberg et al., Tumor microsatellite instability status as a predictor of benefit from fluorouracil-based adjuvant chemotherapy for colon cancer, *N Engl J Med.* 2003; 349:247–257.
150. R. Ward, A. Meagher, I. Tomlinson, T. O'Connor, M. Norrie and R. Wu et al., Microsatellite instability and the clinicopathological features of sporadic colorectal cancer, *Gut.* 2001; 48:821–829.
151. Ogino S, Nosho K, Irahara N, Meyerhardt JA, Baba Y, Shima K. Lymphocytic reaction to colorectal cancer is associated with longer survival, independent of lymph node count, microsatellite instability, and CpG island methylator phenotype. *Clin Cancer Res.* 2009; 15(20):6412-20.
152. Dolcetti R, Viel A, Doglioni C, et al. High prevalence of activated intraepithelial cytotoxic T lymphocytes and increased neoplastic cell apoptosis in colorectal carcinomas with microsatellite instability. *Am J Pathol.* 1999; 154(6):1805-1813.
153. Kakar, S.; Smyrk, T.C. Signet ring cell carcinoma of the colorectum: Correlations between microsatellite instability, clinicopathologic features and survival. *Mod. Pathol.* 2005; 18:244-249.
154. Kang H, O'Connell JB, Maggard MA, Sack J, Ko CY. A 10-year outcomes evaluation of mucinous and signet-ring cell carcinoma of the colon and rectum. *Dis Colon Rectum* 2005; 48: 1161-1168.

155. Du W, Mah JT, Lee J, Sankila R, Sankaranarayanan R, Chia KS. Incidence and survival of mucinous adenocarcinoma of the colorectum: a population-based study from an Asian country. *Dis Colon Rectum* 2004; 47: 78-85.
156. Nozoe T, Anai H, Nasu S, Sugimachi K. Clinicopathological characteristics of mucinous carcinoma of the colon and rectum. *J Surg Oncol* 2000; 75: 103-107.
157. Negri FV, Wotherspoon A, Cunningham D, Norman AR, Chong G, Ross PJ. Mucinous histology predicts for reduced fluorouracil responsiveness and survival in advanced colorectal cancer. *Ann Oncol.* 2005; 16: 1305-1310.
158. Chew MH, Yeo SA, Ng ZP, Lim KH, Koh PK, et al. Critical analysis of mucin and signet ring cell as prognostic factors in an Asian population of 2,764 sporadic colorectal cancers. *Int. J. Colorectal Dis.* 2010; 25:1221-1229.
159. Borger ME, Gosens MJ, Jeuken JW, van Kempen LC, van de Velde CJ, van Krieken JH, et al. Signet ring cell differentiation in mucinous colorectal carcinoma. *J. Pathol.* 2007; 212:278-286.

Biografija autora

Marković dr Srđan je rođen 29.08.1982. godine u Kladovu. Osnovnu školu „Stefanija Mihajlović“ završio je u Brznoj Palanci kao Vukovac i učenik generacije (učesnik brojnih takmičenja i nosilac specijalnih Vukovih diploma). Gimnaziju „Predrag Kostić“ u Negotinu je završio, takođe kao Vukovac i učenik generacije, nagrađen specijalnim Vukovim diplomama iz sledećih predmeta: matematike, fizike, hemije, biologije i srpskog jezika. Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu je upisao šk. 2001/02. godine kao redovan student, diplomirao 27.06.2007. godine sa srednjom ocenom 9.31. U toku studiranja je bio stipendista Fonda za mlade talente Ministarstva prosvete i sporta, i dobitnik pohvalnice za najboljeg studenta Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Tokom studija je bio autor tri naučno-istraživačka rada. Po završetku studija je bio angažovan na evropskom projektu kao istraživač pripravnik u Institutu za medicinska istraživanja, Univerziteta u Beogradu od septembra 2007. godine do marta 2008. godine gde je upoznat sa procesom naučno-istraživačkog rada kao i metodama savremene serološke i molekularne dijagnostike. Školske 2007/08. godine upisao je doktorske studije na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu, smer-molekularna medicina. Stipendista - doktorant Ministarstva nauke Republike Srbije je bio u toku 2008. do zaposlenja u KBC „Zvezdara“, decembra 2008. godine. Oktobra 2010. godine je upisao specijalizaciju iz oblasti Interne medicine. Tokom decembra meseca 2011. godine boravio je u Institutu za medicinska istraživanja u Parizu u grupi prof. Richarda Hamelina (INSERM, UMRS 938, Centre de Recherche Saint Antoine, Equipe “Instablite’ des Microsatellites et Cancers” Paris, France) koja se bavi genetskim fenomenom, mikrosatelitnom nestabilnošću, u karcinomima, koja je i predmet doktorske disertacije dr Srđana Markovića. Kao autor i koautor, publikovao je više stručnih radova u naučnim časopisima, domaćim i stranim kongresima. Dobitnik je nagrade (Ingeborg Hörhager Prize) za najbolji apstrakt i prezentaciju na Evropskom kongresu posvećenom kolorektalnom karcinomu u aprilu 2011. godine u Beču. U oktobru 2012. godine je dobio III nagradu za poster prezentaciju rada na koloproktološkom simpozijumu u Beogradu, gde je imao i oralnu prezentaciju studije u vezi sa mikrosatelitnom nestabilnošću i kolorektalnim karcinomom. Odlično govori engleski jezik. Oženjen je, otac je dvomesečne Sare.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Срђан Марковић

број уписа _____

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Значај одређивања микросателитне нестабилности као генетског маркера у колоректалном карциному

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

Потпис докторанда

У Београду, 01.02.2013.

S Markovic

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

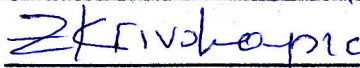
Име и презиме аутора Срђан Марковић

Број уписа _____

Студијски програм Молекуларна Медицина

Наслов рада Значај одређивања микросателитне нестабилности као
генетског маркера у колоректалном карциному

Ментор Проф. др Зоран Кривокапић

Потписани 

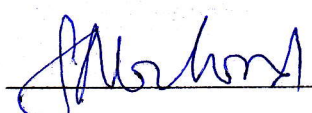
изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској
верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу Дигиталног
репозиторијума Универзитета у Београду.

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

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

У Београду, 01.02.2013.

Потпис докторанда



Прилог 3.

Изјава о коришћењу

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

Значај одређивања микросателитне нестабилности као генетског маркера у колоректалном карциному

која је моје ауторско дело.

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

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

① Ауторство

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

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис доктора/да

У Београду, 01.02.2013.